

Folheto informativo do VeriSeq NIPT Solution v2

PARA UTILIZAÇÃO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

Uso previsto

O VeriSeq NIPT Solution v2 é um teste de diagnóstico *in vitro* para ser usado na triagem genômica ampla para a detecção de anomalias genéticas no feto com base em amostras de sangue total periférico de gestantes com pelo menos 10 semanas de gravidez. O VeriSeq NIPT Solution v2 usa o sequenciamento completo do genoma para detectar duplicações e deleções parciais em todos os autossomos e a condição de aneuploidia em todos os cromossomos. O teste oferece uma opção para solicitar o relato de aneuploidia dos cromossomos sexuais (ACS). Esse produto não deve ser usado como a única base para o diagnóstico ou para outras decisões relativas à conduta na gravidez.

O VeriSeq NIPT Solution v2 inclui: o VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 para o VeriSeq NIPT Microlab STAR, o VeriSeq NIPT Sample Prep Kits e o VeriSeq Onsite Server v2 com o VeriSeq NIPT Assay Software v2. O VeriSeq NIPT Solution v2 deverá ser usado com um sequenciador de última geração.

Resumo e explicação do ensaio

Anomalias cromossômicas fetais, especialmente aneuploidia, que é um número anormal de cromossomos, são uma causa comum de falha reprodutiva, anomalias congênitas, atraso no desenvolvimento e incapacidades intelectuais. A aneuploidia afeta aproximadamente 1 em cada 300 nascidos vivos, com índices muito mais elevados associados a aborto e natimortos.^{1,2} Até pouco tempo, havia dois tipos de testes pré-natais para essas doenças: testes ou triagens de diagnóstico. Os testes de diagnóstico envolvem procedimentos invasivos, como a amniocentese ou a biópsia das vilosidades coriônicas. Esses métodos de teste são considerados o padrão ouro para a detecção de aneuploidia fetal. No entanto, eles estão associados a um risco de aborto espontâneo entre 0,11% e 0,22%.³ Os testes convencionais de múltiplos marcadores não têm qualquer risco de aborto espontâneo, uma vez que são não invasivos, mas são menos precisos do que os testes de diagnóstico. Seus índices de detecção de trissomia 21 variam entre 69–96%, dependendo do teste em particular, da idade materna e da idade gestacional no momento do teste.⁴ É importante observar que eles têm índices de falso-positivos de aproximadamente 5%, o que pode levar a um teste de diagnóstico invasivo para confirmação e, portanto, ao risco de aborto espontâneo relacionado ao procedimento.⁴ Exames de ultrassonografia também podem detectar anomalias cromossômicas, mas com menos exatidão do que esses outros métodos.

A aneuploidia fetal dos cromossomos 21, 18, 13, X e Y pode ser detectada com um grau de precisão elevado por meio de testes pré-natais não invasivos (NIPTs) usando sequenciamento de genoma completo ou DNA livre de células (cfDNA) obtido de plasma materno com gestação de 10 semanas ou posterior. Uma metanálise recente de vários estudos clínicos relatou os índices de detecção ponderados agrupados e as especificidades das trissomias 21 e 18 em gestações únicas da seguinte forma: trissomia 21 99,7% e 99,96% e trissomia 18 97,9% e 99,96%, respectivamente.⁵ Um estudo sugere que o uso de NIPT como triagem primária em todas as gestações pode resultar em uma redução de 89% no número de procedimentos invasivos confirmatórios.⁶

Devido à significativa redução dos índices de falso-positivos com o NIPT em comparação com a triagem de múltiplos marcadores, numerosas organizações médicas profissionais emitiram opiniões dando suporte a várias indicações para o uso de NIPT.

Especificamente, a International Society for Prenatal Diagnosis, o American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)/Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), o American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) e a European Society of Human Genetics/American Society of Human Genetics apoiam a oferta de NIPT a todas as gestantes.^{7,8,9} São recomendados aconselhamento pré-teste, consentimento informado e testes de diagnóstico para confirmar um resultado positivo para cfDNA.⁴

O VeriSeq NIPT Solution v2 é um teste de diagnóstico in vitro (IVD) não invasivo que utiliza sequenciamento de genoma completo de fragmentos de cfDNA originários de amostras de sangue total periférico de gestantes com pelo menos 10 semanas de gravidez. O teste oferece duas opções de tipos de triagem: básica e genômica ampla. A triagem básica fornece informações sobre a condição da aneuploidia somente dos cromossomos 21, 18, 13, X e Y. A triagem genômica ampla fornece duplicações e deleções parciais para todos os autossomos e a condição de aneuploidia de todos os cromossomos. Ambos os tipos de triagem fornecem a opção de informações de aneuploidia do cromossomo sexual (ACS) com ou sem informações do sexo fetal. A opção de informações da ACS pode ser desativada. Se a opção de informações da ACS for desativada, o sexo fetal também não será informado. Para obter mais informações sobre as opções de informações sobre sexo, consulte o *Guia do software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)*.

Princípios do procedimento

O VeriSeq NIPT Solution v2 é uma solução automatizada para exames NIPT em laboratório que consiste na preparação automatizada de amostras e na análise de dados de sequenciamento. Os VeriSeq NIPT Sample Prep Kits são reagentes para uso único especializados utilizados juntamente com o VeriSeq NIPT Microlab STAR para preparar lotes de 24, 48 ou 96 amostras para sequenciamento de última geração. Os dados de sequenciamento de genoma completo tipo paired-end são analisados por software especializado, o VeriSeq NIPT Assay Software v2, e é gerado um relatório que fornece resultados qualitativos.

O fluxo de trabalho é composto pelos seguintes procedimentos: coleta de amostras, isolamento de plasma, extração de cfDNA, preparação de bibliotecas, quantificação de bibliotecas, pooling de bibliotecas, sequenciamento e análise, que são descritos em mais detalhes:

- ▶ **Coleta de amostras** — 7–10 ml de sangue total periférico materno são colhidos em um tubo de coleta de sangue (BCT) de DNA livre de células Streck que evita lise celular e contaminação genômica e estabiliza o sangue total em temperatura ambiente.
- ▶ **Isolamento de plasma** — Até 5 dias após a coleta, o plasma é isolado do sangue total periférico materno por técnicas de centrifugação padrão. O VeriSeq NIPT Microlab STAR aspira e distribui o plasma em uma placa de 96 poços profundos para processamento subsequente. Caso seja necessário repetir um teste, as amostras pós-processamento podem ser novamente tampadas e armazenadas a 4 °C por mais 5 dias (até um total de 10 dias após a coleta de sangue).



CUIDADO

Ultrapassar os tempos mencionados acima pode afetar negativamente os índices de falhas nas amostras individuais.

- ▶ **Extração de cfDNA** — A purificação de cfDNA do plasma é atingida pela adsorção em uma placa de ligação, com a lavagem da placa de ligação para remover contaminantes e realizando a eluição.
- ▶ **Preparação de bibliotecas** — Os fragmentos de cfDNA purificados são sujeitos a um processo de reparo das extremidades para converter saliências de 5' e 3' em extremidades cegas. Em seguida, é adicionado às extremidades de 3' um nucleotídeo de desoxiadenosina para criar uma saliência de base única. Os adaptadores indexados que contêm uma saliência de base única de 3' de desoxitimidina são ligados aos fragmentos de cfDNA processados. O DNA ligado é purificado com esferas de imobilização reversa de fase sólida. Cada amostra de um conjunto de 24, 48 ou 96 recebe um adaptador indexado exclusivo. Os adaptadores têm duas finalidades:
 - ▶ Os índices permitem a identificação das amostras no sequenciamento subsequente.
 - ▶ Os adaptadores de índice contêm sequências que permitem a captura de bibliotecas na superfície sólida de uma lâmina de fluxo de sequenciamento para clusterização e sequenciamento subsequente.
- ▶ **Quantificação** — O produto da biblioteca é quantificado por meio de um corante fluorescente com concentração determinada por comparação com uma curva de DNA padrão.
- ▶ **Pooling e sequenciamento de bibliotecas** — As bibliotecas de amostras são agrupadas em pools de 24 ou 48 amostras em quantidades ajustadas para minimizar a variação da cobertura. Cada pool é sequenciado com um sequenciador de última geração.

- ▶ O VeriSeq NIPT Solution v2 não inclui equipamento de sequenciamento e materiais de consumo.
- ▶ **Análise** — Para cada amostra, a análise consiste no seguinte:
 - ▶ Identificação de fragmentos da biblioteca por sequência de índice e alinhamento das leituras tipo paired-end em um genoma de referência humano.
 - ▶ Estimativa da fração fetal da biblioteca pela combinação das informações da distribuição dos comprimentos e das coordenadas genômicas dos fragmentos da biblioteca.
 - ▶ Depois de considerar os vieses conhecidos, um modelo estatístico detecta regiões do genoma com sub-representação ou sobre-representação na biblioteca de uma maneira consistente com uma anomalia no nível estimado da fração fetal.
 - ▶ O relatório do NIPT fornece um resumo dos resultados para o menu de testes selecionado em que a mensagem ANOMALY DETECTED (ANOMALIA DETECTADA) ou NO ANOMALY DETECTED (NENHUMA ANOMALIA DETECTADA) é exibida juntamente com uma estimativa da fração fetal para amostras que são aprovadas pelo CQ.
 - ▶ O Relatório suplementar fornece métricas quantitativas que caracterizam cada anomalia detectada.

Limitações do procedimento

- ▶ O VeriSeq NIPT Solution v2 é um teste de triagem e não deve ser considerado isoladamente com relação a outros achados clínicos e resultados de testes. As conclusões sobre a condição do feto e as decisões de manejo da gravidez não devem se basear somente nos resultados da triagem feita pelo NIPT (teste pré-natal não invasivo).⁷
- ▶ O VeriSeq NIPT Solution v2 informa o seguinte:
 - ▶ A triagem básica testa a sobre-representação dos cromossomos 13, 18 e 21.
 - ▶ A triagem genômica ampla testa a sub-representação e a sobre-representação de todos os autossomos, incluindo deleções e duplicações parciais de, pelo menos, 7 Mb.
 - ▶ Em gestações únicas, com a seleção de Yes (Sim) ou SCA (ACS) como opção sexual informada, as seguintes anomalias dos cromossomos são relatadas: XO, XXX, XXY e XYY.
 - ▶ Em gestações únicas, com a seleção de Yes (Sim) como opção sexual informada, o sexo fetal é informado.
 - ▶ A presença de um cromossomo Y em gestações gemelares.
- ▶ As evidências que dão suporte à sensibilidade e à especificidade do teste abrangem gestações únicas e gemelares. Estas instruções de uso não fornecem dados de sensibilidade e especificidade para gestações de trigêmeos ou de ordem superior.
- ▶ O VeriSeq NIPT Solution v2 não se destina a detectar poliploidias, como triploidia.
- ▶ O VeriSeq NIPT Solution v2 não se destina a detectar rearranjos cromossômicos equilibrados.
- ▶ O ensaio requer amostras de sangue total periférico de gestantes com pelo menos 10 semanas de gravidez.
- ▶ Para triagens básicas, o VeriSeq NIPT Solution v2 testa anormalidades cromossômicas específicas. Resultados relatados como NO ANOMALY DETECTED (NENHUMA ANOMALIA DETECTADA) não eliminam a possibilidade de anormalidades nos cromossomos testados. Um resultado negativo não elimina a possibilidade de que a gravidez tenha outras anormalidades cromossômicas, condições genéticas ou malformações congênitas (como defeito aberto do tubo neural).
- ▶ Para triagens genômicas amplas, grandes deleções e duplicações com menos de 75% do tamanho do cromossomo podem ser indicativas de aneuploidia de cromossomos inteiros.
- ▶ Para triagens genômicas amplas, determinadas regiões são excluídas da análise. Uma lista dessas regiões excluídas está disponível no site de suporte da Illumina. A detecção de anomalias genômicas só é realizada em regiões não excluídas.
- ▶ As informações do sexo fetal não estão disponíveis em todas as regiões devido a regulamentos locais que regem o fornecimento de informações sobre sexo.

- ▶ Os resultados do teste podem ser confundidos por determinados fatores da mãe e do feto, incluindo, entre outros, os seguintes:
 - ▶ Mãe recentemente submetida a transfusão de sangue
 - ▶ Mãe submetida a transplante de órgão
 - ▶ Mãe submetida a procedimento cirúrgico
 - ▶ Mãe submetida a imunoterapia ou a terapia com células-tronco
 - ▶ Mãe portadora de neoplasia
 - ▶ Mosaicismo materno
 - ▶ Mosaicismo fetoplacentário
 - ▶ Morte fetal
 - ▶ Gêmeos inviáveis

Componentes do produto

O VeriSeq NIPT Solution v2 (peça n.º 20030577) consiste nos seguintes kits de preparação de amostras:

- ▶ Kit VeriSeq NIPT Sample Prep (24 amostras) (peça n.º 20025895)
- ▶ Kit VeriSeq NIPT Sample Prep (48 amostras) (peça n.º 15066801)
- ▶ Kit VeriSeq NIPT Sample Prep (96 amostras) (peça n.º 15066802)

O VeriSeq NIPT Solution v2 (peça n.º 20030577) consiste nos seguintes componentes de software:

- ▶ VeriSeq NIPT Assay Software v2 (peça n.º 20047024) pré-instalado no VeriSeq Onsite Server v2
 - ▶ VeriSeq Onsite Server v2 (peça n.º 20028403 ou 20047000) ou um VeriSeq Onsite Server existente (peça n.º 15076164 ou n.º 20016240) com upgrade para v2
- ▶ Gerenciador de fluxo de trabalho do VeriSeq NIPT v2 (peça n.º 20044988), pré-instalado no VeriSeq NIPT Microlab STAR
 - ▶ VeriSeq NIPT Microlab STAR (peça n.º Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) & 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288)
- ▶ Módulo VeriSeq NIPT Local Run Manager (peça n.º 20044989)

Reagentes

Reagentes fornecidos

A Illumina fornece os seguintes reagentes: VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 amostras) (peça n.º 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 amostras) (peça n.º 15066801) e VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 amostras) (peça n.º 15066802). Os VeriSeq NIPT Sample Prep Kits são configurados para uso com o ML STAR (peça n.º 95475-01, 95475-02 ou 806288), fornecido pela Hamilton Company.

VeriSeq NIPT Sample Prep, Caixa de extração

Tabela 1 Caixa de extração do VeriSeq NIPT (24) e (48), peças n.º 20025869 e 15066803

| Nome do reagente na etiqueta | Número de receptáculos no kit | Ingredientes ativos | Armazenamento |
|---------------------------------------|-------------------------------|--|---------------|
| Tampão de lise (Lysis Buffer) | 1 | Cloreto de guanidina em solução aquosa tamponada | 15 °C a 30 °C |
| Tampão de limpeza I (Wash Buffer I) | 1 | Cloreto de guanidina e álcool isopropílico em solução aquosa tamponada | 15 °C a 30 °C |
| Tampão de limpeza II (Wash Buffer II) | 1 | Solução aquosa tamponada contendo sais | 15 °C a 30 °C |
| Tampão de eluição (Elution Buffer) | 1 | Solução aquosa tampão | 15 °C a 30 °C |

| Nome do reagente na etiqueta | Número de receptáculos no kit | Ingredientes ativos | Armazenamento |
|--|-------------------------------|--------------------------------------|---------------|
| Solução tampão de proteinase (Proteinase Buffer) | 1 | Glicerol em solução aquosa tamponada | 15 °C a 30 °C |
| Proteinase K (Proteinase K) | 3 | Proteinase K liofilizada | 15 °C a 30 °C |

Tabela 2 Caixa de extração (96) do VeriSeq NIPT, peça n.º 15066807

| Nome do reagente na etiqueta | Número de receptáculos no kit | Ingredientes ativos | Armazenamento |
|--|-------------------------------|--|---------------|
| Tampão de lise (Lysis Buffer) | 1 | Cloreto de guanidina em solução aquosa tamponada | 15 °C a 30 °C |
| Tampão de limpeza I (Wash Buffer I) | 1 | Cloreto de guanidina e álcool isopropílico em solução aquosa tamponada | 15 °C a 30 °C |
| Tampão de limpeza II (Wash Buffer II) | 2 | Solução aquosa tamponada contendo sais | 15 °C a 30 °C |
| Tampão de eluição (Elution Buffer) | 1 | Solução aquosa tampão | 15 °C a 30 °C |
| Solução tampão de proteinase (Proteinase Buffer) | 1 | Glicerol em solução aquosa tamponada | 15 °C a 30 °C |
| Proteinase K (Proteinase K) | 4 | Proteinase K liofilizada | 15 °C a 30 °C |

VeriSeq NIPT Sample Prep, Caixa de preparação de bibliotecas

Tabela 3 Caixa de preparação de bibliotecas do VeriSeq NIPT (24) e (48), peças n.º 20026030 e 15066809

| Nome do reagente na etiqueta | Número de receptáculos no kit | Ingredientes ativos | Armazenamento |
|--|-------------------------------|--|-----------------|
| Mistura de reparo de extremidades (End Repair Mix) | 1 | DNA polimerase e dNTPs em solução aquosa tamponada | -25 °C a -15 °C |
| Mistura de poliadenilação (A-Tailing Mix) | 1 | DNA polimerase e dATP em solução aquosa tamponada | -25 °C a -15 °C |
| Mistura de ligação (Ligation Mix) | 1 | DNA ligase em solução aquosa tamponada | -25 °C a -15 °C |
| Solução tampão de hibridização (Hybridization Buffer) | 1 | Solução aquosa tampão | -25 °C a -15 °C |
| Placa adaptadora de DNA do VeriSeq NIPT (VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate) | 1 | Oligonucleotídeos em solução aquosa tamponada | -25 °C a -15 °C |

Tabela 4 Caixa de preparação de bibliotecas do VeriSeq NIPT (96), peça n.º 15066810

| Nome do reagente na etiqueta | Número de receptáculos no kit | Ingredientes ativos | Armazenamento |
|--|-------------------------------|--|-----------------|
| Mistura de reparo de extremidades (End Repair Mix) | 1 | DNA polimerase e dNTPs em solução aquosa tamponada | -25 °C a -15 °C |
| Mistura de poliadenilação (A-Tailing Mix) | 2 | DNA polimerase e dATP em solução aquosa tamponada | -25 °C a -15 °C |
| Mistura de ligação (Ligation Mix) | 2 | DNA ligase em solução aquosa tamponada | -25 °C a -15 °C |
| Solução tampão de hibridização (Hybridization Buffer) | 1 | Solução aquosa tampão | -25 °C a -15 °C |
| Placa adaptadora de DNA do VeriSeq NIPT (VeriSeq NIPT DNA Adapter Plate) | 1 | Oligonucleotídeos em solução aquosa tamponada | -25 °C a -15 °C |

VeriSeq NIPT Sample Prep, Caixa de acessórios

Tabela 5 Caixa de acessórios do VeriSeq NIPT, peça n.º 15066811

| Nome do reagente na etiqueta | Número de receptáculos no kit | Ingredientes ativos | Armazenamento |
|--|-------------------------------|---|---------------|
| Placa de ligação de DNA (DNA Binding Plate) | 1 | Microplaca de propileno com membrana de silicone modificado | 2 °C a 8 °C |
| Solução tampão de ressuspensão (Resuspension Buffer) | 1 | Solução aquosa tampão | 2 °C a 8 °C |
| Esferas de purificação de amostras (Sample Purification Beads) | 1 | Esferas paramagnéticas de fase sólida em solução aquosa tamponada | 2 °C a 8 °C |
| Reagente de quantificação de DNA (DNA Quantification Reagent) | 1 | Corante intercalante de DNA em DMSO | 2 °C a 8 °C |
| Padrão de quantificação de DNA (DNA Quantification Standard) | 1 | Padrão dsDNA em solução aquosa tamponada | 2 °C a 8 °C |

Preparação de amostras, tubos e etiquetas de fluxo de trabalho do VeriSeq NIPT

Tabela 6 Tubos e etiquetas de fluxo de trabalho, peça n.º 15071543

| Nome do item na etiqueta | Número de itens no kit | Armazenamento |
|---|------------------------|---------------|
| Etiqueta (LBL) – Código de barras da placa (Plate Barcode) | 9 | 15 °C a 30 °C |
| Etiqueta (LBL) – Código de barras da placa de poços profundos (Deep-well Plate Barcode) | 12 | 15 °C a 30 °C |
| Tubo (TB) – Tubo de pooling vazio (Empty Pooling Tube) | 5 | 15 °C a 30 °C |

Reagentes não fornecidos

Reagentes necessários, não fornecidos

- ▶ Reagentes e materiais de consumo necessários para sistemas de sequenciamento (NGSs) de última geração
- ▶ Água livre de RNase/DNase
- ▶ Etanol, 100% (absoluto), grau biologia molecular



OBSERVAÇÃO

O etanol grau biologia não molecular pode afetar negativamente o desempenho do ensaio.

Reagentes opcionais, não fornecidos

- ▶ Tampão fosfato-salino (DPBS) da Dulbecco para nenhum controle de modelos (NTC).

Armazenamento e manuseio

- 1 A temperatura ambiente é definida entre 15 °C e 30 °C.
- 2 Todos os reagentes só devem ser usados uma vez. Depois de preparados para o uso, os reagentes devem ser usados imediatamente.
- 3 Se algum conteúdo ou embalagem dos componentes do VeriSeq NIPT Solution estiver danificado ou comprometido, entre em contato com o setor de Atendimento ao cliente da Illumina.
- 4 Os reagentes permanecem estáveis quando armazenados segundo as instruções até a data de vencimento especificada nas etiquetas dos kits. Para obter informações sobre armazenamento, consulte a coluna Storage (Armazenamento) nas tabelas de *Reagentes fornecidos na página 4*. Não use reagentes fora da validade.

- 5 As mudanças na aparência física dos reagentes fornecidos podem indicar deterioração dos materiais. Se ocorrerem mudanças na aparência física (por exemplo, mudanças óbvias na coloração do reagente ou turbidez aparente com contaminação microbiana), não utilize os reagentes.
- 6 Adote as práticas recomendadas indicadas a seguir ao manusear esferas de purificação de amostras:
 - ▶ Nunca congele as esferas.
 - ▶ Aguarde que as esferas atinjam a temperatura ambiente antes do uso.
 - ▶ Imediatamente antes do uso, agite as esferas até que elas fiquem em suspensão e a cor pareça estar homogênea.
- 7 Tampão de lise, tampão de limpeza I, tampão de limpeza II, tampão de eluição e tampão de proteinase podem formar precipitados ou cristais visíveis. Antes de usar, agite vigorosamente e inspecione visualmente para ter certeza de que não há precipitados presentes.
- 8 Nunca congele sangue total após a coleta.
- 9 Faça o sequenciamento das bibliotecas logo depois do pooling. Bibliotecas agrupadas são estáveis por até 7 dias entre -25 °C e -15 °C. Não é necessária desnaturação adicional se a armazenagem ocorrer nesse período e nessas condições.

Equipamento e materiais

Equipamento e materiais necessários, não fornecidos

Equipamento necessário, não fornecido

| Equipamento | Fornecedor |
|--|---|
| Pipetas de 20 µl de canal único | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório |
| Pipetas de 200 µl de canal único | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório |
| Pipetas de 1000 µl de canal único | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório |
| Pipetador automático | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório |
| Refrigerador, 2 °C a 8 °C | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório |
| Congelador, -25 °C a -15 °C | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório |
| Microcentrífuga | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório |
| Agitador | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório |
| Conjunto de centrífuga e rotor para tubos de coleta de sangue | |
| Recomendado: | |
| • Centrífuga série Allegra X12R, 1600 g | Beckman Coulter, item n.º 392304 (120 V ou 230 V) |
| • Rotor GH-3.8 para Centrífuga Allegra com caçambas | Beckman Coulter, item n.º 369704 |
| • Tampas de caçambas de Centrífuga Allegra, conjunto de duas | Beckman Coulter, item n.º 392805 |
| • Conjunto do adaptador da Centrífuga Allegra, 16 mm, conjunto de quatro | Beckman Coulter, item n.º 359150 |
| Equivalente: | |
| • Centrífuga refrigerada com capacidade para 1600 x g com opção no-brake | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório |
| • Rotor de caçamba giratória com caçambas | |
| • Insertos para caçambas, capacidade para 24, 48 ou 96 tubos, profundidade mínima de 76 mm | |
| • Adaptadores de insertos compatíveis com tubos de coleta de sangue de 16 x 100 mm | |
| Conjunto de centrífuga e rotor para microplacas | |

| Equipamento | Fornecedor |
|--|--|
| <p>Recomendado:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrífuga Sorvall Legend XTR • Rotor de microplacas HIGHPlate 6000 • Quaisquer duas bases de suporte para microplacas indicadas a seguir: <ul style="list-style-type: none"> • Base de suporte MicroAmp de 96 poços • Suporte para placas PCR de 96 poços | <p>Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo 75004521 (120 V) ou n.º de catálogo 75004520 (230 V)</p> <p>Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo 75003606</p> <p>Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo 4379590</p> <p>Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo AB-0563/1000</p> |
| <p>Equivalente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrífuga com capacidade de 5600 x g • Rotor de placa giratória com suportes para placas de 96 poços, profundidade mínima de 76,5 mm • Base de suporte para microplacas | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório |
| <p>Um dos seguintes leitores de microplacas (fluorômetro) com SoftMax Pro v6.2.2 ou superior:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gemini XPS • SpectraMax M2 | <p>Molecular Devices, peça n.º XPS</p> <p>Molecular Devices, peça n.º M2</p> |
| SpectraMax High-Speed USB, adaptador serial | Molecular Devices, peça n.º 9000-0938 |
| <p>Termociclador com as seguintes especificações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tampa aquecida • Faixa de temperatura de 4 °C a 98 °C • Precisão de temperatura de ±2 °C • Taxa de aumento mínima de 2 °C por segundo • Compatível com placas PCR de 96 poços Twin.tec de borda inteira | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório |
| VeriSeq NIPT Microlab STAR | Hamilton, peça n.º 95475-01 (115 V), peça n.º 95475-02 (230 V), ou peça n.º 806288 (para Hamilton Company Bonaduz) |
| <p>Sistema de sequenciamento de última geração (NGS) com os seguintes recursos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sequenciamento tipo paired-end de 2 x 36 bp • Compatível com adaptadores de índice duplo para preparação de amostras VeriSeq NIPT • Produção automática de arquivos BCL • Química de dois canais • 400 milhões de leituras do tipo paired-end por execução • Compatível com o VeriSeq NIPT Assay Software v2 ou com o sistema de sequenciamento NextSeq 550Dx | Fornecedor do instrumento ou Illumina peça n.º 20005715 |
| <p>Se estiver usando um sistema de sequenciamento NextSeq 550Dx:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kit de reagentes de alta produção NextSeq 550Dx v2.5, 75 ciclos | Illumina, peça n.º 20028870 |
| VeriSeq Onsite Server v2 ou um VeriSeq Onsite Server com upgrade | Illumina, peça n.º 20028403 ou 20047000 (v2) ou n.º 15076164 ou n.º 20016240 (com upgrade) |

Equipamento opcional, não fornecido

| Equipamento | Fornecedor |
|--|--|
| Pluggo Decapper System | LGP Consulting, peça n.º 4600 4450 |
| Placa de validação de fluorescência SpectraMax SpectraTest FL1 | Molecular Devices, peça n.º 0200-5060 |
| Agitador/centrifugador, tubos de 15 ml, 40 rpm, 100–240 V | Thermo Scientific, n.º de catálogo 88881001 (EUA) ou n.º de catálogo 88881002 (UE) |

Materiais necessários, não fornecidos

| Material de consumo | Fornecedor |
|---|--|
| Pontas de filtro não estéril condutoras de 1000 µl | Hamilton, peça n.º 235905 |
| Pontas de filtro não estéril condutoras de 300 µl | Hamilton, peça n.º 235903 |
| Pontas de filtro não estéril condutoras de 50 µl | Hamilton, peça n.º 235948 |
| Reservatório de poços profundos com as seguintes especificações: <ul style="list-style-type: none"> • Formato de microplaca com 96 poços inferiores piramidais ou cônicos e capacidade mínima de 240 ml, de acordo com a norma SLAS 1-2004. • Polipropileno com preferência para baixa ligação de DNA para todas as superfícies de contato com as amostras. • As dimensões internas (nível do líquido) são compatíveis com as etapas automatizadas de aspiração e distribuição do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • As dimensões de altura são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR. | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório Reservatórios compatíveis: <ul style="list-style-type: none"> • Corning Axygen, produto n.º RES-SW96-HP-SI • Agilent, produto n.º 201246-100 |
| Tubo de reagente com as seguintes especificações: <ul style="list-style-type: none"> • Tubo que se encaixe firmemente no suporte do VeriSeq NIPT Microlab STAR com parte inferior cônica e capacidade mínima de 20 ml. • Polipropileno que seja livre de RNase-/DNase. • As dimensões internas (nível do líquido) são compatíveis com as etapas automatizadas de aspiração e distribuição do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • As dimensões de altura são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR. | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório Tubos compatíveis: <ul style="list-style-type: none"> • Roche, produto n.º 03004058001 |
| Placas de poços profundos com as seguintes especificações: <ul style="list-style-type: none"> • Formato de microplaca com 96 poços inferiores piramidais ou cônicos com capacidade mínima de 2 ml, de acordo com as normas SLAS 1-2004, 3-2004 e 4-2004. • Polipropileno com preferência para baixa ligação de DNA para todas as superfícies de contato com as amostras e estrutura resistente ao torque. • As dimensões dos poços (nível do líquido) são compatíveis com as etapas automatizadas de aspiração e distribuição do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • As dimensões de altura das placas são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR. | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório Placas compatíveis: <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, peça n.º 0030505301 • Eppendorf, produto n.º 30502302 • USA Scientific, peça n.º 1896-2000 |
| Placa de 384 poços com as seguintes especificações: <ul style="list-style-type: none"> • Microplaca com 384 poços, otimizada para baixos volumes, com capacidade mínima dos poços de 50 µl. • Polipropileno com proteção contra luz e com baixa ligação de DNA para todas as superfícies de contato com as amostras. • As dimensões dos poços (nível do líquido) são compatíveis com as etapas automatizadas de aspiração e distribuição do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • As dimensões de altura das placas são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR. | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório Placas compatíveis: <ul style="list-style-type: none"> • Corning, produto n.º 3820 |

| Material de consumo | Fornecedor |
|---|--|
| <p>Placa de 96 poços com as seguintes especificações:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplaca com estrutura resistente ao torque e 96 poços com partes inferiores cônicas, bordas elevadas e capacidade mínima de 150 µl. • Polipropileno que seja livre de RNase-/DNase com baixa ligação de DNA para todas as superfícies de contato com as amostras. • As dimensões dos poços (nível do líquido) são compatíveis com as etapas automatizadas de aspiração e distribuição do VeriSeq NIPT Microlab STAR. • As dimensões de altura das placas são compatíveis com os movimentos automatizados do VeriSeq NIPT Microlab STAR. | <p>Fornecedor de itens de uso comum do laboratório</p> <p>Placas compatíveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, peça n.º 0030129512 • Eppendorf, peça n.º 30129580 • Eppendorf, peça n.º 30129598 • Eppendorf, peça n.º 30129660 • Eppendorf, peça n.º 30129679 • BioRad, peça n.º HSP9601 |
| <p>Um dos seguintes selos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microselo "F" de alumínio • Selos de alumínio | <p>Bio-Rad, n.º de catálogo MSF1001 Beckman Coulter, item n.º 538619</p> |
| Cell-Free DNA BCT CE | Streck, n.º de catálogo 218997 |
| Tampas de pressão | Sarstedt, pedido n.º 65.802 |
| Tubos com tampa de rosca, 2 ml | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório |
| Pontas de filtro de 20 µl para pipetador de 20 µl | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório |
| Pontas de filtro de 200 µl para pipetador de 200 µl | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório |
| Pontas de filtro de 1000 µl para pipetador de 1000 µl | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório |
| Pipetas sorológicas de 25 ml | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório |
| Pipetas sorológicas de 10 ml | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório |
| <p>Recomendado:</p> <p>Deconex® SOLARSEPT Deconex® 61 DR</p> | Borer Chemie AG |
| <p>Equivalente:</p> <p>Spray desinfetante rápido à base de álcool Solução de detergente desinfetante</p> | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório |

Materiais opcionais, não fornecidos

| Material de consumo | Fornecedor |
|---|---|
| Tubo, tampa de rosca, 10 ml (somente para amostras de controle) | Sarstedt, pedido n.º 60.551 |
| Tubo, tampa de rosca, 50 ml | Fornecedor de itens de uso comum do laboratório |

Coleta, transporte e armazenamento da amostra



CUIDADO

Manuseie todas as amostras como se elas fossem potencialmente agentes infecciosos.

- 1 Devem ser coletadas amostras de sangue total de 7-10 ml em um tubo de coleta de sangue (BCT) de DNA livre de células Streck.
- 2 O transporte de sangue total deve cumprir os regulamentos aplicáveis que regem o transporte de agentes etiológicos. São recomendados métodos rápidos de envio/transporte.
- 3 Durante o transporte, armazene entre 4 °C e 30 °C. Após o recebimento das amostras, armazene entre 2 °C e 8 °C até o início do procedimento. O tempo decorrido entre a coleta de sangue e o isolamento de plasma inicial não deve ultrapassar 5 dias.

- 4 Caso seja necessário repetir um teste, as amostras pós-processamento podem ser novamente tampadas e armazenadas a 4 °C por mais 5 dias (até um total de 10 dias após a coleta de sangue).



CUIDADO

Ultrapassar os tempos mencionados acima pode afetar negativamente os índices de falhas nas amostras individuais.

Avisos e precauções

- ▶ Este ensaio contém proteinase K. Podem ocorrer ferimentos por meio de inalação, ingestão e contato com a pele ou com os olhos. Use em uma área bem ventilada, use roupa protetora, evite aspirar a poeira e descarte todos os recipientes e o conteúdo não utilizado, de acordo com as normas de segurança governamentais.
- ▶ Este ensaio contém cloreto de guanidina. Podem ocorrer ferimentos por meio de inalação, ingestão e contato com a pele ou com os olhos. Use em uma área bem ventilada, use roupa protetora e descarte todos os recipientes e o conteúdo não utilizado, de acordo com as normas de segurança governamentais locais.
- ▶ Este ensaio contém álcool isopropílico, que é um agente químico inflamável. Mantenha-o longe de fontes de calor e de chamas. Podem ocorrer ferimentos por meio de inalação, ingestão e contato com a pele ou com os olhos. Use em uma área bem ventilada, use roupa protetora e descarte todos os recipientes e o conteúdo não utilizado, de acordo com as normas de segurança governamentais locais.
- ▶ Esse ensaio contém dimetilsulfóxido, líquido corrosivo e combustível. Podem ocorrer ferimentos por meio de inalação, ingestão e contato com a pele ou com os olhos. Use em uma área bem ventilada, use roupa protetora e descarte todos os recipientes e o conteúdo não utilizado, de acordo com as normas de segurança governamentais locais.
- ▶ Para evitar a formação de gases nocivos, não descarte o resíduo da extração de cfDNA (contém tiocianato de guanidina) com resíduos contendo alvejante (hipoclorito de sódio).
- ▶ Manuseie todas as amostras como se elas contivessem agentes potencialmente infecciosos.
- ▶ Adote precauções de rotina no laboratório. Não utilize a pipeta com a boca. Não coma, beba ou fume em áreas de trabalho designadas. Use luvas descartáveis e jalecos ao manusear amostras e reagentes de ensaio. Lave as mãos cuidadosamente após manusear amostras e reagentes de ensaio.
- ▶ Não use nenhum componente de ensaio fora do prazo de validade indicado na etiqueta da caixa do ensaio. Não intercambie componentes de ensaio de diferentes lotes. Os lotes de ensaio são identificados na etiqueta da caixa do ensaio. Armazene os componentes de ensaio na temperatura especificada.
- ▶ Para evitar a degradação de amostras ou reagentes, certifique-se de que todos os vapores de hipoclorito de sódio da limpeza tenham se dissipado por completo antes de iniciar o protocolo.
- ▶ Se os procedimentos não forem seguidos conforme o estabelecido, poderá haver resultados com erro ou uma redução significativa na qualidade da amostra.
- ▶ Imediatamente informe à Illumina e às autoridades competentes dos estados membros em que o usuário e o paciente estiverem estabelecidos sobre quaisquer incidentes graves relacionados a este produto.
- ▶ Para obter informações ambientais, de saúde e segurança, consulte as folhas de dados de segurança (SDS) em support.illumina.com/sds.html.

Observações do procedimento

Para evitar contaminação

- ▶ Use pontas e materiais de consumo novos.
- ▶ Use pontas resistentes a aerossóis para reduzir o risco de carryover e de contaminação cruzada das amostras.
- ▶ Devido ao potencial de contaminação, tome muito cuidado para que o conteúdo permaneça por completo dentro do poço. Não esparrame o conteúdo. Centrifugue após cada etapa de agitação.

- ▶ Siga os regulamentos aplicáveis que regem as práticas laboratoriais e de higiene adequadas ao manusear sangue e derivados do sangue.
- ▶ Não use sprays com alvejantes durante a preparação das bibliotecas. A contaminação residual pelo alvejante pode ocasionar falha no ensaio.

Limpeza da plataforma do VeriSeq NIPT Microlab STAR

- ▶ Antes de usar, inspecione a limpeza da plataforma. Pelo menos uma vez por semana, faça a manutenção e siga estas instruções de limpeza.
- ▶ Remova todos os suportes descarregáveis e limpe com um desinfetante rápido em spray à base de álcool (Deconex® SOLARSEPT ou equivalente) e deixe secar. Se estiverem muito sujos, mergulhe-os depois numa solução com detergente desinfetante (líquido de limpeza Deconex® 61 DR ou equivalente), enxágue com o desinfetante à base de álcool e deixe secar.
- ▶ Abra a tampa frontal e limpe a plataforma com um pano embebido com Deconex® SOLARSEPT (ou equivalente). Verifique se os blocos laterais, particularmente, estão limpos.
- ▶ Remova e limpe o coletor CVS, a gaxeta e os compartimentos inferiores do CVS com um pano.
- ▶ Esvazie o recipiente de resíduos de pontas da cabeça CORE de 96 pipetas e do canal independente.
- ▶ Remova a placa de ejeção de pontas do canal independente da estação de resíduos de pontas e limpe-a: use spray Deconex® SOLARSEPT (ou equivalente) diretamente na superfície e limpe. Coloque um novo saco de plástico sobre a estrutura e volte a fixá-la. Volte a colocar a placa de ejeção de pontas limpa no lugar.
- ▶ Aplique spray Deconex® SOLARSEPT (ou equivalente) diretamente na superfície e na calha da caixa de resíduos da cabeça CORE de 96 pipetas e limpe bem.
 - ▶ Se for difícil remover o acúmulo de resíduos nas pontas, limpe com um pano embebido em água livre de RNase/DNase até que o acúmulo seja removido. Descarte o pano adequadamente. Esterilize com o desinfetante à base de álcool.
- ▶ Umedeça um pano sem fiapos ou uma compressa de algodão com etanol 70%. Limpe a janela do scanner a laser do leitor de código de barras. Usando o mesmo pano ou compressa, limpe cada poço do adaptador de placas do CPAC. Se for usado um pano, pressione o pano em cada poço do adaptador com a parte de trás de uma caneta para assegurar que o interior do poço fique bem limpo.
- ▶ Limpe os canais independentes:
 - ▶ Nos canais independentes, limpe a manga de ejeção da ponta (parte exterior dos canais de pipetagem) com um pano sem fiapos embebido em Deconex® SOLARSEPT (ou equivalente). (Consulte o *Guia de referência do Hamilton Microlab STAR n.º 15070074*.)
 - ▶ Limpe o disco de frenagem e os anéis de vedação da cabeça de pipetagem (parte exterior dos canais de pipetagem) com um pano sem fiapos embebido em Deconex® SOLARSEPT (ou equivalente).
- ▶ Limpe a cabeça CORE de 96 pipetas:
 - ▶ Use o mesmo pano sem fiapos embebido em Deconex® SOLARSEPT (ou equivalente) para limpar a estrutura da cabeça de 96 pipetas e a parte inferior dos discos de frenagem.
 - ▶ Usando o mesmo pano ou uma tira de pano torcida embebida em Deconex® SOLARSEPT (ou equivalente), limpe em torno das partes laterais dos canais de pipetagem da cabeça de 96 pipetas para limpar os anéis de retenção. Repita esse procedimento para todos os canais de pipetagem da cabeça de 96 pipetas.
- ▶ Aplique o spray Deconex® SOLARSEPT (ou equivalente) nas tampas frontal e lateral e seque.
- ▶ Limpe a fita de proteção de carregamento automático com um pano embebido em Deconex® SOLARSEPT (ou equivalente) e esfregue sem exercer pressão.
- ▶ Quando a plataforma e os componentes estiverem completamente secos, recoloque os suportes.



OBSERVAÇÃO

A manutenção e a limpeza incorretas do ML STAR podem causar contaminação cruzada e um desempenho inadequado do ensaio.

Controle de qualidade

O material de controle com características conhecidas de desempenho pode ser avaliado para a detecção de diferenças no processamento e nos procedimentos técnicos no laboratório.



OBSERVAÇÃO

A execução de uma amostra de referência ou controle sem modelo reduz o número total de amostras maternas desconhecidas que é possível processar com cada kit de preparação de amostras.

Não ultrapasse duas amostras NTC por lote de 24 ou 48 amostras ou quatro amostras NTC por lote de 96 amostras.

Instruções de uso

Dicas e técnicas

A menos que um ponto de interrupção esteja especificado no protocolo, prossiga imediatamente para a etapa seguinte.

Placas com código de barras

- Os códigos de barra para placas de borda inteira começam com PL.
- Os códigos de barra para placas de poços profundos começam com DW.
- Aplique códigos de barras em placas de borda inteira e em placas de poços profundos no lado adjacente à coluna 12.
- Carregue as placas com o código de barras virado para a direita para permitir a leitura automática.

Aplicação e remoção do selo da placa

- ▶ Sempre sele a placa de 96 poços antes das seguintes etapas do protocolo:
 - ▶ Etapas de centrifugação
 - ▶ Etapas de ciclos térmicos
- ▶ Para selar a placa, aplique a tampa adesiva à placa e sele.
- ▶ Antes de retirar o selo:
 - ▶ Centrifugue ligeiramente a placa de 96 poços a 1000 x g durante 20 segundos.
 - ▶ Coloque a placa em uma superfície plana antes de retirar o selo lentamente.

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- ▶ Antes de usar, realize e documente a manutenção necessária de acordo com as instruções do fabricante.
- ▶ Observe o ML STAR durante as etapas automáticas. Monitore os avisos e as instruções do operador na interface do software do Gerenciador de fluxo de trabalho do VeriSeq NIPT v2.
- ▶ Mantenha a tampa frontal no lugar durante a operação.
- ▶ Retire todos os itens da plataforma durante a operação.
- ▶ Durante as etapas do sistema de vácuo na placa, caso solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho do VeriSeq NIPT v2, ajude manualmente a formar a vedação entre a placa e o coletor de vácuo.
- ▶ Deixe o sistema descartar as pontas do adaptador automaticamente. Não retire as pontas manualmente, a menos que solicitado pelo software.
- ▶ Retire os reagentes e os materiais de consumo usados ao ser solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho.
- ▶ Esvazie os recipientes de resíduos de vácuo diariamente. O primeiro recipiente nunca deve ficar mais cheio que a metade. O excesso de resíduos pode danificar a bomba de vácuo e reduzir o vácuo aplicado do sistema.

Processar amostras

Procedimento

- 1 Conclua as seguintes etapas para cada alíquota:
 - a Centrifugue as amostras com código de barras a 1600 x g por 10 minutos a 4 °C com o freio desativado.
 - b Quando a centrífuga parar por completo, remova os tubos de amostras. Após a centrifugação, inicie o isolamento de plasma em até 15 minutos. Se decorrerem mais de 15 minutos, centrifugue novamente.
- 2 Inspeccione cada tubo quanto à adequação da amostra, incluindo a verificação do seguinte:
 - ▶ O volume da amostra é o esperado.
 - ▶ A amostra foi preparada corretamente durante a centrifugação.
 - ▶ O nível do plasma está pelo menos 1,5 ml acima da camada leucoplaquetária.
 - ▶ A amostra não está excessivamente hemolisada (ou seja, o plasma não tem aparência excessivamente vermelha).
 - ▶ A amostra não está lipêmica (ou seja, o plasma não tem aparência branca turva ou leitosa opaca).
 - ▶ A amostra não apresenta coágulos.



CUIDADO

Amostras que foram imprópriamente armazenadas ou manuseadas podem se tornar inadequadas. Se amostras inadequadas forem processadas ao longo do fluxo de trabalho, elas poderão obstruir a placa de ligação durante as extrações, causando eventos de transbordamento das amostras para os poços adjacentes.

- 3 Destampe os tubos e coloque-os nos suportes. Carregue todas as amostras e os controles de plasma para o lote.

Isolar plasma

Preparação

- 1 Etiquete 1 placa de poços profundos como Plasma intermediário e aplique um código de barras.
- 2 Etiquete 1 placa de poços profundos como Plasma final e aplique um código de barras.



CUIDADO

Certifique-se de usar o tipo correto de placa para plasma intermediário e plasma final. O uso de um reservatório de poços profundos em vez de uma placa de poços profundos causa mistura das amostras e pode produzir resultados incorretos.

Procedimento

- 1 Abra o AppLauncher e selecione **VeriSeq NIPT Method** (Método VeriSeq NIPT).
- 2 Insira o ID do lote e o nome de usuário e selecione **OK**.
O ID do lote tem um máximo de 26 caracteres. Use somente números, letras, sublinhados (_) ou traços (-). Por exemplo, 2025-10-16_Lote3.
- 3 Selecione **New Batch** (Novo lote).
- 4 Após o início, selecione **OK** para iniciar o isolamento de plasma.
- 5 Execute uma das seguintes etapas:
 - Para carregar uma planilha de amostras criada anteriormente, selecione a planilha de amostras associada ao lote e selecione **OK**.
 - Para avançar sem selecionar uma planilha de amostras, selecione **No Sample Sheet** (Nenhuma planilha de amostras).

Para obter informações sobre a criação de uma planilha de amostras ou a definição de valores padrão, consulte o *Guia do software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 100000067940)*.



OBSERVAÇÃO

O tipo de amostra, gestação única ou gemelar, deve ser registrado com precisão para cada amostra para garantir a análise adequada dos dados.

Antes de selecionar a opção No Sample Sheet (Nenhuma planilha de amostras), certifique-se de ter definido valores padrão nas ferramentas de serviço do Gerenciador do fluxo de trabalho.

- 6 Selecione o tamanho do lote e selecione **OK**.
- 7 Selecione o número de nenhum controle de modelos (NTCs) e selecione **OK**.



OBSERVAÇÃO

Os slots de NTC sempre são os últimos slots selecionados. Por exemplo, com dois NTCs em uma execução de 24 amostras, as posições 23 e 24 são NTCs.

- 8 Certifique-se de que todos os códigos de barra estejam no lugar e carregue as amostras, pontas e placas (código de barras virado para a direita) no suporte. Selecione **OK** depois de cada solicitação de carga.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|---|------------------|
| 24, 48, 96 | Ponta | 7-12 | Pontas de 1000 µl | 5 |
| | | | Pontas de 1000 µl (somente 96 lotes) | 4, 5 |
| | Tubo | 15 | Tubos de amostras de sangue preparados 1-24 (para lotes de todos os tamanhos) | 1-24 |
| | Tubo | 16 | Tubos de amostras de sangue preparados 25-48 (somente lotes tamanhos 48 e 96) | 25-48 |
| | Tubo | 17 | Tubos de amostras de sangue preparados 49-72 (somente lote tamanho 96) | 49-72 |
| | Tubo | 18 | Tubos de amostras de sangue preparados 73-96 (somente lote tamanho 96) | 73-96 |
| | Multiflex | 19-24 | Placa de poços profundos vazia, Plasma final – com código de barras | 4 |
| | Multiflex | 19-24 | Placa de poços profundos vazia, Plasma intermediário – com código de barras | 5 |
| | Reagente | 47 | [Opcional] Tampão fosfato-salino (DPBS) para nenhum controle de modelos | 5 |

- 9 Certifique-se de que os suportes, o material do laboratório e os reagentes estejam carregados corretamente e selecione **OK** na tela Pre-Spin Deck Verification (Verificação da plataforma de pré-rotação).
- 10 Observe o ML STAR executar as etapas automáticas.
- 11 Quando solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho, certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR esteja livre de obstruções para permitir que o ML STAR descarregue os suportes.
- 12 Selecione **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
- 13 Remova a placa de poços profundos de Plasma intermediário.
 - a Inspeção a placa para verificar a consistência dos volumes em cada poço (sem erros de pipetagem). O volume esperado é 1000 µl.
 - b Anote todas as inconsistências e registre-as quando o procedimento de isolamento do plasma estiver concluído.
 - c Sele a placa, carregue-a de forma equilibrada e centrifugue a 5600 x g por 10 minutos com o freio desativado ou na configuração mais baixa.
- 14 Selecione **Yes** (Sim) para ir para a preparação do plasma final.

15 Remova o selo da placa e recarregue a placa no suporte.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|--|------------------|
| 24, 48, 96 | Multiflex | 19–24 | Placa de poços profundos de plasma intermediário | 5 |

16 Marque a caixa de seleção **Intermediate Plasma plate has been spun** (A placa de plasma intermediário foi girada) e selecione **OK**.

17 Observe o ML STAR executar as etapas automáticas.

18 Quando solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho, certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR esteja livre de obstruções para permitir que o ML STAR descarregue os suportes.

19 Selecione **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.

20 Quando solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho, esvazie os suportes e a plataforma.

21 Remova a placa de poços profundos de Plasma final.

22 Inspeccione a placa quanto a:

- ▶ Volumes consistentes em cada poço. O volume esperado é 900 µl.
- ▶ Sedimentos celulares visíveis.
- ▶ Hemólise excessiva.

Se houver sedimentos celulares anormais ou hemólise em excesso visível, invalide a amostra afetada no final do método de isolamento de plasma ou use o Gerenciador de lote. Para obter mais informações sobre o Gerenciador de lote, consulte o *Guia do software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 100000067940)*.

23 Quando solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho, selecione **OK**.

24 Insira comentários sobre os poços afetados e selecione **OK**.

25 Execute uma das seguintes etapas.

- Para continuar a extração de cfDNA, selecione **Yes** (Sim).
- Para parar, selecione **Exit** (Sair).

PONTO DE INTERRUPÇÃO SEGURO

Se for interromper o procedimento, sele a placa de plasma final e armazene entre 2 °C e 8 °C por no máximo 7 dias.

Extrair cfDNA

Preparação

1 Faça uma inspeção visual nas caixas de extração e acessórios para confirmar que o kit está dentro da validade.

2 Prepare os seguintes reagentes. Etiquete os tubos dos reservatórios e os reservatórios de poços profundos com os nomes dos reagentes.

| Item | Armazenamento | Instruções |
|--|---------------|---|
| Placa de poços profundos de Plasma final | 2 °C a 8 °C | Se tiver sido armazenada anteriormente, deixe repousar durante 30 minutos para atingir a temperatura ambiente. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos. Retire o selo da placa de poços profundos de Plasma final antes de usar. |

3 Adicione lentamente 3,75 ml de solução tampão de proteinase a cada frasco de reagente de proteinase K.

- ▶ Prepare 3 frascos para 24 e 48 amostras.
- ▶ Prepare 4 frascos para 96 amostras.

4 Tampe os frascos de proteinase K e agite até atingir novamente a suspensão.

**CUIDADO**

Não contamine a rolha de borracha. O contato da rolha de borracha com outras substâncias poderá contaminar futuras amostras.

- 5 Junte a proteinase K preparada de todos os frascos em um tubo de reagente e identifique-o como Proteinase K.
- 6 Adicione 100 ml de etanol 100% a cada frasco de reagente de solução tampão de limpeza II.
 - ▶ Prepare 1 frasco para 24 e 48 amostras.
 - ▶ Prepare 2 frascos para 96 amostras.
- 7 Inverta os frascos de solução tampão de limpeza II para misturar.
- 8 Marque as caixas de seleção nos frascos de solução tampão de limpeza II.
- 9 Etiquete 1 nova placa de borda inteira como Intermediária e aplique um código de barras.
- 10 Etiquete 1 nova placa de borda inteira como Eluição de cfDNA e aplique um código de barras.
- 11 Etiquete 1 nova placa de poços profundos como Extração intermediária e aplique um código de barras.
- 12 Aplique um código de barras à placa de ligação de DNA.
- 13 Prepare uma solução de limpeza com etanol 70% (etanol 70%, 30% de água livre de RNase/DNase) para a limpeza do sistema de vácuo.
- 14 Prepare o sistema de vácuo.
 - a Remova o coletor de vácuo e limpe com etanol 70%.
 - b Esvazie o recipiente de resíduos de vácuo.
 - c Certifique-se de que o sistema de vácuo do ML STAR esteja ligado.

Evite limpar a gaxeta com etanol, pois isso pode tornar o material quebradiço.

Procedimento

- 1 Selecione **OK** para iniciar a extração de cfDNA.
- 2 Se o método VeriSeq NIPT ainda não estiver aberto:
 - a Abra o AppLauncher e selecione **VeriSeq NIPT Method** (Método VeriSeq NIPT).
 - b Insira o ID do lote e o nome de usuário e selecione **OK**.
- 3 Carregue as pontas nos suportes das pontas conforme indicado a seguir e selecione **OK**.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|-------------------|------------------|
| 24 | Ponta | 1-6 | Pontas de 1000 µl | 1 |
| | | 7-12 | Pontas de 300 µl | 1 |
| 48 | Ponta | 1-6 | Pontas de 1000 µl | 1, 2 |
| | | 7-12 | Pontas de 300 µl | 1 |
| 96 | Ponta | 1-6 | Pontas de 1000 µl | 1, 2, 3, 4 |
| | | 7-12 | Pontas de 300 µl | 1 |

- 4 Carregue as pontas contadas nos suportes das pontas conforme indicado a seguir.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|-------------------|------------------|
| 24, 48, 96 | Ponta | 49-54 | Pontas de 1000 µl | 1 |
| | | | Pontas de 300 µl | 2 |
| | | | Pontas de 50 µl | 3 |

- 5 Insira o local da primeira e da última ponta para cada rack de pontas e selecione **OK**.

- 6 Faça a leitura dos códigos de barra da caixa de extração.
- 7 Insira o nome do usuário ou as iniciais do preparador do reagente e selecione **OK**.
- 8 Faça a leitura dos códigos de barra da caixa de acessórios.
- 9 Insira o nome do usuário ou as iniciais do preparador do reagente e selecione **OK**.
- 10 Certifique-se de que os códigos de barra estejam no lugar.
- 11 Retire o selo da placa de poços profundos de Plasma final e carregue as placas (com o código de barras virado para a direita) no suporte das placas como mostrado a seguir e selecione **OK**.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|--|------------------|
| 24, 48, 96 | Multiflex | 19–24 | Nova placa de borda inteira, intermediária – com código de barras | 1 |
| | | | Nova placa de borda inteira, eluição de cfDNA – com código de barras | 2 |
| | | | Nova placa de poços profundos, extração intermediária – com código de barras | 4 |
| | | | Placa de poços profundos de Plasma final – com código de barras | 5 |

- 12 Certifique-se de que a placa de ligação de DNA tenha código de barras e selecione **OK**.
- 13 Para lotes parciais de placas, aplique um selo cortado ao longo dos poços não usados (colunas 4-12 para lotes de 24 amostras e colunas 7-12 para lotes de 48 amostras).
- 14 Carregue a placa de ligação de DNA no coletor de vácuo com o código de barras virado para a direita.
- 15 Marque a caixa de seleção **Are DNA Binding Plate Columns Sealed?** (As colunas da placa de ligação de DNA estão seladas?) e selecione **OK**.
- 16 Carregue os tubos de reagentes no suporte de reagentes como mostrado a seguir e selecione **OK**.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|----------------------------|------------------|
| 24, 48 | Reagente | 47 | 16 ml de tampão de eluição | 1 |
| | | | 11 ml de proteinase K | 2 |
| 96 | Reagente | 47 | 16 ml de tampão de eluição | 1 |
| | | | 15 ml de proteinase K | 2 |

- 17 Transfira os reagentes especificados para os reservatórios de poços profundos e carregue os reservatórios nos suportes de poços profundos, como a seguir.
- 18 Selecione **OK**.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|-------------------------------------|------------------|
| 24, 48 | Poço profundo | 39–44 | 125 ml de tampão de limpeza II | 1 |
| | | | 125 ml de tampão de limpeza I | 2 |
| | | | 60 ml de etanol 100% | 3 |
| | | | 100 ml de tampão de lise | 4 |
| | | | 60 ml de água livre de RNase/DNase | 5 |
| 96 | Poço profundo | 39–44 | 200 ml de tampão de limpeza II | 1 |
| | | | 125 ml de tampão de limpeza I | 2 |
| | | | 100 ml de etanol 100% | 3 |
| | | | 100 ml de tampão de lise | 4 |
| | | | 100 ml de água livre de RNase/DNase | 5 |

- 19 Aguarde a conclusão da verificação automática do volume de reagente.

- 20 Confirme se o recipiente de resíduos de vácuo não está acima da metade da capacidade (recomenda-se que esteja vazio) e selecione **OK**.
- 21 Confirme a colocação de todos os suportes, material de laboratório e reagentes e selecione **OK** na tela Extraction Deck Verification (Verificação da plataforma de extração).
- 22 Observe o ML STAR durante as etapas automáticas.

**CUIDADO**

Invalide manualmente os transbordamentos de amostras não detectados pelo sistema antes da contaminação dos poços adjacentes.

- 23 Após a última etapa de vácuo, remova a placa de ligação de DNA e limpe a superfície inferior com etanol 70%.
- 24 Sele os poços descobertos da placa de ligação de DNA e coloque-a na placa de poços profundos de plasma final.
- 25 Centrifugue o conjunto placa de ligação de DNA/placa de plasma final a 5600 x g por 10 minutos com o freio ativado.
- 26 Selecione **OK**.
- 27 Durante a centrifugação da placa de ligação de DNA, conclua a limpeza a vácuo:
 - a Remova o coletor de vácuo e selecione **OK**.
 - b Aguarde a conclusão do descarte automático de resíduos.
 - c Limpe o coletor de vácuo e o interior do sistema de vácuo com etanol 70% e recoloque o coletor de vácuo.
 - d Marque a caixa de seleção **Manifold is on Vacuum** (O coletor está em vácuo) para iniciar a transferência da placa de eluição no coletor de vácuo e selecione **OK**.
- 28 Após a centrifugação, retire os selos dos poços que contêm as amostras da placa de ligação de DNA e coloque-a na parte superior da placa de eluição de cfDNA.
A placa de eluição de cfDNA está no coletor do vácuo.
- 29 Carregue a placa de ligação de DNA com o código de barras virado para a direita e selecione **OK**.
- 30 Observe o ML STAR durante as etapas automáticas.
- 31 Após a incubação, marque a caixa de seleção **Plates are assembled as indicated** (As placas estão montadas conforme indicado) para confirmar que o conjunto placa de ligação de DNA/placa de eluição de cfDNA esteja em uma base de suporte (se solicitado pela centrifuga).
- 32 Sele os poços descobertos da placa de ligação de DNA.
- 33 Centrifugue a 5600 x g por 2 minutos com o freio ativado e selecione **OK**.
- 34 Inspeccione a placa de eluição de cfDNA para verificar a consistência dos volumes em cada poço.
O volume esperado é de aproximadamente 55 µl.
- 35 Sele e retenha a placa de eluição de cfDNA para a preparação da biblioteca.
- 36 Quando solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho, certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR esteja livre de obstruções para permitir que o ML STAR descarregue os suportes.
- 37 Selecione **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
- 38 Descarregue todos os suportes, limpe a plataforma do ML STAR e selecione **OK**.
- 39 Insira comentários sobre os poços afetados e selecione **OK**.
- 40 Execute uma das seguintes etapas:
 - Para continuar a preparar bibliotecas, selecione **Yes** (Sim).
 - Para parar, selecione **Exit** (Sair).

PONTO DE INTERRUÇÃO SEGURO

Se for interromper o procedimento, sele a placa de eluição de cfDNA e armazene entre -25 °C e -15 °C por no máximo 7 dias.

Preparar bibliotecas

Preparação

- 1 Faça uma inspeção visual nas caixas de acessórios e de preparação de bibliotecas para confirmar que os kits estão dentro da validade.
- 2 Prepare os seguintes reagentes. Etiquete os tubos do reservatório e os reservatórios de poços profundos com os nomes dos reagentes.

| Item | Armazenamento | Instruções |
|---|-----------------|--|
| Mistura de reparo de extremidades | -25 °C a -15 °C | Descongele em temperatura ambiente. Agite para misturar. |
| Mistura de poliadenilação | -25 °C a -15 °C | Descongele em temperatura ambiente. Agite para misturar e centrifugue ligeiramente. |
| Mistura de ligação | -25 °C a -15 °C | Descongele em temperatura ambiente. Agite para misturar e centrifugue ligeiramente. |
| Solução tampão de ressuspensão | 2 °C a 8 °C | Agite para misturar. Volte a armazenar após o uso. |
| Solução tampão de hibridização | -25 °C a -15 °C | Descongele em temperatura ambiente. Agite para misturar. Volte a armazenar após o uso. |
| Placa adaptadora de DNA do VeriSeq NIPT | -25 °C a -15 °C | Descongele em temperatura ambiente. Agite para misturar. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos. Aplique um código de barras à placa. |
| Esferas de purificação de amostras | 2 °C a 8 °C | Deixe repousar durante 30 minutos para atingir a temperatura ambiente. Agite vigorosamente antes de cada uso. Misture por agitação ou inversão até que todas as esferas estejam em suspensão e a mistura esteja homogênea. |
| Placa de eluição de cfDNA | -25 °C a -15 °C | Se tiver sido anteriormente armazenada, verifique se a placa não foi armazenada por mais de 7 dias e descongele em temperatura ambiente. Agite a 1500 rpm por 1 minuto. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos. |

- 3 Prepare na hora 50 ml de etanol 80% a partir 40 ml de etanol 100% e 10 ml de água livre de DNase/RNase. Inverta o etanol para misturar.
- 4 Etiquete 1 nova placa de borda inteira como Bibliotecas e aplique um código de barras.
- 5 Certifique-se de que o controle térmico do ML STAR esteja ligado.

Diluir enzimas

- 1 Combine a mistura de poliadenilação (A-Tailing) e a solução tampão de ressuspensão em um tubo com tampa de rosca. Agite para misturar e centrifugue ligeiramente.

| Tamanho do lote da amostra | Mistura de poliadenilação | Solução tampão de ressuspensão |
|----------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| 24, 48 | 900 µl | 1200 µl |
| 96 | 1800 µl | 2400 µl |

- 2 Combine a mistura de ligação e a solução tampão de ressuspensão em um tubo com tampa de rosca. Agite para misturar e centrifugue ligeiramente.

| Tamanho do lote da amostra | Mistura de ligação | Solução tampão de ressuspensão |
|----------------------------|--------------------|--------------------------------|
| 24, 48 | 230 µl | 1713 µl |
| 96 | 440 µl | 3278 µl |

Procedimento

- 1 **Selecione OK** para iniciar a preparação da biblioteca. Se o método VeriSeq NIPT ainda não estiver aberto:
 - a Abra o AppLauncher e selecione **VeriSeq NIPT Method** (Método VeriSeq NIPT).
 - b Insira o ID do lote e o nome do usuário e selecione **OK**.
- 2 Confirme se os seguintes materiais de consumo estão preparados conforme indicado na tela Reagent Preparation (Preparação do reagente):
 - ▶ Mistura de poliadenilação, mistura de ligação e etanol 80%.
 - ▶ Esferas de purificação de amostras, mistura de reparo de extremidades e a Placa adaptadora de DNA do VeriSeq NIPT.
- 3 Marque as caixas de seleção e selecione **OK**.
- 4 Leia os códigos de barras da Caixa de preparação de bibliotecas.
- 5 Insira o nome do usuário ou as iniciais do preparador do reagente e selecione **OK**.
- 6 Faça a leitura dos códigos de barra da Caixa de acessórios.
- 7 Insira o nome do usuário ou as iniciais do preparador do reagente e selecione **OK**.
- 8 Carregue as pontas nos suportes das pontas conforme indicado a seguir e selecione **OK** para cada suporte.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|------------------|------------------|
| 24 | Ponta | 1-6 | Pontas de 50 µl | 1 |
| | | 7-12 | Pontas de 300 µl | 1, 2 |
| 48 | Ponta | 1-6 | Pontas de 50 µl | 1, 2 |
| | | 7-12 | Pontas de 300 µl | 1, 2, 3, 4 |
| 96 | Ponta | 1-6 | Pontas de 50 µl | 1, 2, 3, 4 |
| | | 7-12 | Pontas de 300 µl | 1, 2, 3, 4, 5 |

- 9 Se você tiver interrompido o protocolo após o procedimento de extração de cfDNA, carregue as pontas contadas nos suportes das pontas conforme indicado a seguir.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|-------------------|------------------|
| 24, 48, 96 | Ponta | 49-54 | Pontas de 1000 µl | 1 |
| | | | Pontas de 300 µl | 2 |
| | | | Pontas de 50 µl | 3 |

- 10 Insira o local da primeira ponta para cada rack de pontas e selecione **OK**.
- 11 Certifique-se de que os códigos de barra estejam no lugar e carregue as placas (com o código de barras virado para a direita) no suporte das placas como mostrado a seguir e selecione **OK**.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|---|------------------|
| 24, 48, 96 | Multiflex | 19-24 | Placa de eluição de cfDNA – com código de barras | 1 |
| | | | Placa adaptadora de DNA – com código de barras | 2 |
| | | | Nova placa de borda inteira de 96 poços, bibliotecas – com código de barras | 3 |
| | | | Novas placas de borda inteira de 96 poços | 4, 5 |

12 Carregue o suporte de poços profundos como mostrado a seguir e selecione **OK**.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|---|------------------|
| 24, 48, 96 | Poço profundo | 39–44 | 50 ml de etanol 80% em um reservatório de poços profundos | 1 |
| | | | Novas placas de borda inteira de 96 poços | 2, 3, 4, 5 |

13 Carregue os tubos de reagentes no suporte de reagentes como mostrado a seguir e selecione **OK**.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|--|------------------|
| 24, 48, 96 | Reagente | 47 | 2,5 ml de mistura de reparo de extremidades | 1 |
| | | | Mistura de poliadenilação preparada (volume total) | 2 |
| | | | Mistura de ligação preparada (volume total) | 3 |
| | | | 10 ml de esferas de purificação de amostras | 4 |
| | | | 12 ml de solução tampão de hibridização | 5 |

- 14 Certifique-se de que os suportes, o material do laboratório e os reagentes estejam carregados conforme indicado e selecione **OK** na tela Library Deck Verification (Verificação da plataforma de bibliotecas).
- 15 Aguarde a conclusão da verificação automática do volume de reagente.
- 16 Observe o ML STAR durante as etapas automáticas.
- 17 Quando solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho, certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR esteja livre de obstruções para permitir que o ML STAR descarregue os suportes e selecione **Unload** (Descarregar) para descarregar o suporte.
- 18 Inspeção a placa de bibliotecas para verificar a consistência dos volumes em cada poço.

**CUIDADO**

Se os volumes dos poços forem inconsistentes, as amostras poderão gerar resultados incorretos.

- 19 Se for armazenar, aplique o selo e retenha a placa de bibliotecas.
- 20 Descarregue os suportes, limpe a plataforma e selecione **OK**.
- 21 Insira comentários sobre os poços afetados e selecione **OK**.
- 22 Execute uma das seguintes etapas:
- ▶ Para continuar a quantificar bibliotecas, selecione **Yes** (Sim).
 - ▶ Para parar, selecione **Exit** (Sair).
- 23 A menos que você vá interromper o procedimento, execute imediatamente a quantificação.

PONTO DE INTERRUPÇÃO SEGURA

Se for interromper o procedimento, sele a placa de bibliotecas antes do armazenamento. A placa de bibliotecas permanece estável por até 7 dias a partir da data de preparação entre -25 °C e -15 °C.

Quantificar bibliotecas

Preparação

1 Prepare os seguintes reagentes:

| Item | Armazenamento | Instruções |
|----------------------------------|-----------------|---|
| Reagente de quantificação de DNA | 2 °C a 8 °C | Proteja da luz. Descongele em temperatura ambiente durante 30-150 minutos. (É recomendável remover o reagente no início do procedimento de preparar bibliotecas.) Agite para misturar e centrifugue ligeiramente. |
| Padrão de quantificação de DNA | 2 °C a 8 °C | Agite para misturar e centrifugue ligeiramente. |
| Placa de bibliotecas | -25 °C a -15 °C | Se tiver sido anteriormente armazenada, confirme que a placa não foi armazenada por mais de 7 dias e descongele em temperatura ambiente. Agite para misturar. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos. |
| Solução tampão de ressuspensão | 2 °C a 8 °C | Agite para misturar. |

- 2 Ligue o fluorômetro 10 minutos antes de usar.
- 3 Aplique um código de barras a uma nova placa de 384 poços.
- 4 Aplique um código de barras a uma nova placa de borda inteira.

Procedimento

- 1 Selecione **OK** para iniciar a quantificação.
- 2 Se o método VeriSeq NIPT ainda não estiver aberto:
 - a Abra o AppLauncher e selecione **VeriSeq NIPT Method** (Método VeriSeq NIPT).
 - b Insira o ID do lote e o nome do usuário e selecione **OK**.
- 3 Faça a leitura dos códigos de barra da caixa de acessórios.
- 4 Insira o nome do usuário ou as iniciais do preparador do reagente e selecione **OK**.
- 5 Carregue as pontas nos suportes das pontas conforme indicado a seguir e selecione **OK**.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|--------------------------|------------------|
| 24, 48 | Ponta | 1-6 | Rack de pontas de 300 µl | 1 |
| | | | Rack de pontas de 50 µl | 2 |
| 96 | Ponta | 1-6 | Rack de pontas de 300 µl | 1 |
| | | | Rack de pontas de 50 µl | 2, 3 |

- 6 Certifique-se de que os códigos de barra estejam no lugar e, se necessário, retire o selo da placa de bibliotecas.
- 7 Carregue as placas (com o código de barras virado para a direita) no suporte Multiflex conforme indicado a seguir e selecione **OK**.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|--|------------------|
| 24, 48, 96 | Multiflex | 19–24 | Novas placas de borda inteira – com código de barras | 1 |
| | | | Nova placa de 384 poços – com código de barras | 2 |
| | | | Placa de bibliotecas – com código de barras | 3 |
| | | | Novas placas de borda inteira de 96 poços | 4, 5 |

- 8 Carregue os tubos de reagentes sem as tampas no suporte dos tubos como indicado a seguir e selecione **OK**.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|----------------------------------|------------------|
| 24, 48, 96 | Tubo | 46 | Padrão de quantificação de DNA | 1 |
| | | | Reagente de quantificação de DNA | 2 |

- 9 Carregue os tubos de reagentes no suporte de reagentes como mostrado a seguir e selecione **OK**.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|---------------------------------|------------------|
| 24, 48, 96 | Reagente | 47 | Tubo de reagente novo (vazio) | 1 |
| | | | 16 ml de tampão de ressuspensão | 2 |

- 10 Se você tiver interrompido o protocolo após o procedimento de preparação da biblioteca, carregue as pontas contadas nos suportes das pontas conforme indicado a seguir.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|-------------------|------------------|
| 24, 48, 96 | Ponta | 49–54 | Pontas de 1000 µl | 1 |
| | | | Pontas de 300 µl | 2 |
| | | | Pontas de 50 µl | 3 |

- 11 Insira o local da primeira e da última ponta para cada rack de pontas e selecione **OK**.
- 12 Certifique-se de que os suportes, o material do laboratório e os reagentes estejam carregados conforme indicado e selecione **OK** na tela Quant Deck Verification (Verificação da plataforma de quantificação).
- 13 Aguarde a conclusão da verificação automática do volume de reagente.
- 14 Observe o ML STAR durante as etapas automáticas.
- 15 Quando solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho, certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR esteja livre de obstruções para permitir que o ML STAR descarregue os suportes.
- 16 Selecione **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
- 17 Descarregue a placa de bibliotecas.
- Inspeção a placa para verificar a consistência dos volumes em cada poço.
 - Selecione a placa de bibliotecas e armazene em temperatura ambiente até que a análise de dados fluorométricos esteja concluída.
- 18 Descarregue as placas de 96 poços restantes e verifique a consistência dos volumes em cada poço. Erros relevantes no volume podem indicar um problema nas etapas de pipetagem.

- 19 Descarregue a placa de 384 poços e verifique se existe líquido nos poços adequados.
- 20 Coloque um selo de alumínio na placa.
- 21 Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos.
- 22 Incube em temperatura ambiente durante 10 minutos, ao abrigo da luz.
- 23 Descarregue todos os suportes, limpe a plataforma do ML STAR e selecione **OK**.



OBSERVAÇÃO

Não descarte os reagentes de quantificação até que os dados sejam obtidos. Você ainda precisará dos reagentes se tiver de executar uma requantificação.

- 24 Após a incubação, remova o selo de alumínio e coloque a placa de 384 poços no leitor de microplacas. Certifique-se de que A1 esteja no canto superior esquerdo ao carregar.
- 25 Clique duas vezes no modelo do VeriSeq NIPT para abri-lo no SoftMax Pro.
- 26 Selecione **New Experiment** (Novo experimento) na guia Home (Página inicial).
- 27 Selecione **Read** (Ler).
- 28 Exporte os dados como XML, como a seguir:
 - a Clique com o botão direito em **Plate** (Placa) e selecione **Rename** (Renomear).
 - b Leia o código de barras da placa de Quantificação e selecione **OK**.
 - c No canto superior esquerdo da tela, selecione o ícone da placa e selecione **Export** (Exportar) no menu.
 - d Marque a caixa de seleção **Expt name** (Nome da exportação), defina a opção de dados da placa como brutos, defina o formato de saída como XML e selecione **OK**.
 - e Defina o caminho e o nome do arquivo de saída e selecione **Save** (Salvar).

O computador Hamilton deve ser capaz de acessar o local do arquivo. Não use espaços no nome ou no caminho do arquivo.

Análise

- 1 No Gerenciador de fluxo de trabalho, na tela Scanner Information (Informações do scanner), insira o ID do fluorômetro.
- 2 Insira comentários sobre a execução do fluorômetro e selecione **OK**.
- 3 Navegue até o arquivo de quantificação XML que contém os dados fluorométricos e selecione **OK**.
- 4 Examine a curva padrão e os resultados da análise de concentração da amostra e selecione **OK**.
- 5 Se for necessário repetir o ensaio da placa, selecione **Rescan** (Repetir análise).
As amostras são sensíveis ao tempo e à luz. Quando necessário, repita a análise imediatamente.
- 6 Insira comentários sobre os poços afetados e selecione **OK**.
- 7 Avalie os resultados e continue conforme indicado a seguir.
 - Se os resultados forem aprovados dentro da especificação, avance para as bibliotecas de pool. Para conhecer as especificações, consulte a tabela de métricas e limites do CQ para quantificação no *Guia do software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)*.
 - Se os resultados não forem aprovados segundo as especificações, o sistema abortará o método. Repita os procedimentos de quantificação, começando pela *Preparação na página 23*.
- 8 Execute uma das seguintes ações:
 - Para continuar o pooling de bibliotecas, selecione **Yes** (Sim).
 - Para parar, selecione **Exit** (Sair).

PONTO DE INTERRUÇÃO SEGURA

Se for interromper o procedimento, sele a placa de bibliotecas antes do armazenamento. A placa de bibliotecas permanece estável por até 7 dias de armazenamento acumulativo entre -25 °C e -15 °C.

Bibliotecas de pool

Preparação

1 Prepare os seguintes reagentes:

| Item | Armazenamento | Instruções |
|--------------------------------|-----------------|--|
| Solução tampão de hibridização | -25 °C a -15 °C | Descongele em temperatura ambiente. Agite para misturar. Volte a armazenar após o uso. |
| Placa de bibliotecas | -25 °C a -15 °C | Se tiver sido anteriormente armazenada, descongele em temperatura ambiente. Agite a 1500 rpm por 1 minuto. Centrifugue a 1000 x g durante 20 segundos. |

- 2 Etiquete um tubo de pooling vazio como Pool A. Para 96 amostras, etiquete um segundo tubo de pooling vazio como Pool B.
- 3 Guarde o seguinte programa de desnaturação no termociclador com uma tampa aquecida
 - a Escolha a opção de tampa preaquecida e ajuste em 102 °C.
 - b Defina o volume da reação em 50 µl.
 - c Defina a taxa de aumento no máximo (≥ 2 °C por segundo).
 - d Incube a 96 °C por 10 minutos e, depois, a 4 °C por 5 segundos.
 - e Mantenha a 4 °C.

Procedimento

- 1 Coloque a placa de bibliotecas no termociclador pré-programado e execute o programa de desnaturação.



OBSERVAÇÃO

Não desnature a placa de bibliotecas antes que a quantificação tenha sido aprovada pelas métricas de CQ, pois pode ser necessário repetir a quantificação.

- 2 Centrifugue a placa de bibliotecas a 1000 x g durante 20 segundos.
- 3 Selecione **OK** no Gerenciador de fluxo de trabalho para iniciar o pooling de bibliotecas.
- 4 Se o método VeriSeq NIPT ainda não estiver aberto:
 - a Abra o AppLauncher e selecione **VeriSeq NIPT Method** (Método VeriSeq NIPT).
 - b Insira o ID do lote e o nome de usuário e selecione **OK**.
- 5 Selecione a concentração do pool e selecione **OK**.
Se necessário, ajuste a concentração do pooling para atingir a densidade de cluster de 220–260 k/mm².
- 6 Se solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho, execute uma das seguintes etapas:
 - ▶ Para carregar uma planilha de amostras, selecione a planilha de amostras associada ao lote e selecione **Load** (Carregar).
 - ▶ Para usar valores padrão do sistema para os tipos de amostra remanescentes, informações sobre o sexo ou tipo de triagem, selecione **Use Default** (Usar padrão) para cada definição.
Para obter informações sobre a criação de uma planilha de amostras, consulte o *Guia do software VeriSeq NIPT Solution v2* (documento n.º 1000000067940).



CUIDADO

Antes de selecionar a opção Use Default (Usar padrão), certifique-se de ter definido valores padrão nas ferramentas de serviço do Gerenciador do fluxo de trabalho. Se isso não for feito, poderá ocorrer uma análise incompleta das amostras.

- 7 Selecione **Start** (Iniciar) para iniciar o temporizador da placa de desnaturação.
 8 Carregue as pontas nos suportes das pontas conforme indicado a seguir.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|---------------------------|------------------|
| 24, 48, 96 | Ponta | 7-12 | Pontas de filtro de 50 µl | 1 |

- 9 Carregue a placa de biblioteca desnaturada (com o código de barras virado para a direita) no suporte Multiflex conforme indicado a seguir e selecione **OK**.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|--|------------------|
| 24, 48, 96 | Multiflex | 19-24 | Placa de biblioteca desnaturada (com código de barras) | 1 |

- 10 Carregue os tubos de pooling no suporte dos tubos como indicado a seguir e selecione **OK**.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|---------------------------|------------------|
| 24, 48 | Tubo | 46 | Novo tubo de 2 ml, Pool A | 1 |
| 96 | Tubo | 46 | Novo tubo de 2 ml, Pool A | 1 |
| | | | Novo tubo de 2 ml, Pool B | 2 |

- 11 Carregue os tubos de reagentes no suporte de reagentes como mostrado a seguir e selecione **OK**.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|--|------------------|
| 24, 48, 96 | Reagente | 47 | 3 ml de solução tampão de hibridização | 1 |

- 12 Carregue as pontas nos suportes das pontas conforme indicado a seguir.

| Tamanho do lote da amostra | Tipo de suporte | Trilha | Item | Posição no local |
|----------------------------|-----------------|--------|-----------------------------|------------------|
| 24, 48, 96 | Ponta | 49-54 | Pontas de filtro de 1000 µl | 1 |
| | | | Pontas de filtro de 300 µl | 2 |
| | | | Pontas de filtro de 50 µl | 3 |

- 13 Insira o local da primeira e da última ponta para cada rack de pontas e selecione **OK**.
 14 Certifique-se de que os suportes, o material do laboratório e os reagentes estejam carregados conforme indicado e selecione **OK** na tela Pooling Deck Verification (Verificação da plataforma de pooling).
 15 Observe o ML STAR durante as etapas automáticas.
 16 Insira comentários sobre os poços afetados e selecione **OK**.
 17 Quando solicitado pelo Gerenciador de fluxo de trabalho, certifique-se de que a plataforma de carregamento do ML STAR esteja livre de obstruções para permitir que o ML STAR descarregue os suportes.
 18 Selecione **Unload** (Descarregar) para descarregar a plataforma.
 19 Descarregue o suporte dos tubos.
 20 Tampe cada tubo de pooling, agite e centrifugue rapidamente.
 21 Selecione **OK**.
 22 Faça o sequenciamento das bibliotecas logo depois do pooling. Se necessário, sele a placa de bibliotecas e armazene-a entre -25 °C e -15 °C por até 7 dias para permitir a repetição do pooling.

PONTO DE INTERRUPÇÃO SEGURA

Se for interromper o procedimento, tampe os tubos de pooling e armazene entre -25 °C e -15 °C por no máximo 7 dias.

Preparar bibliotecas de pool para sequenciamento

Preparação

1 Prepare os seguintes reagentes:

| Item | Armazenamento | Instruções |
|---------------|-----------------|---|
| Tubos de pool | -25 °C a -15 °C | Se tiver sido anteriormente armazenado, descongele em temperatura ambiente. Agite ligeiramente. Centrifugue ligeiramente. |

2 Prepare o sistema de sequenciamento de última geração preenchendo os seguintes campos no módulo VeriSeq NIPT Local Run Manager:

- a Nome da execução
- b Descrição da execução (opcional)
- c Código de barras do pool

Para obter mais informações sobre o uso do módulo VeriSeq NIPT Local Run Manager, consulte o *Guia do software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)*.



CUIDADO

O código de barras do pool inserido no módulo Local Run Manager deve corresponder ao código de barras do pool inserido no Gerenciador de fluxo de trabalho. Configurações incorretas de execuções são rejeitadas pelo software de análise, podendo ser necessária a repetição do sequenciamento.

O processo a seguir descreve o carregamento adequado das bibliotecas de pool em um instrumento de sequenciamento de última geração à base de cartuchos.

Procedimento

- 1 Adicione os seguintes materiais de consumo ao cartucho de reagente e pipeta para misturar.
 - ▶ 900 µl de solução tampão de hibridização
 - ▶ 450 µl do Pool A
- 2 Faça o sequenciamento em um sistema de sequenciamento de última geração.

Para obter instruções sobre sequenciamento, consulte o guia de referência do seu instrumento de sequenciamento de última geração. Para o NextSeq 550Dx, consulte o *Guia de referência do instrumento NextSeq 550Dx (documento n.º 1000000009513)* ou o *Folheto informativo do instrumento NextSeq 550Dx (documento n.º 1000000043133)*.
- 3 Se necessário, repita esse procedimento para o Pool B.
 - ▶ Para alcançar a faixa de densidade de cluster pretendida, o pool da placa de bibliotecas pode ser repetido com uma diferente concentração de pooling no Hamilton. A repetição do pool invalida o pool original.
 - ▶ Como alternativa, a relação pool/HT1 (450+900 ul) pode ser modificada para atingir a faixa de densidade de cluster pretendida.

Sequenciamento de última geração

O VeriSeq NIPT Solution v2 pode ser usado com um sequenciador de última geração com as seguintes especificações:

- ▶ capacidade de 2x36 leituras tipo paired-end.
- ▶ compatível com adaptadores de índice do kit VeriSeq NIPT Sample Prep.
- ▶ química de dois canais.
- ▶ produção automática de arquivos BCL (dados brutos do instrumento de sequenciamento)

- ▶ 400 milhões de leituras do tipo paired-end por execução.
 - ▶ compatível com o VeriSeq NIPT Assay Software v2
- O NextSeq 550Dx é compatível com o VeriSeq NIPT Solution v2.

Análise de dados da sequência

Após a conclusão do sequenciamento, os dados do sequenciamento são automaticamente enviados ao VeriSeq NIPT Assay Software v2 para análise e geração de relatórios. O relatório inclui classificações para cada tipo de amostra do lote, além de uma avaliação das métricas de CQ de todas as execuções. O processo de análise desde a conclusão do sequenciamento até os resultados finais demora aproximadamente 4 horas para um lote de 48 amostras. Para obter informações detalhadas sobre a análise de dados e o arquivo de saída, consulte o *Guia do software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)*.

Interpretação dos resultados

O algoritmo do VeriSeq NIPT Solution v2 emprega um sofisticado modelo estatístico que combina vários tipos diferentes de informações baseadas na coleta de fragmentos de bibliotecas com sequenciamento tipo paired-end. Esse modelo é usado para detectar regiões do genoma que são sub-representadas ou sobre-representadas na biblioteca de cada amostra. É importante observar que esse modelo considera se o grau de sub-representação ou sobre-representação é quantitativamente consistente com um evento de aneuploidia no genoma fetal no nível da fração fetal estimada para a biblioteca.

Para todos os cromossomos, os dados do sequenciamento tipo paired-end são alinhados com o genoma de referência (HG19). Leituras alinhadas não duplicadas exclusivas são agregadas em subconjuntos de 100 kb. As contagens de subconjuntos correspondentes são ajustadas para tendência de GC e de acordo com a cobertura genômica específica da região estabelecida anteriormente. Usando essas contagens de subconjuntos normalizadas, são gerados escores estatísticos para cada autossomo pela comparação das regiões de cobertura que podem ser afetadas por aneuploidias com o restante dos autossomos. É computada uma razão logarítmica de verossimilhança (LLR) para cada amostra ao serem levados em consideração esses escores baseados na cobertura e a fração fetal estimada. A LLR é a probabilidade de uma amostra ser afetada tendo em conta a cobertura observada e a fração fetal versus a probabilidade de uma amostra não ser afetada dada a mesma cobertura observada. O cálculo dessa relação também considera a incerteza estimada da fração fetal. Para cálculos subsequentes, é utilizado o logaritmo natural da relação. O software de ensaio avalia a LLR para cada cromossomo-alvo e cada amostra para fornecer uma determinação de aneuploidia.

Durante a criação do lote, você deve definir o tipo de amostra (gestação única ou gemelar), o tipo de triagem (básica ou genômica ampla) e as informações do sexo (Sim, Não, ACS) para cada amostra. Em conjunto, essas opções determinam as informações relatadas para cada amostra.

Para todos os tipos de amostra, o tipo de triagem determina quais anomalias autossômicas são relatadas. Para a triagem básica, são relatados somente eventos de trissomia de cromossomos inteiros envolvendo os cromossomos 13, 18 e 21. Para a triagem genômica ampla, são relatadas deleções ou duplicações completas ou parciais de qualquer cromossomo autossômico. O comprimento da menor deleção ou duplicação parcial cromossômica relatável é de 7 Mb.

Para amostras de gestação única, é possível desativar as informações do cromossomo sexual. Você também pode configurar o relato de aneuploidias do cromossomo sexual informando ou não o sexo de amostras euploides.

Para amostras de gestações gemelares, se for selecionado Yes (Sim) para as informações do cromossomo sexual, o resultado será limitado ao relato da presença ou ausência de um cromossomo Y na biblioteca. A aneuploidia do cromossomo sexual não pode ser informada para amostras de gestações gemelares.

Um resultado ANOMALY DETECTED (ANOMALIA DETECTADA) indica que a amostra é positiva para uma ou mais anomalias consistentes com o tipo selecionado de triagem e opção de informação do cromossomo sexual. Quando uma anomalia é detectada, o relato fornece uma descrição da anomalia em notação citogenética.

O VeriSeq NIPT Assay Software v2 usa dados estatísticos gerados durante o sequenciamento para fornecer uma estimativa da fração fetal (EFF) para cada amostra. A EFF é o componente fetal estimado do cfDNA que é recuperado pelo ensaio e relatado como percentual arredondado para cada amostra. O desvio padrão médio dessa estimativa em todas as amostras é de 1,3%. A EFF não deve ser usada isoladamente para excluir amostras no relato dos resultados.

Para fazer identificações da representação cromossômica, o VeriSeq NIPT Assay Software v2 usa o Teste individualizado de confiança de aneuploidia fetal (iFACT), uma métrica dinâmica de limite que indica se o sistema gerou uma cobertura de sequenciamento suficiente, considerando a estimativa da fração fetal para cada amostra. Identificações negativas só são relatadas se a amostra está dentro do limite do iFACT. Se uma amostra não atinge esse limite, a avaliação de CQ exibe FAILED iFACT (FALHA NO iFACT) e o sistema não gera qualquer resultado.

Além do iFACT, o VeriSeq NIPT Assay Software v2 avalia diversas outras métricas de CQ durante a análise. As métricas adicionais incluem avaliações da uniformidade da cobertura em regiões genômicas de referência e a distribuição dos comprimentos dos fragmentos de cfDNA. A avaliação de CQ exibe um alerta de CQ ou uma falha de CQ para qualquer métrica que estiver fora do intervalo aceitável. No caso de falha de CQ, o sistema não gera qualquer resultado para a amostra. Se uma amostra não passar no CQ, ela poderá ser reprocessada caso exista um volume de plasma suficiente no tubo de coleta de sangue.

O VeriSeq NIPT Solution v2 gera dados para uso em um relatório final. Ele não gera um relatório final para o paciente. Os clientes são responsáveis pela criação e conteúdo do relatório final a ser entregue ao médico do local de atendimento. A Illumina não é responsável pela exatidão do texto do relatório final para os clientes.



CUIDADO

Verifique as estimativas da fração fetal de todas as amostras. Se as estimativas da fração fetal forem similares para todas as amostras de uma execução, significa que poderá ter ocorrido mistura das amostras, afetando os resultados. Entre em contato com o suporte técnico da Illumina para ajudar na solução do problema.

Características de desempenho

Os seguintes dados descritos nas seções de desempenho clínico e desempenho analítico foram gerados com os protocolos e os materiais descritos nas Instruções de uso, começando pelo plasma. Todos os dados de sequenciamento desta seção foram gerados em um sistema de sequenciamento NextSeq 500/550 ou em um sistema de sequenciamento NextSeq 550Dx com as seguintes configurações:

| | NextSeq 500/550 | NextSeq 550Dx |
|----------------------------|--|--|
| Software no instrumento | NextSeq Control Software 4.0 | NextSeq Operating Software 1.3 |
| Versão de kit de reagentes | Kit de reagentes de alta produção NextSeq 500/550 v2.5 (75 ciclos) | Kit de reagentes de alta produção NextSeq 550Dx v2.5 (75 ciclos) |
| Método de sequenciamento | Execução de sequenciamento tipo paired-end 2x36 em modo de alta produção | Execução de sequenciamento tipo paired-end 2x36 em modo de alta produção |

Estudo clínico

A precisão clínica do VeriSeq NIPT Solution v2 foi demonstrada pela avaliação de amostras de plasma de mulheres com gestações únicas e gestações gemelares. As amostras foram obtidas de amostras de plasma armazenadas não identificadas previamente processadas com base em sangue total periférico. Mais de 45.000 amostras foram consideradas para inclusão no estudo. Essas amostras foram previamente submetidas a uma triagem pré-natal para a detecção de aneuploidias cromossômicas fetais e deleções e duplicações parciais de 7 Mb ou mais. Todas as amostras de gestações afetadas e um subgrupo de amostras consecutivas de

gestações não afetadas foram qualificados para os testes no caso de os desfechos clínicos estarem disponíveis e os critérios das amostras serem cumpridos. Um total de 2.335 amostras compôs o grupo de análise do teste. Desse grupo, 2.328 amostras foram de gestações únicas e sete amostras de gestações gemelares.

Dessas amostras, 28 (1,2%, 28/2335) não passaram no CQ do ensaio na primeira passagem durante a análise dos dados de sequenciamento concluídos:

- 27 falhas no iFACT (Teste individualizado de confiança de aneuploidia fetal) (1 XO, 26 não afetadas)
- Uma falha em dados fora do intervalo esperado

Dados demográficos e características da gravidez

A idade materna, a idade gestacional e o trimestre da gravidez são resumidos na [Tabela 7](#) para as amostras da triagem genômica ampla, incluindo amostras de mosaicos conhecidos.

Os dados demográficos foram avaliados entre as coortes básica e genômica ampla e não mostraram diferença estatística. Os dados demográficos e as características da gravidez foram similares incluindo ou excluindo os mosaicos conhecidos.

Tabela 7 Dados demográficos e características da gravidez

| Estatística do resumo | Triagem genômica ampla (incluindo mosaicos conhecidos) |
|--|---|
| Número de amostras | 2307* |
| Idade materna – anos | |
| Média | 35,08 |
| Desvio padrão | 4,04 |
| Mediana | 34,95 |
| 25º percentil, 75º percentil | 32,31, 37,79 |
| Mínimo, máximo | 20,22, 53,02 |
| Idade gestacional na coleta de sangue - semanas | |
| Média | 10,93 |
| Desvio padrão | 1,20 |
| Mediana | 10,57 |
| 25º percentil, 75º percentil | 10,29, 11,14 |
| Mínimo, máximo | 10,00, 27,86 |
| Trimestre da gravidez – n (%) | |
| <Primeiro (<14 semanas) | 2.252 (98%) |
| Segundo | 54 (2%) |
| Terceiro (≥27 semanas) | 1 (0%) |

* As amostras finais apresentadas continham 7 gêmeos.

Desempenho clínico

Os resultados identificados pelo VeriSeq NIPT Solution v2 foram comparados com os resultados do padrão de referência clínica. Todas as amostras do estudo apresentaram os resultados do padrão de referência clínica (verdade clínica) relacionados com a condição de aneuploidia cromossômica fetal e deleções e duplicações parciais de 7 Mb ou mais. O resultado do padrão de referência clínica para as amostras incluídas neste estudo dependeram dos resultados da análise cromossômica ou de um exame físico no neonato com uma triagem negativa do NIPT baseado em NGS. Uma equipe treinada do estudo realizou a classificação dos dados padrão de referência clínica de acordo com o documento Medical Coding do patrocinador.

Os métodos de análise cromossômica incluíram cariotipagem, hibridização in situ por fluorescência (FISH) ou hibridização genômica comparativa por microarray (CMA). A análise cromossômica foi realizada em amostras de sangue periférico ou de saliva, produtos de concepção (POC), amniócitos, vilosidades coriônicas, tecidos placentários ou sangue pós-natal do cordão umbilical de neonatos ou lactentes.

Mosaïcismo é definido como a presença de duas ou mais linhagens celulares de diferentes composições cromossômicas em um indivíduo. As linhagens celulares se originam do mesmo zigoto. O tipo e o nível de mosaïcismo variam e dependem do momento dos eventos de mosaïcismo durante a embriogênese e o desenvolvimento fetal. Diferentes tipos de mosaïcismo ocorrem nos diagnósticos pré-natais, dependendo da distribuição das linhagens celulares anormais e normais no citotrofoblasto, no mesênquima ou no feto.¹⁰ Embora possa ser observado mosaïcismo com qualquer anomalia cromossômica, a prevalência de mosaïcismo em trissomias raras é mais alta do que nas trissomias dos cromossomos 21, 18 e 13 (T21, T18 e T13).¹¹ Na avaliação do desempenho, os casos de mosaïcismo foram incluídos na análise genômica ampla, pois a finalidade deste tipo de triagem para este ensaio é detectar RAA.

Desempenho da triagem básica

Para a triagem básica, as anomalias incluem T21, T18 e T13. Um total de 2.243 amostras de gestações únicas e de gestações gemelares foi incluído na análise. Todas as sete gestações gemelares foram corretamente detectadas como T21 e não são informadas na tabela a seguir.

Tabela 8 Sensibilidade e especificidade do VeriSeq NIPT Solution v2 para a detecção de trissomias 21, 18, e 13 em uma triagem básica de gestações únicas (excluindo mosaicos conhecidos)

| | T21 | T18 | T13 |
|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Sensibilidade | >99,9% (130/130) | >99,9% (41/41) | >99,9% (26/26) |
| IC de dois lados de 95% | 97,1%, 100% | 91,4%, 100% | 87,1%, 100% |
| Especificidade | 99,90% (1982/1984) | 99,90% (1995/1997) | 99,90% (2000/2002) |
| IC de dois lados de 95% | 99,63%, 99,97% | 99,64%, 99,97% | 99,64%, 99,97% |

O desempenho do ensaio na triagem básica mostrado na Tabela 8 é calculado excluindo-se um subgrupo de 64 amostras afetadas por RAAs, deleções ou duplicações autossômicas parciais ou mosaïcismo conhecido. Essas 64 amostras incluíram oito mosaicos T21 e três mosaicos T18. Cinco dessas 11 amostras foram identificadas como afetadas pela anomalia detectada pelo VeriSeq NIPT Assay Software v2.

Desempenho da triagem genômica ampla

Para a triagem genômica ampla, as anomalias incluem trissomias, monossomias e deleções ou duplicações parciais de 7 Mb ou mais. A triagem genômica ampla continha 36 amostras com mosaïcismo conhecido. Foi testado um total de 2.307 amostras de gestações únicas e de gestações gemelares. Todas as sete gestações gemelares foram corretamente detectadas como portadoras de uma anomalia do cromossomo 21 e não são informadas nas tabelas a seguir.

Desempenho da triagem genômica ampla para qualquer anomalia

Tabela 9 Sensibilidade e especificidade do VeriSeq NIPT Solution v2 para a detecção de qualquer anomalia na triagem genômica ampla (incluindo mosaicos conhecidos)

| | Sensibilidade | Especificidade |
|-------------------------|-----------------|--------------------|
| % estimado (n/N) | 95,5% (318/333) | 99,34% (1954/1967) |
| IC de dois lados de 95% | 92,7%, 97,3% | 98,87%, 99,61% |

Desempenho da triagem genômica ampla para aneuploidia autossômica rara

Tabela 10 Sensibilidade e especificidade do VeriSeq NIPT Solution v2 para aneuploidia autossômica rara (RAA) na triagem genômica ampla (incluindo mosaicos conhecidos)

| | Sensibilidade | Especificidade |
|-------------------------|---------------|--------------------|
| % estimado (n/N) | 96,4% (27/28) | 99,80% (2001/2005) |
| IC de dois lados de 95% | 82,3%, 99,4% | 99,49%, 99,92% |

Desempenho da triagem genômica ampla para deleções e duplicações parciais

Tabela 11 Sensibilidade e especificidade do VeriSeq NIPT Solution v2 para deleções e duplicações parciais de 7 Mb ou mais na triagem genômica ampla (incluindo mosaicos conhecidos)

| | Sensibilidade | Especificidade |
|-------------------------|---------------|--------------------|
| % estimado (n/N) | 74,1% (20/27) | 99,80% (2000/2004) |
| IC de dois lados de 95% | 55,3%, 86,8% | 99,49%, 99,92% |

Diferenças no desempenho das triagens básica e genômica ampla

A metodologia de pontuação para trissomias comuns e aneuploidias do cromossomo sexual é a mesma para as triagens básica e genômica. A triagem básica só aplica o algoritmo a T21, T18 e T13. Entretanto, a triagem genômica ampla expande essa metodologia para avaliar todas as trissomias e RAAs e duplicações e deleções parciais.

Existem duas diferenças entre o relatório de desempenho descrito entre as triagens básica e genômica ampla. Em primeiro lugar, na triagem genômica ampla, amostras sem mosaicismo comprovado para trissomias comuns e para RAAs e deleções e duplicações parciais foram incluídas para a métrica do desempenho. Em segundo lugar, a triagem genômica ampla pode, preferivelmente, relatar a detecção de uma duplicação ou deleção parcial em uma trissomia completa. A presença de uma trissomia completa, além de uma duplicação ou deleção parcial, pode ser observada referenciando-se a pontuação de LLR indicada no relatório suplementar.

Inclusão de mosaicos na triagem genômica ampla

O mosaicismo é listado como uma limitação deste ensaio. Na presença de mosaicismo, o sinal fetal de uma anomalia é reduzido e pode, portanto, ser de detecção mais difícil sem comprometer a especificidade global do ensaio. Entretanto, uma vez que o mosaicismo é mais relevante para conteúdo expandido, amostras com mosaicismo foram incluídas na triagem genômica ampla.

Das 64 amostras incluídas na triagem genômica ampla, mas não na triagem básica, foi identificado que 36 amostras apresentavam mosaicismo, segundo o padrão de referência clínica. Dessas 36 amostras, 23 identificações corresponderam ao padrão de referência clínica.

Deleção ou duplicação parcial versus detecção de aneuploidia de cromossomos inteiros

O VeriSeq NIPT Solution v2 apresenta opções de menu para triagem básica e triagem genômica ampla. Na triagem básica, o resultado ANOMALY DETECTED (ANOMALIA DETECTADA) só é informado quando uma aneuploidia completa é detectada nos cromossomos 21, 18 ou 13 e quando todas as métricas de controle de qualidade são cumpridas. Na triagem genômica ampla, o sistema detecta aneuploidia em todos os autossomos e eventos de deleção e duplicação parcial de, pelo menos, 7 Mb.

Enquanto usa a triagem genômica ampla, o sistema dá precedência, em termos de informações, a eventos de deleção ou duplicação parcial com relação à identificação de cromossomos inteiros se o tamanho da deleção ou duplicação parcial abrange um percentual menor ou igual a 75% do cromossomo em que o evento é detectado. Se a região detectada de deleção ou duplicação parcial é maior do que 75% do tamanho do cromossomo, o evento é relatado como trissomia ou monossomia completa de todo o cromossomo. Portanto, deleções e duplicações substancialmente grandes com menos de 75% do tamanho do cromossomo podem ser indicativas de aneuploidia de um cromossomo inteiro.

Em todas as amostras, o escore da LLR para a classificação de cromossomos inteiros está disponível no relatório suplementar. O escore da LLR deve ser analisado com relação ao corte especificado na [Figura 2 na página 42](#) antes da interpretação do resultado. Escores da LLR no nível do cromossomo que ultrapassam o corte fornecem suporte adicional para uma interpretação consistente com uma aneuploidia do cromossomo inteiro.

No estudo clínico, houve duas amostras de gestações únicas com duplicações substancialmente grandes (uma no cromossomo 21 e outra no cromossomo 18) que eram significativamente menores do que 75% do tamanho relativo do cromossomo (consulte a [Tabela 12](#)). Ambos os eventos foram relatados como duplicações parciais em vez de uma trissomia completa para esse cromossomo. Os escores da LLR desses eventos estavam acima do corte, em consistência com um resultado de trissomia completa. Para a identificação de uma duplicação parcial ou trissomia completa, o tratamento de acompanhamento para uma identificação positiva no NIPT oferece à paciente um teste de confirmação por meio de um diagnóstico pré-natal.

Tabela 12 Exemplos de grandes eventos de duplicação identificados na triagem genômica ampla

| | Verdade clínica | Resultado do sistema genômico amplo | Tamanho da anomalia (Mb) | % de cromossomos | Escore da LLR |
|-----------|---------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|------------------|---------------|
| Amostra 1 | Gestação única com trissomia 21 | Duplicação parcial no cromossomo 21 | 22,50 | 48,9% | 19,43 |
| Amostra 2 | Gestação única com trissomia 18 | Duplicação parcial no cromossomo 18 | 47,00 | 60,2 | 12,99 |

Consulte o *Guia do software VeriSeq NIPT Solution v2 (documento n.º 1000000067940)* para obter informações adicionais sobre as métricas de controle de qualidade usadas para relatar resultados de aneuploidia.

Cromossomos sexuais

Os resultados do cromossomo sexual do VeriSeq NIPT Solution v2 foram comparados com o resultado do padrão de referência clínica e são resumidos na tabela a seguir. A concordância percentual foi calculada para cada cromossomo sexual em cada resultado de padrão de referência clínica. A concordância percentual foi calculada como o número de amostras em que a identificação do cromossomo sexual do VeriSeq NIPT Solution v2 correspondeu à classificação padrão de referência clínica dividida pelo número total de amostras com a mesma classificação padrão de referência clínica.

Tabela 13 Concordância percentual para classificação sexual do feto*

| Classificação sexual do feto | | Fenótipo do exame físico do neonato | | Resultados citogenéticos | | | | | | | |
|------------------------------|-----------|-------------------------------------|------------|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------|---------------|
| Detectada | Cariótipo | Feminino | Masculino | XX | XY | XO | XXX | XXY | XYY | Outros** | Ausente |
| Anomalia não detectada | XX | 997 | 0 | 21 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Anomalia não detectada | XY | 0 | 966 | 0 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Anomalia detectada | XO | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Anomalia detectada | XXX | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Anomalia detectada | XXY | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 | 0 | 1 | 0 |
| Anomalia detectada | XYY | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 0 | 0 |
| Total | | 997 | 966 | 21 | 15 | 21 | 17 | 23 | 12 | 2 | 1 |
| Concordância percentual | | 100 | 100 | 100 | 100 | 90,5 | 100 | 100 | 91,7 | Não aplicável | Não aplicável |

* Cinco gestações gemelares foram corretamente classificadas como presença de Y. Duas gestações foram classificadas como sem presença de Y.

** Outros resultados citogenéticos foram XXXXX e XYYY.

Valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do VeriSeq NIPT Solution v2

O valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) do teste fornecem informações relativas à capacidade do teste de informar decisões clínicas baseadas na sensibilidade e especificidade do teste e na probabilidade pré-teste de que o feto seja afetado por trissomia (prevalência). Uma vez que o VPP e o VPN dependem da prevalência e a prevalência dessas aneuploidias pode variar nas diferentes populações de indivíduos, o VPP e o VPN foram calculados para um intervalo de valores de prevalências plausíveis com base nos valores de sensibilidade e especificidade observados na triagem básica (sem mosaicos conhecidos) do estudo clínico de precisão. A **Tabela 17** se baseia na triagem genômica ampla (com mosaicos conhecidos).

Tabela 14 Prevalência de trissomia 21, VPP e VPN na triagem básica (excluindo mosaicos conhecidos)

| Prevalência (%) | VPP (%) | VPN (%) |
|-----------------|---------|---------|
| 0,05 | 33,17 | >99,99 |
| 0,10 | 49,82 | >99,99 |
| 0,20 | 66,53 | >99,99 |
| 0,50 | 83,29 | >99,99 |
| 1,00 | 90,93 | >99,99 |
| 1,50 | 93,79 | >99,99 |
| 2,00 | 95,29 | >99,99 |

Tabela 15 Prevalência de trissomia 18, VPP e VPN na triagem básica (excluindo mosaicos conhecidos)

| Prevalência (%) | VPP (%) | VPN (%) |
|-----------------|---------|---------|
| 0,03 | 23,06 | >99,99 |
| 0,05 | 33,31 | >99,99 |
| 0,10 | 49,99 | >99,99 |
| 0,20 | 66,68 | >99,99 |
| 0,30 | 75,03 | >99,99 |
| 0,40 | 80,04 | >99,99 |
| 0,50 | 83,38 | >99,99 |

Tabela 16 Prevalência de trissomia 13, VPP e VPN na triagem básica (excluindo mosaicos conhecidos)

| Prevalência (%) | VPP (%) | VPN (%) |
|-----------------|---------|---------|
| 0,01 | 9,10 | >99,99 |
| 0,02 | 16,68 | >99,99 |
| 0,05 | 33,37 | >99,99 |
| 0,10 | 50,05 | >99,99 |
| 0,20 | 66,73 | >99,99 |

Tabela 17 Prevalência de qualquer anomalia, VPP e VPN na triagem genômica ampla (incluindo mosaicos conhecidos).

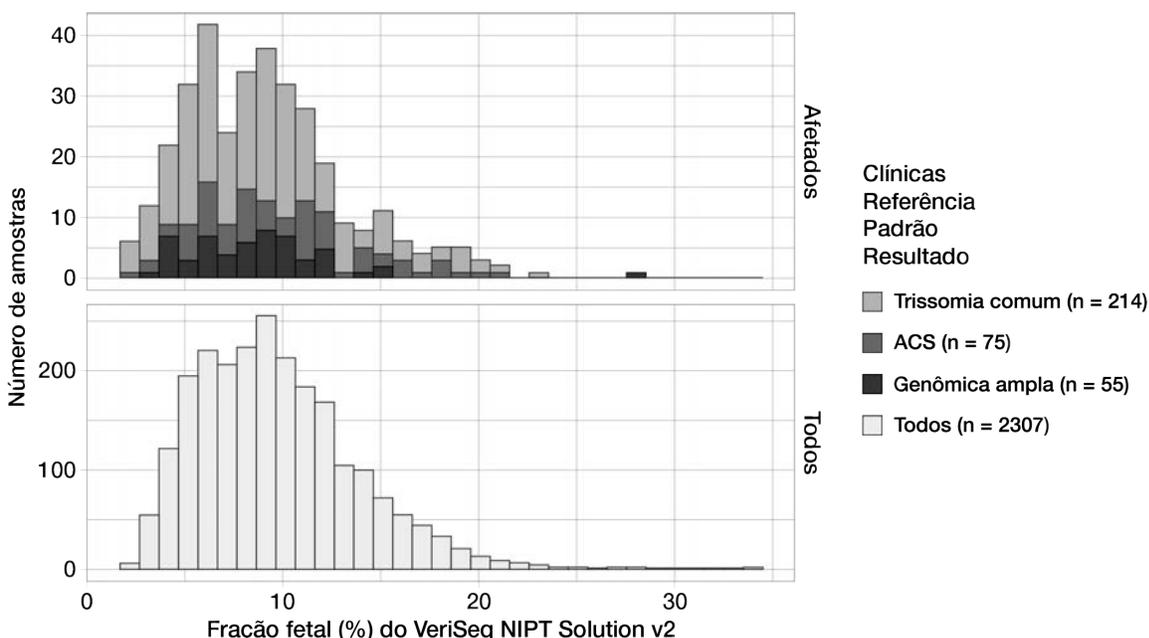
| Prevalência (%) | VPP (%) | VPN (%) |
|-----------------|---------|---------|
| 0,01 | 1,42 | >99,99 |
| 0,02 | 2,81 | >99,99 |
| 0,05 | 6,74 | >99,99 |

| Prevalência (%) | VPP (%) | VPN (%) |
|-----------------|---------|---------|
| 0,10 | 12,64 | >99,99 |
| 0,20 | 22,45 | 99,99 |
| 0,50 | 42,07 | 99,98 |
| 1,00 | 59,34 | 99,95 |
| 1,50 | 68,75 | 99,93 |
| 2,00 | 74,68 | 99,91 |

Distribuição da fração fetal

A distribuição das estimativas da fração fetal do VeriSeq NIPT Solution v2 da triagem genômica ampla com mosaicos é mostrada por categoria do resultado do Padrão de Referência Clínica na **Figura 1**.

Figura 1 Distribuição da fração fetal



5 amostras apresentaram anomalias em diversas categorias.
 A trissomia comum inclui amostras com trissomia 21, 18 e/ou 13.
 A genômica ampla inclui amostras com RAA ou deleções e/ou duplicações parciais.

As estimativas da FF variaram de 2% a 34%, em geral, com uma mediana de 9% e um intervalo interquartil (IQ) de 6% a 12%. A estimativa da mediana da FF para trissomias comuns e eventos detectados pela triagem genômica ampla é de 8% e, para ACSs, é de 9%. O intervalo das estimativas da FF foi consistente para todos os resultados. Não existe qualquer desvio aparente na distribuição da FF entre trissomias comuns, ACSs, eventos detectados pela triagem genômica ampla ou todas as amostras na análise genômica ampla.

Desempenho em gestações gemelares

Estimativa da trissomia 13, 18 e 21 e do desempenho do cromossomo Y em gestações gemelares

Devido à baixa prevalência de trissomia 21, 18 e 13 em gestações gemelares, somente um pequeno número de amostras de gestações gemelares estava disponível para o estudo clínico. Para estimar o desempenho do VeriSeq NIPT Solution v2 em gestações gemelares, foram usados modelos *in silico* baseados em observações de amostras clínicas para simular populações de gestações gemelares. Essa simulação foi consistente com a

população de uso previsto. A distribuição da fração fetal foi determinada com base em aproximadamente 4.500 amostras de gestações gemelares e comparada com a distribuição de aproximadamente 120.000 amostras de gestações únicas. A distribuição da fração fetal condicionada à condição de aneuploidia foi determinada com base em identificações supostas de gestações únicas (1.044 trissomias 21, 307 trissomias 18 e 192 trissomias 13). A combinação das duas distribuições permitiu inferências da detecção de aneuploidia gêmeos. Grupos de gêmeos dizigóticos e monozigóticos foram simulados, e foi determinada uma média ponderada representando sua prevalência na população de uso previsto (2 dizigóticos: 1 monozigótico) para estimar a sensibilidade. Para a especificidade, foram simulados grupos de gêmeos não afetados.

A fração de cada amostra simulada afetada pela trissomia (ou seja, a fração afetada) foi calculada de maneira diferente para cada categoria de amostra.

- ▶ Para gêmeos monozigóticos, a fração afetada de cada amostra foi definida em 1,0 porque, nesta situação, a trissomia afeta ambos os gêmeos.
- ▶ Para gêmeos dizigóticos, foi suposto que somente um dos gêmeos estava afetado (a ocorrência de ambos os gêmeos afetados é extremamente rara). Os valores da fração afetada foram simulados usando a distribuição conhecida das razões de fração fetal determinadas com base em amostras clínicas de gêmeos com discordância sexual. Foi usada uma abordagem conservadora por meio da qual foi suposto que o gêmeo afetado sempre tinha a fração fetal mais baixa. Foi aplicado um fator de correção para frações fetais que estavam, na média, mais baixas em gestações de trissomia 13 e 18.
- ▶ Para gêmeos não afetados, a fração afetada de cada amostra foi definida em zero.

Para gêmeos afetados por trissomia 18 ou 13, a fração fetal correspondente à fração afetada da amostra estava reduzida. A redução foi proporcional à redução média da fração fetal observada nos dados clínicos de gestações únicas de trissomia 18 ou 13 em comparação com gestações únicas euploides.

A fração fetal global e a fração fetal afetada de cada amostra simulada foram, em seguida, usadas para calcular um escore de aneuploidia usando o algoritmo padrão do VeriSeq NIPT Solution v2. A sensibilidade foi calculada pela determinação da frequência em que os escores de aneuploidia das amostras simuladas afetadas de gêmeos estavam acima do corte de aneuploidia correspondente. De uma maneira correspondente, a especificidade foi calculada pela determinação da frequência em que os escores de aneuploidia das amostras simuladas não afetadas de gêmeos estavam abaixo do corte de aneuploidia correspondente (Tabela 18). Foram estimados intervalos de confiança de 95% com base no número de amostras clínicas reais de gêmeos no conjunto original de dados, que foram classificadas como afetadas ou não afetadas pela trissomia relevante.

Para estimar a sensibilidade do cromossomo Y nas amostras de gêmeos, foram simulados grupos de gêmeos XY/XY e XX/XY. Foi calculada a média ponderada representando sua prevalência na população de uso previsto (1 XY/XY: 1 XX/XY). Para estimar a especificidade do cromossomo Y em gêmeos, foi simulado um grupo de gêmeos XX/XX. Os valores da fração fetal global foram simulados segundo a distribuição conhecida da fração fetal em amostras clínicas de gêmeos.

Para gêmeos XY/XY e XX/XY, foram estimados escores correspondentes do cromossomo Y usando a relação conhecida entre a fração fetal e os escores do cromossomo Y em amostras clínicas de gestações únicas classificadas como do sexo masculino. Somente para gêmeos XX/XY, os valores da fração fetal afetada (ou seja, sexo masculino) foram simulados usando a distribuição conhecida das relações das frações fetais observadas entre gêmeos da mesma gravidez, segundo amostras clínicas de gêmeos com discordância sexual. Foi usada uma abordagem conservadora pela qual a fração afetada foi selecionada de modo a corresponder ao menor dos gêmeos. Para cada amostra simulada de XX/XY, o escore do cromossomo Y foi multiplicado pela fração afetada.

Para gêmeos XX/XX, os escores do cromossomo Y foram obtidos a partir dos escores observados em amostras clínicas de gestações únicas classificadas como do sexo feminino. O escore do cromossomo Y e a fração fetal global foram, em seguida, usados para classificar cada amostra simulada como cromossomo Y presente ou cromossomo Y ausente usando o algoritmo padrão do VeriSeq NIPT Solution v2

A sensibilidade foi calculada pela determinação da frequência em que gêmeos simulados XY/XY ou XX/XY foram corretamente classificados como cromossomo Y presente. A especificidade foi calculada pela determinação da frequência em que gêmeos simulados XX/XX foram corretamente classificados como

cromossomo Y ausente. Foram estimados intervalos de confiança de 95% com base no número de amostras clínicas reais de gêmeos no conjunto original de dados que foram classificadas como cromossomo Y presente ou cromossomo Y ausente.

Tabela 18 Estimativas da trissomia 21, 18 e 13 em uma população simulada de gestações gemelares

| | Trissomia 21 | Trissomia 18 | Trissomia 13 | Presença de Y |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Sensibilidade | 96,4% | 95,7% | 93,6% | >99,9% |
| IC de dois lados de 95% | (86,4%, 98,9%) | (68,3%, 99,4%) | (64,1%, 98,9%) | (99,9%, >99,9%) |
| Especificidade | 99,9% | >99,9% | >99,9% | >99,9% |
| IC de dois lados de 95% | (99,8%, >99,9%) | (99,9%, >99,9%) | (99,9%, >99,9%) | (99,7%, >99,9%) |

A **Tabela 18** fornece estimativas pontuais e intervalos de confiança de 95% estimados para a sensibilidade e a especificidade do VeriSeq NIPT Solution v2 para detectar trissomia 21, 18 e 13 e a presença de Y em uma população simulada de gestações gemelares consistentes com a população de uso previsto. Os intervalos de confiança foram estimados com base no número de amostras clínicas de gêmeos aprovadas pelo CQ classificadas como afetadas ou não afetadas pela trissomia relevante. O cálculo da sensibilidade supõe que dois terços das gestações gemelares afetadas são dizigóticas com um gêmeo afetado, enquanto um terço das gestações gemelares afetadas são monozigóticas com ambos os gêmeos afetados.

As estimativas indicadas na **Tabela 18** são relativas somente a gestações gemelares. Devido à prevalência ainda menor, os dados para gestações de ordem superior (trigêmeos ou mais) foram insuficientes para estabelecer os modelos estatísticos adequados para estimar a precisão da detecção de aneuploidias.

Desempenho analítico

Precisão

Para avaliar e quantificar a precisão dos ensaios, foi conduzida uma reanálise dos dados usando o software de pipeline de análise do VeriSeq NIPT Solution v2 com base em dois estudos anteriores do VeriSeq NIPT Solution.

- ▶ Um estudo multicêntrico de reprodutibilidade que incluiu três execuções por três operadores em três centros usando um único lote de reagentes para um total de nove execuções.
- ▶ Um estudo de precisão intralaboratorial que incluiu 12 ensaios em um único centro, utilizando dois ML STARs, dois sistemas de instrumentos de sequenciamento e três lotes de reagentes de sequenciamento.

O objetivo do estudo de precisão foi quantificar a precisão do ensaio com relação à trissomia 21 (T21) e ao cromossomo Y e estimar a variabilidade entre diferentes instrumentos, kits de preparação de bibliotecas e lotes de reagentes de sequenciamento.

Foi criado um pool de T21 com fração fetal de 5% pela combinação do cfDNA extraído do plasma materno de gestantes (com um feto afetado por T21) e do cfDNA extraído de plasma de mulheres não grávidas. Também foi criado um pool de cfDNA extraído do plasma materno de um feto masculino com fração fetal de 10% (feto XY). O painel das amostras de cada estudo e de cada execução incluiu quatro replicações do pool de amostras afetadas por T21 com fração fetal de 5% e 20 replicações do pool de cfDNA do feto masculino com fração fetal de 10%. Os testes foram executados ao longo de 10 dias para um total de 21 execuções para os dois estudos combinados.

T21 e a presença do cromossomo Y foram escolhidos para avaliação com base na representatividade das condições clínicas e na complexidade da detecção de anomalias. Sendo o menor autossomo humano, o tamanho do cromossomo 21 tem um impacto direto na sensibilidade da detecção de T21, particularmente em valores baixos da fração fetal, como os utilizados neste estudo. O cromossomo Y, estando presente no plasma materno, é de origem exclusivamente fetal e, portanto, mais fácil de ser detectado pelo ensaio.

A média e o desvio padrão observados para o escore da LLR do cromossomo 21 e os valores cromossômicos normalizados (NCV) do cromossomo Y que replicam o desvio padrão (DP) constituíram a maior fonte de variabilidade. Variações entre os centros, instrumentos e lotes de reagentes adicionaram uma quantidade insignificante de variabilidade, evidenciada pela diferença entre o DP total e o DP replicado na [Tabela 19](#) e na [Tabela 20](#).

Tabela 19 Resumo do desvio padrão (DP) da resposta do sequenciamento multicêntrico (reprodutibilidade)

| Resposta | N | Média | DP replicado | DP total da reprodutibilidade* |
|--------------------------------|-----|--------|--------------|--------------------------------|
| Escore da LLR do cromossomo 21 | 36 | 34,43 | 11,36 | 11,36 |
| NCV do cromossomo Y | 180 | 190,56 | 7,96 | 10,20 |

* O total inclui a variabilidade decorrente da diferença entre centros, operadores, execuções, dias e replicações.

Tabela 20 Resumo da precisão da resposta do sequenciamento intralaboratorial

| Resposta | N | Média | DP replicado | DP padrão intralaboratorial total* |
|--------------------------------|-----|--------|--------------|------------------------------------|
| Escore da LLR do cromossomo 21 | 48 | 36,01 | 9,07 | 10,25 |
| NCV do cromossomo Y | 240 | 198,68 | 7,63 | 7,82 |

* O total inclui a variabilidade decorrente da diferença entre instrumentos de sequenciamento, lotes de reagentes, operadores, execuções, dias e replicações.

Foi realizado um estudo adicional para comparar a precisão de sequenciamento do VeriSeq NIPT Solution v2 (desvio padrão total) usando a versão 2.0 de uma lâmina de fluxo comparada com a versão 2.5. O estudo incluiu dois tipos de lâmina de fluxo (v2.0 e v2.5), três lotes de kits de sequenciamento, quatro sistemas de instrumentos e duas execuções de sequenciamento por combinação para um total de 48 execuções em um único local. Foi preparado um pool de sequenciamento a partir de placas de cfDNA preparadas manualmente. O painel das amostras incluiu quatro replicações do pool de amostras afetadas por T21 com fração fetal de 5% e 20 replicações do pool de cfDNA do feto masculino (feto XY) com fração fetal de 10%. Os resultados do estudo são apresentados na [Tabela 21](#) e indicam que não existe diferença na precisão do sequenciamento usando a lâmina de fluxo v2.0 ou a lâmina de fluxo v2.5.

Tabela 21 Resumo da precisão da resposta do sequenciamento com lâmina de fluxo v2.0 em comparação com a lâmina de fluxo v2.5

| Resposta | Número de observações por versão | DP total da v2.0* | DP total da v2.5* | Resultado estatístico** |
|--------------------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|--|
| Escore da LLR do cromossomo 21 | 96 | 9,56 | 8,44 | Estatisticamente equivalente (valor de p = 0,25) |
| NCV do cromossomo Y | 480 | 7,74 | 7,38 | Estatisticamente equivalente (valor de p = 0,38) |

* O total inclui a variabilidade decorrente da diferença entre instrumentos de sequenciamento, lotes de reagentes, execuções, dias e replicações

**Baseado no teste F para a igualdade das variâncias (desvios padrão ao quadrado)

Contaminação cruzada

A contaminação cruzada foi avaliada no fluxo de trabalho da preparação de amostras do VeriSeq NIPT Solution. Pools de plasma de mulheres não grávidas (XX) e de homens adultos (XY) foram testados em um padrão de xadrez em 4 placas de 96 poços. N=48 cada para amostras femininas e masculinas por placa para um total de 192 amostras femininas e 192 amostras masculinas. Nenhuma das amostras femininas demonstrou cobertura do cromossomo Y que fosse estatisticamente mais elevada do que a base estimada, não indicando qualquer contaminação cruzada por parte das amostras masculinas na mesma placa. Não foi observada qualquer contaminação cruzada detectável no VeriSeq NIPT Solution.

Substâncias potencialmente interferentes

O impacto de substâncias potencialmente interferentes foi determinado no VeriSeq NIPT Solution pela avaliação do desempenho do ensaio na presença destas substâncias.

Albumina, bilirrubina, hemoglobina e triglicerídeos (endógenos) foram individualmente colocados em pools de plasma materno originário de gestações do sexo feminino (fetos XX) não afetadas. Foram feitos testes em duas concentrações para cada substância de teste (n = 16 para cada). Não foram observadas interferências no desempenho do ensaio.

Tabela 22 Substâncias potencialmente interferentes (endógenas)

| Substância de teste | Concentração baixa do teste (mg/ml) | Concentração alta do teste (mg/ml) |
|---------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Albumina | 35 | 50 |
| Bilirrubina | 0,01 | 0,15 |
| Hemoglobina | 100 | 200 |
| Triglicerídeos | 1,5 | 5 |

A presença natural de DNA genômico (gDNA) materno no plasma também pode interferir com o desempenho do ensaio, pois ele pode ser extraído juntamente com o cfDNA fetal. Níveis de DNA genômico de 1,6, 3,3 e 4,9 ng por amostra (correspondentes a 1, 2 e 3 desvios padrão acima da concentração média esperada de gDNA depois de 7 dias de armazenamento de sangue total¹²) foram adicionados ao cfDNA extraído do plasma materno originário de gestações do sexo feminino (fetos XX) não afetadas. Em seguida, as amostras foram testadas no VeriSeq NIPT Solution (n = 16 para cada concentração). Não foram observadas interferências no desempenho do ensaio na presença de níveis elevados de gDNA.

Vinte substâncias potencialmente interferentes (exógenas) baseadas em medicamentos comumente usados ou prescritos durante a gravidez foram testados segundo o EP7-A2 (Teste de interferência em química clínica, Diretriz aprovada, segunda edição). Os 20 possíveis interferentes foram combinados em quatro pools, colocados em plasma materno originário de gestações do sexo feminino (fetos XX) não afetadas e testados no VeriSeq NIPT Solution (N = 16 para cada pool). Não foram observadas interferências no desempenho do ensaio na presença dessas substâncias exógenas

Tabela 23 Substâncias potencialmente interferentes (exógenas)

| Pool 1 | Pool 2 | Pool 3 | Pool 4 |
|----------------|---------------|-------------------|-------------------|
| Paracetamol | Difenidramina | Albuterol | Cetirizina |
| Acetilcisteína | Eritromicina | Bupropiona | Dextrometorfano |
| Bisoprolol | Guaifenesina | Cafeína | Ácido L-ascórbico |
| Citalopram | Heparina | Sertralina | Metoprolol |
| Desloratadina | Lidocaína | Fluoreto de sódio | Nadolol |

Limite de detecção

O Limite de detecção (LOD) é definido como o nível de fração fetal que corresponde à probabilidade de detecção de 95% de uma condição de interesse, como T21. Para avaliar o LOD do VeriSeq NIPT Solution v2 para várias condições comuns, foram conduzidos estudos e análises estatísticas.

A probabilidade de detecção de uma condição de interesse em uma amostra afetada processada pelo VeriSeq NIPT Solution v2 depende, principalmente, de três fatores:

- ▶ fração fetal;
- ▶ profundidade de sequenciamento;
- ▶ tamanho e complexidade da região genômica de interesse.

Supondo uma profundidade de sequenciamento constante, uma determinada aberração é mais fácil de ser detectada em uma amostra com um percentual de fração fetal mais elevado do que em uma amostra com um percentual de fração fetal mais baixo. Por outro lado, supondo uma fração fetal constante, uma determinada aberração é mais fácil de ser detectada em uma amostra com profundidade de sequenciamento mais elevada do que em uma amostra com profundidade de sequenciamento mais baixa. Por último, aberrações em regiões genômicas menores ou mais complexas são mais difíceis de detectar do que em regiões genômicas maiores ou menos complexas, supondo fração fetal e profundidade de sequenciamento constantes.

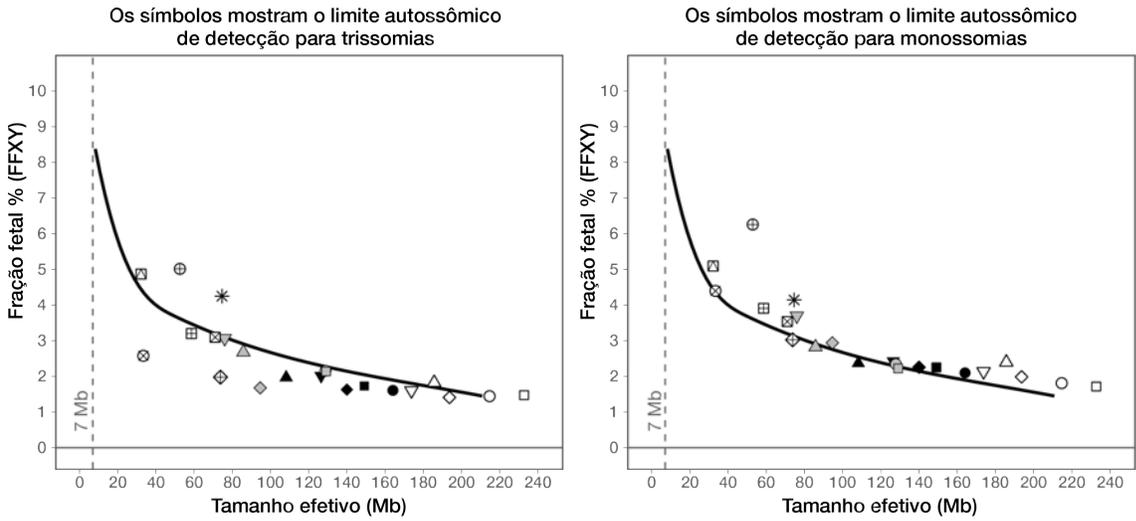
Para determinar o LOD para detecção de T21, foram analisadas amostras constituídas por misturas de amostras de pool de T21 e amostras de pool não afetadas. Os dois tipos de analitos foram misturados em uma série de titulação para criar um grupo de sete níveis de fração fetal (0, 2, 3, 4, 5, 6 e 10%). Cada nível foi representado por um total de 10 replicações.

Para aumentar ainda mais a resolução da grade de fração fetal para a análise do LOD, os dados deste estudo foram enriquecidos com dados obtidos de uma diluição *in silico*. Os efeitos da diluição experimental e da titulação foram simulados pela mistura controlada dos dados de sequenciamento. Os dados dessa titulação *in silico* abrangeram um grupo de 14 níveis de fração fetal (1,25, 1,50, 1,75, 2,00, 2,25, 2,50, 2,75, 3,00, 3,25, 3,50, 3,75, 4,00, 4,25 e 4,50%) com 32 replicações para cada nível. Foi aplicada uma análise probit aos dados resultantes para determinar o LOD para T21.

Além disso, um modelo estatístico usando fração fetal, profundidade de sequenciamento e tamanho/complexidade genômica foi desenvolvido para prever a probabilidade de detecção de qualquer aberração em qualquer amostra. Esse modelo foi estabelecido com base nos dados correspondentes a um grupo de 1.405 amostras XY. O LOD para T21, previsto por esse modelo, foi determinado para ser concordante com a estimativa baseada na análise probit descrita acima. Esse modelo estatístico foi usado para estimar os valores de LOD para aneuploidias em todos os autossomos e para deleções e duplicações parciais.

A **Figura 2** mostra a probabilidade de detecção de 95% para regiões médias por tamanho e por limites de detecção autossômica para todas as trissomias e todas as monossomias.

Figura 2 Probabilidades de detecção de 95% para regiões médias por tamanho para o VeriSeq NIPT Solution v2



| Cromossomo | Símbolo | Trissomia | | Monossomia | |
|------------|---------|---|---------|---|---------|
| | | Corte da LLR (razão logarítmica de verossimilhança) | LoD (%) | Corte da LLR (razão logarítmica de verossimilhança) | LoD (%) |
| 1 | ○ | 7 | 1,44 | 13,2 | 1,80 |
| 2 | □ | 9 | 1,47 | 13,6 | 1,71 |
| 3 | ◇ | 5 | 1,41 | 13,8 | 1,99 |
| 4 | △ | 7 | 1,82 | 15,2 | 2,39 |
| 5 | ▽ | 7,6 | 1,60 | 17 | 2,14 |
| 6 | ● | 7,3 | 1,60 | 15,4 | 2,09 |
| 7 | ■ | 6,6 | 1,73 | 14 | 2,25 |
| 8 | ◆ | 5,8 | 1,63 | 14,8 | 2,25 |
| 9 | ▲ | 8 | 1,97 | 13,6 | 2,37 |
| 10 | ▼ | 8,8 | 2,01 | 14,7 | 2,42 |
| 11 | ⊙ | 12,2 | 2,14 | 15,7 | 2,35 |

| Cromossomo | Símbolo | Trissomia | | Monossomia | |
|------------|---------|---|---------|---|---------|
| | | Corte da LLR (razão logarítmica de verossimilhança) | LoD (%) | Corte da LLR (razão logarítmica de verossimilhança) | LoD (%) |
| 12 | ▣ | 11,6 | 2,14 | 12,8 | 2,22 |
| 13 | ◇ | 3 | 1,68 | 16,5 | 2,94 |
| 14 | ▲ | 12,7 | 2,68 | 14,7 | 2,82 |
| 15 | ▽ | 9,8 | 3,07 | 16,4 | 3,69 |
| 16 | ⊠ | 10,7 | 3,10 | 15,3 | 3,54 |
| 17 | * | 16,8 | 4,25 | 15,7 | 4,14 |
| 18 | ⊕ | 3 | 1,98 | 11,3 | 3,02 |
| 19 | ⊕ | 15,5 | 5,01 | 27,5 | 6,26 |
| 20 | ⊞ | 10,6 | 3,20 | 18,2 | 3,91 |
| 21 | ⊗ | 2,5 | 2,58 | 13,2 | 4,40 |
| 22 | ⊠ | 13,5 | 4,87 | 15,3 | 5,09 |

Resolução de problemas

Solução de problemas do VeriSeq NIPT Solution v2

| Modo de falha | Possível resultado | Interpretação | Ação recomendada | Comentários |
|-----------------------------------|---------------------------------------|---|--|---|
| Introdução insuficiente de plasma | Falha de CQ da amostra | Volume de plasma insuficiente | Faça uma nova coleta | Com base na inspeção visual do volume de plasma. |
| Falha no tubo de sangue | O sangue não está separado em camadas | A amostra não foi centrifugada | Certifique-se de que a centrifuga tenha sido acionada e que o tubo tenha sido girado com a força adequada. Faça uma nova coleta de amostra. | |
| | | Armazenamento ou transporte inadequado da amostra (hemólise da amostra) | Faça uma nova coleta de amostra. | Amostras congeladas não se separam. Condições de armazenamento ou transporte inadequadas podem causar hemólise das amostras. |
| Coágulo/fluxo lento da amostra | Contaminação do plasma | Amostras individuais podem coagular a placa de ligação se houver contaminação significativa no plasma sanguíneo | Inspeccione a amostra se o plasma remanescente no tubo estiver vermelho ou leitoso, cancele a amostra e solicite uma nova coleta. Se a amostra tiver aparência normal, repita o teste. | |
| | Transbordamento da amostra | Inspeção visual inadequada de cada tubo quanto à adequação da amostra | Invalide todas as amostras dos poços adjacentes que foram afetadas pelo transbordamento. | Pode indicar uma condição inadequada de transporte ou armazenamento da amostra antes do processamento. Amostras inadequadas devem ser excluídas do processamento. |
| | Mau funcionamento do equipamento | Digestão inadequada do material durante a extração | Teste a amostra novamente. Se o problema persistir no local dos poços com outras amostras, entre em contato com o Suporte técnico da Illumina. | |

| Modo de falha | Possível resultado | Interpretação | Ação recomendada | Comentários |
|--|---|--|---|--|
| Falha de CQ de quantificação | Falha na execução de quantificação – mediana do lote abaixo do mínimo | Rendimento insuficiente do processo | Repita a quantificação. Se a repetição também apresentar falha, entre em contato com o Suporte técnico da Illumina. | As métricas da curva padrão de aprovação indicam problemas na preparação das bibliotecas. |
| | Falha na execução da quantificação | Falha na curva padrão | Repita a quantificação. Se a repetição também apresentar falha, entre em contato com o Suporte técnico da Illumina. | As causas comuns de falha na curva padrão incluem reagentes de quantificação inadequadamente descongelados, volumes inconsistentes nos poços devido a derramamento e degradação do reagente de quantificação de DNA (por exemplo, por exposição à luz). |
| Falha no pooling | Falha na conclusão do pooling das amostras | A análise de pooling não consegue calcular os volumes adequados de pool | Reavalie a concentração pretendida de pool e refaça a análise de pooling. | Pode ocorrer quando todas as amostras de um lote tiverem baixos valores de quantificação enquanto você tiver definido uma concentração elevada de pool (geralmente acima de 3 a 5 pm). |
| Falha de CQ na análise de amostra individual | Falha de CQ de sequenciamento | Introdução genética insuficiente OU transferência incorreta durante o manuseio da amostra OU falha no sequenciamento do reagente | Verifique a anotação da amostra. Verifique se existe um desempenho semelhante em amostras anteriores na posição relativa da placa. Teste a amostra novamente. | Indica a introdução de uma amostra de má qualidade ou uma transferência incorreta no ML STAR. O material genético insuficiente pode ser decorrente de DNA livre no plasma ou no DNA celular, causando a diluição excessiva da amostra para o sequenciamento. |
| | Contagem baixa de FF ou locais não excluídos (NES) | Dados insuficientes gerados para criar um relatório preciso | Teste o plasma novamente. | |

Solução de problemas do VeriSeq NIPT Microlab STAR

| Etapa do processo | Código de erro | Mensagem de erro | Descrição | Solução do usuário |
|-------------------|----------------|--|---|--|
| Criação de lote | EM0044 | The Batch ID entered contains forbidden characters (O ID do lote inserido tem caracteres proibidos). | O VeriSeq NIPT Solution v2 só aceita números, letras, sublinhados e traços para todos os campos de dados. | Renomeie o lote usando um nome que não contenha caracteres especiais de texto. |
| Criação de lote | EM0051 | The Batch ID is greater than 26 characters in length (O ID do lote tem mais de 26 caracteres). | O VeriSeq NIPT Solution v2 limita os nomes de lotes a 26 caracteres. | Renomeie o lote usando um nome com menos de 26 caracteres. |

| Etapa do processo | Código de erro | Mensagem de erro | Descrição | Solução do usuário |
|----------------------|----------------|--|---|--|
| Criação de lote | EM0076 | Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2 (Não é possível fazer a conexão com o VeriSeq Onsite Server v2) | O VeriSeq Onsite Server v2 não está respondendo às solicitações de dados do Gerenciador de fluxo de trabalho. | Certifique-se de que: 1. O ML STAR esteja conectado à rede. 2. O VeriSeq Onsite Server v2 esteja ligado. 3. O ML STAR possa se conectar ao VeriSeq Onsite Server v2 (por meio de solicitação de ping). 4. Se as etapas descritas acima não solucionarem o problema, envie um e-mail para o Suporte técnico da Illumina. 5. Verifique se o recipiente de resíduos de vácuo está acima da metade. Caso esteja, esvazie-o. |
| Criação de lote | EM0118 | This batch has been failed and cannot be further processed (Este lote apresentou falha e não pode mais ser processado). | O lote especificado já apresentou falha e não pode continuar a ser processado. | O registro do lote no VeriSeq Onsite Server v2 indica que o lote selecionado falhou. Nenhum processamento adicional é permitido. Crie outro lote com as amostras desejadas. |
| Criação de lote | N/A | This batch has already completed processing. (Este lote já concluiu o processamento). Would you like to repool? (Deseja repetir o pool?) | O lote indicado foi processado por pooling. O único processamento permitido é a repetição do pool. | Para repetir o pool, selecione Re-Pool (Repetir pool). OU Interrompa o método e verifique novamente o nome do lote. |
| Isolamento de plasma | WP0087 | Duplicate sample barcodes loaded (Foram carregados códigos de barras de amostras em duplicidade). | Amostras com códigos de barras idênticos foram carregadas no sistema. | 1. Siga as instruções do Gerenciador de fluxo de trabalho para identificar as amostras em duplicidade. 2. Remova essas amostras e etiquete-as novamente ou substitua-as. 3. Recarregue as amostras. |
| Isolamento de plasma | EP0102 | Samples specified in the Sample Sheet were not loaded (As amostras especificadas na planilha de amostras não foram carregadas). | As amostras constantes da planilha de amostras não foram incluídas nos códigos de barra carregados. | 1. Siga as instruções do Gerenciador de fluxo de trabalho para identificar amostras faltantes. 2. Adicione as amostras faltantes ao lote e recarregue as amostras. OU Interrompa o método, modifique a planilha de amostras conforme necessário e reinicie o método. |

| Etapa do processo | Código de erro | Mensagem de erro | Descrição | Solução do usuário |
|------------------------|----------------|---|--|--|
| Carregamento de placas | N/A | Venus Barcode Mask Error (Erro de máscara de código de barras Venus) | O Gerenciador de fluxo de trabalho executa a associação correta placa-lote com as máscaras de código de barras Venus. | <ol style="list-style-type: none"> 1. Verifique a colocação da placa para confirmar se o layout da placa está correto. 2. Certifique-se de que a placa carregada seja a placa correta para o lote indicado. |
| Extração de cfDNA | WE0150 | Pressure in the vacuum chamber is too low. (A pressão na câmara de vácuo está excessivamente baixa). | O Gerenciador de fluxo de trabalho não avançará se a pressão da tubulação de vácuo em repouso for <400 Torr. | <ol style="list-style-type: none"> 1. Verifique a existência de torções ou outras obstruções na tubulação de vácuo. 2. Abra os grampos de liberação da tubulação de resíduos para liberar a pressão e feche os grampos de liberação da tubulação por completo. 3. Certifique-se de que o controlador e a bomba de vácuo estejam ligados. 4. Se o problema persistir, entre em contato com o Suporte técnico da Illumina. |
| | WE0153 | Pressure in the vacuum chamber is too high (A pressão na câmara de vácuo está excessivamente elevada). | Se a pressão de vácuo medida estiver excessivamente elevada antes do início do controle de pressão, o sistema poderá funcionar incorretamente. | Na parte traseira do controlador, certifique-se de que todas as conexões e tubulações de vácuo estejam presas. |
| | WE0996 | Vacuum failed to seal (Falha na vedação do vácuo). | O sistema não cria uma vedação de vácuo na placa de ligação. | <p>OBSERVAÇÃO: não selecione OK até que a falha de vedação esteja completamente resolvida.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Certifique-se de que a placa de ligação esteja nivelada com o coletor de vácuo. Com uma luva protegendo a mão, pressione com força a placa de ligação para baixo. 2. Selecione OK para continuar a extração de cfDNA. 3. Se essa mensagem de erro for exibida mais de três vezes em um ensaio, envie um e-mail ao Suporte técnico da Illumina. |
| | WM0219 | If Vacuum is on, manually rest the pump. (Se o vácuo estiver ligado, coloque a bomba em repouso manualmente). | O vácuo pode permanecer ligado após a interrupção de um método durante a extração. | <ol style="list-style-type: none"> 1. No controlador de vácuo, pressione o botão Power (Alimentação) para desligar o vácuo. 2. Aguarde 10 segundos e pressione o botão Power (Alimentação) novamente para ligar o vácuo. |

| Etapa do processo | Código de erro | Mensagem de erro | Descrição | Solução do usuário |
|-------------------|----------------|--|--|--|
| | EE0477 | An error has occurred while moving a plate (iSWAP error) (Ocorreu um erro ao ser movida uma placa [erro iSWAP]). | Se ocorrer um erro iSWAP (queda da placa, falha ao apanhá-la etc.), o sistema solicitará que o usuário conclua o movimento da placa manualmente. | Certifique-se de que seja possível recuperar a placa (sem material derramado). - Caso contrário, interrompa a execução. - Caso afirmativo, siga as instruções exibidas para concluir a transferência da placa manualmente. |
| | EE0519 | Scanned barcode does not match binding plate barcode on record. (O código de barras lido não corresponde ao código de barras da placa de ligação no registro). | A placa de ligação carregada não corresponde ao código de barras da placa removida. | Certifique-se de que a placa carregada corresponda ao código de barras registrado (consulte o registro do traçado do código de barras esperado). |
| API | EA0372 | Unable to connect to the data server (Não é possível fazer a conexão com o servidor de dados). | O VeriSeq Onsite Server v2 não está respondendo às solicitações de dados do Gerenciador de fluxo de trabalho. | Certifique-se de que: 1. O ML STAR esteja conectado à rede. 2. O ML STAR possa se conectar ao VeriSeq Onsite Server v2 (por meio de solicitação de ping). 3. O VeriSeq Onsite Server v2 esteja ligado. |
| | EA0774 | Connection error The API server connection failed to validate (Erro de conexão. Falha na validação da conexão ao servidor API). | O VeriSeq Onsite Server v2 deixou de responder às solicitações de dados do Gerenciador de fluxo de trabalho. | Certifique-se de que: 1. O ML STAR esteja conectado à rede. 2. O ML STAR possa se conectar ao VeriSeq Onsite Server v2 (por meio de solicitação de ping). 3. O VeriSeq Onsite Server v2 esteja ligado. |
| | EA0780 | 403: Invalid Request The current transaction is not valid (403: Solicitação inválida. A transação atual não é válida). | Os dados enviados violam a lógica do fluxo de trabalho do sistema. | Consulte os detalhes do erro para obter mais informações. As causas comuns envolvem entradas de dados excessivamente longas ou que violam a lista de caracteres aceitáveis. |

Referências

- 1 Nagaoka S, Hassold T, Hunt P. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet.* 2012;13(7):493-504. doi:10.1038/nrg3245.
- 2 Garnder RJ, Sutherland GR, Schaffer LG. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling.* 4th edition. New York (NY): Oxford University Press; 2012.
- 3 Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Jan;45(1):16-26. doi: 10.1002/uog.14636.
- 4 American College of Obstetricians and Gynecologists. Screening for fetal aneuploidy. Practice Bulletin No. 163. *Obstet Gynecol.* 2016; 127(5):e123-137.
- 5 Gil MM, Accurti V, Santacruz B, Plana MN, Nicolaidis KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017 Apr 11. doi: 10.1002/uog.17484.
- 6 Bianchi D, Parker R, Wentworth J et al. DNA Sequencing versus Standard Prenatal Aneuploidy Screening. *N Engl J Med.* 2014;370(9):799-808. doi:10.1056/nejmoa1311037.
- 7 Benn P, Borrell A, Chiu RW, et al. "Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis." *Prenat Diagn* 35 (2015): 725-34.
- 8 Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med.* 2016; doi:10.1038/gim.2016.97.
- 9 Dondorp W, de Wert G, Bombard Y, et al. Non-invasive prenatal testing for aneuploidy and beyond: challenges of responsible innovation in prenatal screening. *Eur J Hum Genet.* 2015 Nov;23(11):1438-50.
- 10 Grati, et al. "Fetoplacental mosaicism: potential implications for false-positive and false-negative noninvasive prenatal screening results." *Genetics in Medicine* 16 (2014): 620–624.
- 11 Wellesley, et al. "Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe." *European Journal of Human Genetics* 20 (2012): 521-526.
- 12 Norton S, Lechner J, Williams T, Fernando M et al. A Stabilizing Reagent Prevents Cell-free DNA Contamination by Cellular DNA in Plasma During Blood Sample Storage and Shipping as Determined by Digital PCR. *Clin. Lab. Biochem.* 2013;46: 1561–1565. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.06.002.
- 13 Bianchi D W, et al. "Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing." *Obstet Gynecol* 119 (2012): 890-901.
- 14 Ehrich M, et al. "Genome-wide cfDNA screening: clinical laboratory experience with the first 10,000 cases." *Genet Med* 19 (2017): 1332-1337.
- 15 Fiorentino F, et al. "The clinical utility of genome-wide cfDNA screening." *Prenat Diagn* 37 (2017): 593-601.
- 16 Pertile, MD, et al. "Rare autosomal trisomies, revealed by maternal plasma DNA sequencing, suggest increased risk of feto-placental disease." *Sci Transl Med* 9 (2017): eaan1240.

Histórico de revisões

| Documento | Data | Descrição da alteração |
|-----------------------------------|----------------------|---|
| Documento n.º 100000078751 v06 | Agosto de 2021 | <ul style="list-style-type: none"> • Atualizado o endereço do Representante autorizado da UE. |
| Documento n.º 100000078751 v05 | Dezembro de 2020 | <ul style="list-style-type: none"> • Atualizados as seções Princípios de procedimentos, advertências e precauções e Rotulagem de produtos com esclarecimentos adicionais para cumprir exigências regulatórias. • Pequenas atualizações no conteúdo do protocolo para corresponder ao estilo e à organização da Illumina. • Corrigida a descrição do cromossomo 21 como "segundo menor autossomo humano" para "menor autossomo humano" na seção Precisão de Desempenho analítico. • Adicionadas declarações de cuidado para abordar o uso inadequado de reservatórios e o risco de mistura de amostras às seções Isolar preparação do plasma e Interpretação de resultados. • Adicionados novos números das peças do servidor e do software para o lançamento das atualizações dos números das peças do servidor e do software. • Adicionados cuidados às informações do protocolo e da solução de problemas para abordar e evitar transbordamentos de amostras. • Atualizados os ingredientes ativos no reagente do Padrão de quantificação de DNA na caixa de acessórios para estarem alinhados com a Ficha de dados de segurança. • Atualizadas as convenções de nomenclatura do módulo VeriSeq NIPT Local Run Manager quanto à consistência com outra documentação. • Adicionado histórico de revisões. |
| Documento n.º 100000078751 v04 | Outubro de 2020 | <ul style="list-style-type: none"> • Pequenas correções. |
| Documento n.º 100000078751 v03 | Setembro de 2020 | <ul style="list-style-type: none"> • Atualizada a lista de materiais para apresentar as especificações dos materiais de laboratório juntamente com as opções compatíveis conhecidas. |
| Documento n.º 100000078751 v02 | Fevereiro de 2020 | <ul style="list-style-type: none"> • Atualizada as informações do desempenho clínico para transmitir melhor as diferenças entre os tipos de triagem básica e genômica ampla. • Adicionadas novas diferenças do desempenho das triagens básica e genômica ampla. • Removidas informações contraditórias sobre a opcionalidade do relatório suplementar da seção Princípios do procedimento. • Atualizada a convenção de nomenclatura do software VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 ao longo do documento para consistência de estilo. • Atualizada a rotulagem dos endereços da Illumina Austrália e Países Baixos para refletir alterações recentes. |
| Documento n.º 100000078751 v01 | Agosto de 2019 | Removida a etapa em duplicidade de Extrair cfDNA causada por erro do software de publicação. |
| Documento n.º 100000078751 v00 | Maio de 2019 | Versão inicial. |

Patentes e marcas comerciais

Este documento e seu conteúdo são de propriedade da Illumina, Inc. e de suas afiliadas (“Illumina”) e destinam-se exclusivamente ao uso contratual de seu cliente com relação ao uso dos produtos descritos neste documento e para nenhuma outra finalidade. Este documento e seu conteúdo não devem ser usados ou distribuídos para nenhuma outra finalidade nem comunicados, divulgados ou reproduzidos de nenhuma forma sem o consentimento prévio por escrito da Illumina. A Illumina não concede nenhuma licença sob seus direitos de patente, marca comercial, direitos autorais ou lei comum, nem direitos semelhantes de terceiros por meio deste documento.

As instruções neste documento devem ser estrita e explicitamente seguidas por pessoal devidamente treinado e qualificado para garantir o uso adequado e seguro dos produtos descritos neste documento. Todo o conteúdo deste documento deve ser lido e compreendido por completo antes da utilização de tais produtos.

NÃO LER COMPLETAMENTE E NÃO SEGUIR EXPLICITAMENTE TODAS AS INSTRUÇÕES AQUI CONTIDAS PODE RESULTAR EM DANOS AO(S) PRODUTO(S), FERIMENTOS A PESSOAS, INCLUSIVE USUÁRIOS OU OUTROS, E DANOS A OUTROS BENS, ANULANDO TODA GARANTIA APLICÁVEL AO(S) PRODUTO(S).

A ILLUMINA NÃO SE RESPONSABILIZA POR QUALQUER PROBLEMA CAUSADO PELO USO INDEVIDO DO(S) PRODUTO(S) MENCIONADO(S) ACIMA (INCLUINDO PARTES SEPARADAS OU O SOFTWARE).

© 2021 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

Informações de contato



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Califórnia 92122, EUA.

+1 (800) 809-ILMN (4566)

+1 (858) 202-4566 (fora da América do Norte)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

The Netherlands

Patrocinador australiano

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Austrália

Rótulos do produto

Para obter uma referência completa aos símbolos que possam ser exibidos na embalagem e na rotulagem do produto, consulte a chave de símbolos do seu kit em support.illumina.com.

Um Resumo da segurança e do desempenho (Summary of Safety and Performance (SSP)) pode ser encontrado em <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, após a inicialização do European Database on Medical Devices (Eudamed), onde ele está vinculado ao UDI-DI Básico (0081627002NIPTRP).