













































































consistente com um resultado afetado de uma trissomia total. Quer seja numa identificação de duplicação parcial ou numa trissomia total, a gestão de acompanhamento de uma identificação positiva do NIPT oferece ao paciente um teste de confirmação através de diagnóstico pré-natal.

Tabela 12 Exemplos de eventos de duplicação grande identificados no rastreio genómico

	Verdade clínica	Resultado do sistema genómico	Tamanho da anomalia (Mb)	% do cromossoma	Pontuações LLR
Amostra 1	Trissomia 21 unifetal	Duplicação parcial no cromossoma 21	22,50	48,9%	19,43
Amostra 2	Trissomia 18 unifetal	Duplicação parcial no cromossoma 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 Controlo de qualidade utilizadas para reportar resultados de aneuploidia.

### Cromossomas sexuais

Os resultados do cromossoma sexual do VeriSeq NIPT Solution v2 foram comparados com os resultados padrão de referência clínica e estão resumidos na tabela seguinte. A concordância de percentagem foi calculada para cada cromossoma sexual em cada resultado padrão de referência clínica. A concordância de percentagem foi calculada como o número de amostras em que a identificação do cromossoma sexual pelo VeriSeq NIPT Solution v2 correspondeu à classificação padrão de referência clínica, dividido pelo número total de amostras com a mesma classificação padrão de referência clínica.

Tabela 13 Concordância percentual para classificação sexual fetal\*

Classificação sexual fetal		Fenótipo de um exame físico a um recém-nascido		Resultados citogenéticos							
Detetado	Cariótipo	Feminino	Masculino	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Outro**	Em falta
Anomalia não detetada	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Anomalia não detetada	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Anomalia detetada	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Anomalia detetada	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Anomalia detetada	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Anomalia detetada	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Total		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Concordância da percentagem		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	Não aplicável	Não aplicável

\* Cinco gestações de gémeos foram corretamente classificadas com a presença do cromossoma Y. Duas gestações foram corretamente classificadas como ausência do cromossoma Y.

\*\* Outros resultados citogenéticos foram XXXXX e XYY.

## 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 sobre a capacidade do teste para fundamentar decisões clínicas com base na sensibilidade e na especificidade do teste, e testar previamente a probabilidade de um feto ser afetado por trissomia (prevalência). Uma vez que o VPP e o VPN dependem da prevalência e a prevalência destas aneuploidias pode variar em diferentes populações de indivíduos, o VPP e o VPN foram calculados num intervalo de valores de prevalência plausível, com base nos valores de sensibilidade e especificidade observados no rastreio básico (sem mosaicos conhecidos) do estudo de precisão clínica. A [Tabela 17](#) baseia-se no rastreio genómico (com mosaicos conhecidos).

Tabela 14 Prevalência de trissomia 21, VPP e VPN no rastreio básico (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 no rastreio básico (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 no rastreio básico (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 em rastreios genómicos (incluindo mosaicos conhecidos)

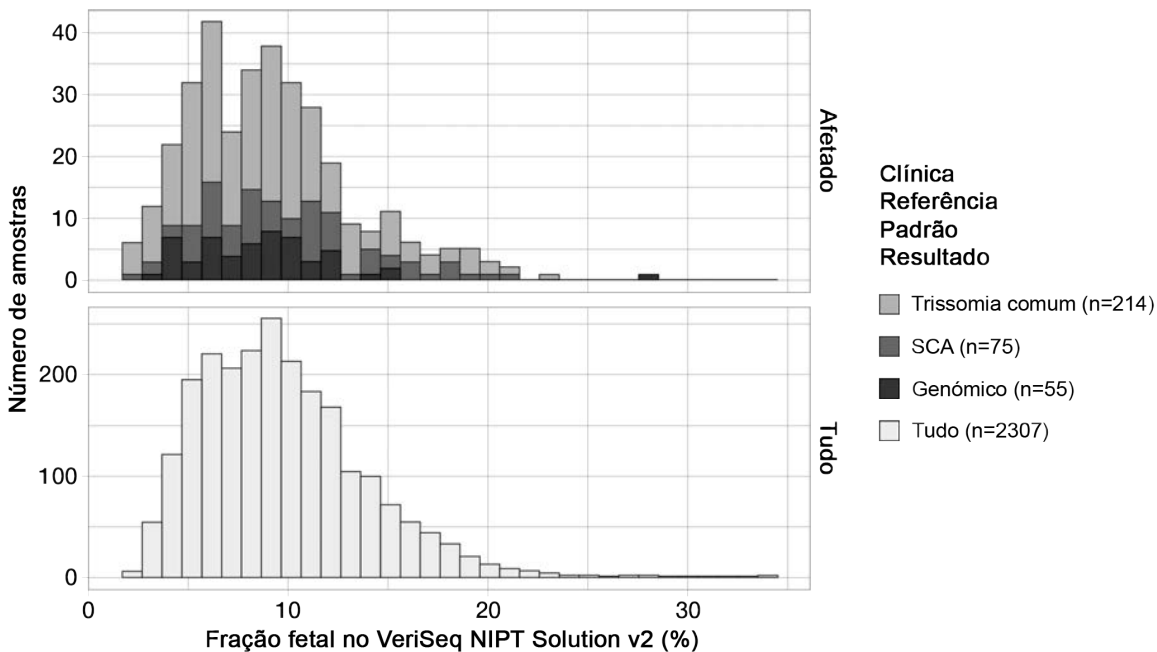
Prevalência (%)	VPP (%)	VPN (%)
0,01	1,42	> 99,99
0,02	2,81	> 99,99
0,05	6,74	> 99,99
0,10	12,64	> 99,99
0,20	22,45	99,99

Prevalência (%)	VPP (%)	VPN (%)
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

As estimativas da distribuição da fração fetal (FF) do VeriSeq NIPT Solution v2 do rastreio do genoma com mosaicos são demonstradas através da categoria do resultado padrão de referência clínica na **Figura 1**.

Figura 1 Distribuição da fração fetal



5 amostras tinham anomalias em várias categorias.

A trissomia comum inclui amostras com trissomia 21, 18 e/ou 13.

Genómico inclui as amostras com RAA ou duplicações e/ou eliminações parciais.

As estimativas da FF variaram entre 2% e 34% no geral com uma mediana de 9% e intervalo interquartil (IQ) de 6% a 12%. A estimativa mediana da FF para trissomias comuns e eventos detetados por rastreio de genoma é de 8% e para SCA é de 9%. O intervalo em estimativas da FF foi consistente em todos os resultados. Não existe desvio aparente na distribuição da FF entre as trissomias comuns, SCA, eventos detetados pelo rastreio genómico ou todas as amostras na análise genómica.

### Desempenho em gestações de gémeos

#### Estimativa do desempenho de Trissomia 13, 18 e 21 e do Cromossoma Y em gestações de gémeos

Devido à baixa prevalência de trissomia 21, 18 e 13 em gestações de gémeos, só estava disponível para o estudo clínico um pequeno número de amostras de gémeos afetadas. Para estimar o desempenho do VeriSeq NIPT Solution v2 em gestações de gémeos, foram utilizados modelos *in silico* baseados em observações de amostras clínicas para simular populações de gestações de gémeos. Esta simulação foi consistente com a população prevista. A distribuição da fração fetal foi determinada através de cerca de 4500 amostras de gémeos e foi comparada com a distribuição de cerca de 120.000 amostras unifetais. A

distribuição da fração fetal condicionada ao estado de aneuploidia foi determinada a partir de supostas identificações de gestações unifetais (1,044 trissomia 21, 307 trissomia 18 e 192 trissomia 13). Combinar as duas distribuições permitiu interferências de detecção de aneuploidia em gémeos. Foram simulados conjuntos de gémeos dizigóticos e monozigóticos e foi obtida uma média ponderada que representasse a sua prevalência na população de utilização prevista (2 dizigóticos: 1 monozigótico) para estimar a sensibilidade. Para a especificidade, foram simulados conjuntos de gémeos não afetados.

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

- ▶ Para gémeos monozigóticos, a fração afetada de cada amostra foi definida para 1,0 porque, nesta situação, a trissomia afeta ambos os gémeos.
- ▶ Para gémeos dizigóticos, assumiu-se que apenas um gémeo era afetado (é extremamente raro ambos os gémeos dizigóticos serem afetados). Os valores de fração fetal afetados foram simulados utilizando as razões de distribuição conhecida de fração fetal, conforme determinado em amostras clínicas de gémeos de sexo dissonante. Foi aplicada uma abordagem conservadora, na qual se assumiu que o gémeo afetado teve sempre a fração fetal mais reduzida dos dois gémeos. Foi aplicado um fator de correção para as frações fetais que em média são inferiores em gestações com trissomia 13 e 18.
- ▶ Para os gémeos não afetados, a fração afetada de cada amostra foi definida para zero.

No caso de gémeos afetados por trissomia 18 ou 13, a fração fetal correspondente à fração afetada da amostra foi reduzida. A redução foi proporcional à redução média da fração fetal observada nos dados clínicos de trissomia 18 ou 13 unifetal versus casos de euploide unifetal.

Tanto a fração fetal global, como a fração afetada de cada amostra simulada foram depois utilizadas para calcular uma pontuação de aneuploidia utilizando o algoritmo padrão do VeriSeq NIPT Solution v2. A sensibilidade foi calculada ao determinar com que frequência as pontuações de aneuploidia para os gémeos afetados simulados eram superiores ao limite de aneuploidia correspondente. Paralelamente, a especificidade foi calculada ao determinar com que frequência as pontuações de aneuploidia para os gémeos não afetados simulados eram inferiores ao limite de aneuploidia correspondente (Tabela 18). Os intervalos de confiança de 95% foram estimados com base no número de amostras clínicas reais de gémeos no conjunto de dados original, que foram classificados como afetados ou não afetados pela trissomia relevante.

Para estimar a sensibilidade do cromossoma Y em amostras de gémeos, foram simulados conjuntos de gémeos XY/XY e XX/XY. Foi feita uma média ponderada representativa da sua prevalência na população prevista (1 XY/XY: 1 XX/XY). Para estimar a especificidade do cromossoma Y em gémeos, foi simulado um conjunto de gémeos XX/XX. Foram simulados os valores globais da fração fetal de acordo com a distribuição conhecida da fração fetal em amostras clínicas de gémeos.

No caso de gémeos XY/XY e XX/XY, as pontuações do cromossoma Y foram estimadas através da relação conhecida entre a fração fetal e as pontuações do cromossoma Y em amostras clínicas unifetais, classificadas como masculino. Apenas no caso de gémeos XX/XY, os valores de fração fetal afetados (p. ex., masculino) foram simulados utilizando as razões de distribuição conhecida de fração fetal observadas entre gémeos da mesma gravidez, conforme determinado em amostras clínicas de gémeos de sexo dissonante. Foi adotada uma abordagem conservadora em que a fração afetada foi selecionada de forma a corresponder ao mais pequeno dos dois gémeos. Para cada amostra simulada XX/XY, a pontuação do cromossoma Y foi multiplicada pela fração afetada.

No caso de gémeos XX/XX, as pontuações do cromossoma Y foram incluídas na amostra a partir dessas pontuações observadas em amostras clínicas unifetais classificadas como feminino. A pontuação do cromossoma Y e a fração fetal global foram depois utilizadas para classificar cada amostra simulada com o cromossoma Y presente ou com o cromossoma Y ausente utilizando o algoritmo padrão do VeriSeq NIPT Solution v2.

A sensibilidade foi calculada determinando a frequência com que os gémeos simulados XY/XY ou XX/XY foram corretamente classificados como tendo o cromossoma Y presente. A especificidade foi calculada ao determinar com que frequência os gémeos XX/XX simulados foram classificados corretamente como tendo o cromossoma

Y ausente. Os intervalos de confiança de 95% foram estimados com base no número de amostras verdadeiras de gémeos clínicos do conjunto de dados original, que foram classificadas como tendo o cromossoma Y presente ou o cromossoma Y ausente.

Tabela 18 Estimativas para trissomia 21, 18 e 13 na população simulada de gestações de gémeos

	Trissomia 21	Trissomia 18	Trissomia 13	Presença de Y
Sensibilidade	96,4%	95,7%	93,6%	> 99,9%
IC 95% bilateral	(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 95% bilateral	(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 estimada de 95% em relação à sensibilidade e à especificidade do VeriSeq NIPT Solution v2 para detetar trissomia 21, 18, 13 e a presença do Y numa população simulada em gestações de gémeos consistente com a população prevista. Os intervalos de confiança foram estimados com base no número de amostras clínicas de gémeos com aprovação de CQ classificadas como afetados ou não afetados pela trissomia relevante. O cálculo da sensibilidade assume que dois terços de gestações de gémeos afetados são dizigóticos com um gémeo afetado, enquanto um terço das gestações de gémeos afetados são monozigóticos com ambos os gémeos afetados.

As estimativas listadas na **Tabela 18** pertencem apenas a gestações de gémeos. Devido a uma prevalência ainda mais baixa, os dados de gestações superiores (trigémeos ou mais) foram insuficientes para estabelecer modelos estatísticos adequados, para prever a precisão da deteção de aneuploidia.

## Desempenho analítico

### Precisão

Para avaliar e quantificar a precisão do ensaio, foi realizada uma nova análise dos dados com o software de pipeline para análise VeriSeq NIPT Solution v2 a partir de dois estudos anteriores do VeriSeq NIPT Solution:

- ▶ Estudo de reprodutibilidade multisite que incluiu três ensaios por três operadores em três locais, com um único lote de reagente para um total de nove ensaios.
- ▶ Estudo de precisão no laboratório que incluiu 12 ensaios num único local utilizando dois ML STARs, dois sistemas de instrumentos de sequenciação e três lotes de reagente de sequenciação.

O objetivo do estudo de precisão era quantificar a precisão do ensaio relativamente à trissomia 21 (T21) e ao cromossoma Y e estimar a variabilidade entre diferentes instrumentos, kits de preparação de bibliotecas e lotes de reagentes de sequenciação.

Foi criado um pool de T21 com 5% de fração fetal combinando o cfDNA extraído do plasma materno de mulheres grávidas (com um feto com T21) e cfDNA extraído de plasma de mulheres não grávidas. Também foi criado um pool de cfDNA materno-masculino (feto XY) com 10% de fração fetal. O painel de amostras para cada estudo em cada ensaio incluiu 4 réplicas com 5% de fração fetal num pool de amostras afetadas por T21 e 20 réplicas com 10% de fração fetal num pool de cfDNA materno-masculino. O exame foi realizado ao longo de 10 dias num total de 21 ensaios para os dois estudos combinados.

A T21 e a presença do cromossoma Y foram selecionados para avaliação com base na representatividade das condições clínicas e da complexidade de deteção de anomalias. Sendo o autossoma humano mais pequeno, o tamanho do cromossoma 21 tem impacto direto na sensibilidade de deteção da T21, especialmente com valores baixos de fração fetal, tais como os que foram utilizados neste estudo. O cromossoma Y, presente no plasma materno, é exclusivamente fetal na origem e, por isso, é mais fácil de detetar no ensaio.

O meio observado e os desvios padrão do cromossoma 21, a pontuação LLR e os valores cromossómicos normalizados (NCV) do cromossoma Y mostraram que a réplica do desvio padrão (DP) era a maior fonte de

variabilidade. A variação entre locais, instrumentos e lotes de reagentes adicionou uma quantidade significativa de variabilidade, conforme demonstrado pela diferença entre o DP total e o DP replicado na [Tabela 19](#) e na [Tabela 20](#).

Tabela 19 Resumo de (Reprodutividade) Multisite, Desvio padrão (DP) de resposta de sequenciação

Resposta	N	Média	DP replicado	DP* de reprodutividade total
Pontuação LLR do cromossoma 21	36	34,43	11,36	11,36
Cromossoma Y NCV	180	190,56	7,96	10,20

\* O total inclui a variabilidade devido ao local, operador, ensaio, dia e réplica.

Tabela 20 Resumo da precisão da resposta de sequenciação no laboratório

Resposta	N	Média	DP replicado	DP* total no Lab
Pontuação LLR do cromossoma 21	48	36,01	9,07	10,25
Cromossoma Y NCV	240	198,68	7,63	7,82

\* O total inclui a variabilidade devido ao instrumento de sequenciação, lote de reagente, operador, ensaio, dia e réplica.

Foi realizado um estudo adicional para comparar a precisão de sequenciação do VeriSeq NIPT Solution v2 (desvio padrão total) utilizando a versão 2.0 de uma célula de fluxo versus a versão 2.5. O estudo incluiu dois tipos de células de fluxos (v2.0 e v2.5), três lotes de kits de sequenciação, quatro sistemas de instrumentos e dois ensaios de sequenciação por combinação para um total de 48 ensaios num único centro. Foi preparado um pool de sequenciação a partir de placas de cfDNA que foram manualmente preparadas. O painel de amostras incluiu 4 réplicas com 5% de fração fetal num pool de amostras afetadas por T21 e 20 réplicas com 10% de fração fetal num pool de cfDNA materno-masculino (feto XY). Os resultados do estudo são apresentados na [Tabela 21](#) e suportam a evidência de que não há diferença na precisão de sequenciação ao utilizar a célula de fluxo v2.0 versus a célula de fluxo v2.5.

Tabela 21 Resumo da precisão da resposta de sequenciação da célula de fluxo v2.0 versus a célula de fluxo v2.5

Resposta	Número de observações por versão	DP* total v2.0	DP* total v2.5	Resultado estatístico**
Pontuação LLR do cromossoma 21	96	9,56	8,44	Equivalente estatístico (valor $p=0,25$ )
Cromossoma Y NCV	480	7,74	7,38	Equivalente estatístico (valor $p=0,38$ )

\* O total inclui a variabilidade devido ao instrumento de sequenciação, lote de reagente, ensaio, dia, réplica.

\*\* Com base no teste F para igualdade das variações (desvios padrão ao quadrado).

## Contaminação cruzada

A contaminação cruzada foi avaliada no fluxo de trabalho de preparação de amostras do VeriSeq NIPT Solution. Foram testados pools de plasma de mulheres não grávidas (XX) e homens adultos (XY) num padrão quadriculado no formato de placa de 96 poços em 4 placas. N = 48 cada para cada amostra feminina e masculina por placa, para um total de 192 amostras femininas e 192 amostras masculinas. Nenhuma das amostras femininas demonstrou a cobertura do cromossoma Y que era estatisticamente mais elevado do que a base estimada, não indicando qualquer contaminação cruzada por parte das amostras masculinas na mesma placa. Não foi observada qualquer contaminação cruzada detetável no VeriSeq NIPT Solution.

## Substâncias potencialmente interferentes

O impacto de substâncias potencialmente interferentes foi avaliado no VeriSeq NIPT Solution através da avaliação do desempenho do ensaio na presença de tais substâncias.



Colocou-se albumina, bilirrubina, hemoglobina e triglicéridos (endógeno) em pools de plasma materno em gestações de um feto feminino (feto XX) não afetado. Foram testados em duas concentrações para cada substância de teste (n=16 para cada). Não foi observada interferência no desempenho do ensaio.

Tabela 22 Substâncias potencialmente interferentes (endógenas)

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

O ADN genómico materno que ocorre naturalmente (gDNA) no plasma também pode interferir potencialmente no desempenho do ensaio, pois pode ser extraído juntamente com o cfDNA fetal. Níveis de ADN genómico a 1,6, 3,3, e 4,9 ng por amostra (correspondente a 1, 2 e 3 desvios padrão acima da concentração média de gDNA esperada após 7 dias de armazenamento de sangue total<sup>12</sup>) foram adicionados ao cfDNA extraído do plasma materno de fetos femininos não afetados (feto XX). As amostras foram depois testadas no VeriSeq NIPT Solution (n=16 para cada concentração). Não foi observada qualquer interferência no desempenho do ensaio na presença de níveis elevados de gDNA.

Vinte substâncias potencialmente interferentes à base de medicamentos (exógenas) que são normalmente utilizadas ou prescritas durante a gravidez foram testadas de acordo com a diretriz EP7-A2 (Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition). As 20 substâncias potencialmente interferentes foram combinadas em quatro pools, colocadas no plasma materno de fetos femininos não afetados (feto XX) e testadas no VeriSeq NIPT Solution (N=16 para cada pool). Não foi observada qualquer interferência no desempenho do ensaio na presença destas substâncias exógenas.

Tabela 23 Substâncias potencialmente interferentes (exógenas)

Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4
Acetaminofeno	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 deteção

O Limite de deteção (LOD) é definido como o nível de fração fetal que corresponde a 95% de probabilidade de deteção de uma condição de interesse, como a T21. Para avaliar o LOD do VeriSeq NIPT Solution v2 em diversas condições comuns, foram realizados estudos e análises estatísticas.

A probabilidade de deteção de uma condição de interesse numa amostra afetada processada pelo VeriSeq NIPT Solution v2 depende principalmente de três fatores:

- ▶ fração fetal
- ▶ profundidade de sequenciação
- ▶ tamanho e complexidade da região genómica de interesse.

Partindo do princípio de que existe uma profundidade de sequenciação constante, uma determinada anomalia é mais fácil de detetar numa amostra com uma percentagem de fração fetal mais elevada, do que numa amostra com uma percentagem de fração fetal mais baixa. Inversamente, partindo do princípio de que existe uma profundidade de fração fetal constante, uma determinada anomalia é mais fácil de detetar numa amostra com uma profundidade de sequenciação mais elevada, do que numa amostra com uma profundidade de

sequenciação mais baixa. Por último, as anomalias em regiões genómicas mais pequenas ou mais complexas são mais difíceis de detetar, do que as anomalias em regiões genómicas maiores ou menos complexas, partindo do princípio de que temos uma fração fetal constante e profundidade de sequenciação.

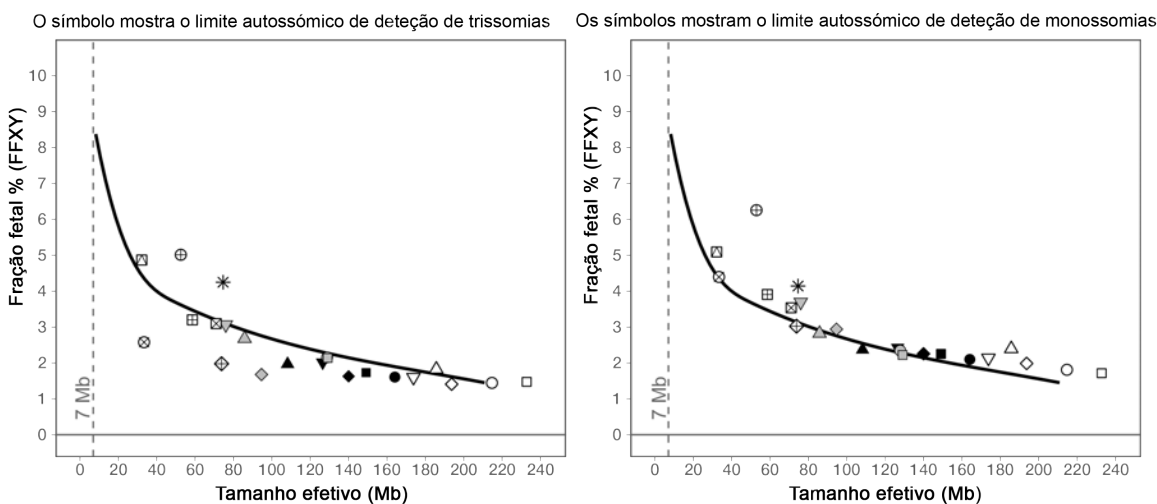
Para determinar o LOD para a deteção de T21, foram analisadas amostras contendo misturas de amostras de pool de T21 e amostras de pool não afetadas. Os dois tipos de analito foram misturados através de uma série de titulação para criar um conjunto de sete níveis de fração fetal (0, 2, 3, 4, 5, 6 e 10%). Cada nível foi representado por um total de 10 réplicas.

Para aumentar mais a resolução da grelha de fração fetal da análise do LOD, os dados deste estudo foram acrescidos com dados obtidos a partir de uma diluição *in silico*. Os efeitos da titulação e diluição experimentais foram simulados através da mistura controlada dos dados de sequenciação. Os dados desta titulação *in silico* abrangeram um conjunto 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 réplicas para cada nível. Uma análise de probit foi aplicada aos dados resultantes para determinar o LOD para T21.

Foi desenvolvido individualmente um modelo estatístico utilizando a fração fetal, a profundidade de sequenciação e o tamanho/complexidade genómicos para prever a probabilidade de deteção de qualquer anomalia em qualquer amostra. Este modelo foi estabelecido a partir dos dados correspondentes a um conjunto de 1405 amostras XY. O LOD para T21, conforme previsto por este modelo, foi determinado para ser concordante com a estimativa à base de probit descrita acima. Este modelo estatístico foi utilizado para estimar valores LOD de aneuploidias em todos os autossomas e para duplicações e eliminações parciais.

A Figura 2 apresenta 95% de probabilidades de deteção para a média de regiões por tamanho e os limites autossómicos de deteção para todas as trissomias e todas as monossomias.

Figura 2 95% de probabilidades de deteção para a média de regiões por tamanho do VeriSeq NIPT Solution v2



Cr	Símbolo	Trissomia		Monossomia	
		Limite LLR	LoD (%)	Limite LLR	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

Cr	Símbolo	Trissomia		Monossomia	
		Limite LLR	LoD (%)	Limite LLR	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

### VeriSeq NIPT Solution v2 Resolução de problemas

Modo de falha	Resultado possível	Interpretação	Ação recomendada	Comentários
Insufficient input plasma (Introdução insuficiente de plasma)	Falha do controlo de qualidade da amostra	Volume de plasma insuficiente	Repetir colheita	Baseada na inspeção visual do volume do plasma.
Blood tube failure (Falha do tubo de sangue)	Sem separação de sangue em camadas	A amostra não foi centrifugada	Certifique-se de que a centrifugação começou e que o tubo foi rodado com a força correta. Repita a colheita da amostra.	
		Armazenamento ou transporte indevido da amostra (hemólise da amostra)	Repita a colheita da amostra.	As amostras congeladas não se separam. Condições de armazenamento ou transporte indevidos podem causar a hemólise das amostras.
Sample clog / Slow flow (Coágulo da amostra/fluxo lento)	Contaminação de plasma	As amostras individuais podem coagular a placa de ligação se existir contaminação significativa na amostra de plasma	Inspeccione a amostra. Se o plasma restante no tubo estiver vermelho ou turvo, cancele a amostra e peça uma nova colheita. Se a amostra tiver um aspeto normal, repita o teste da amostra.	
	Excesso de amostra	Inspeção visual inadequada de cada tubo para a adequação da amostra	Invalide quaisquer amostras nos poços circundantes afetados pelo excesso.	Poderá indicar uma condição de armazenamento ou transporte incorreta da amostra antes do processamento. Deve excluir as amostras inadequadas do processamento.
	Avaria de hardware	Digestão inadequada do material durante a extração	Repita o teste da amostra. Se o problema persistir na localização de poços com outras amostras, contacte o Suporte Técnico da Illumina.	

Modo de falha	Resultado possível	Interpretação	Ação recomendada	Comentários
Quantification QC failure (Falha do controlo de qualidade de quantificação)	Falha no ensaio de quantificação – Mediana de lote abaixo do mínimo	Processo de produção insuficiente	Repita a quantificação. Se a repetição também falhar, contacte o Suporte Técnico da Illumina.	Os indicadores de curva padrão de aprovação indicam um problema na preparação da biblioteca.
	Falha no ensaio de quantificação	Falha da curva padrão	Repita a quantificação. Se a repetição também falhar, contacte o Suporte Técnico da Illumina.	As causas comuns da falha da curva padrão incluem o descongelamento inadequado de reagentes de quantificação, volumes inconsistentes em poços devido a derrames e a degradação do reagente de quantificação de ADN (por exemplo, devido à exposição à luz).
Pooling Failure (Falha no pooling)	Falha ao concluir o pooling de amostras	A análise do pooling não conseguiu calcular os volumes adequados de pool	Avalie novamente a concentração de pool alvo, repita a análise do pooling.	Pode ocorrer quando todas as amostras de um lote tiverem valores de quantificação baixos, depois de definir um pool de concentração elevada (normalmente superior a 3 - 5 pm).
Individual Sample Analysis QC failure (Falha do controlo de qualidade da análise de amostra individual)	Falha do controlo de qualidade de sequenciação	Entrada genética insuficiente OU transferência incorreta durante o manuseamento de amostras OU falha do reagente de sequenciação	Verifique a anotação de amostras. Verifique se existe um desempenho semelhante em amostras anteriores na mesma posição da placa. Repita o teste da amostra.	Indica a introdução de uma amostra de má qualidade ou uma transferência incorreta no ML STAR. O material genético insuficiente pode dever-se a insuficiente ADN livre no plasma ou ADN baseado em células, causando a diluição excessiva da amostra para sequenciação.
	Contagem baixa de FF ou locais não excluídos (NES)	Dados insuficientes gerados para criar relatório preciso	Repita o teste de plasma.	

## Resolução de problemas do VeriSeq NIPT Microlab STAR

Passo do processo	Código de erro	Caixa de diálogo do erro	Descrição	Resolução por parte do utilizador
Criação de lotes	EM0044	The Batch ID entered contains forbidden characters. (O ID do lote introduzido contém caracteres proibidos).	O VeriSeq NIPT Solution v2 só aceita caracteres de números, letras, sublinhado e traços em todos os campos de dados.	Atribua um nome ao lote que não contenha nenhum carácter de texto especial.
Criação de lotes	EM0051	The Batch ID is greater than 26 characters in length. (O ID do lote é superior a 26 caracteres).	O VeriSeq NIPT Solution v2 limita o comprimento dos nomes de lote a 26 caracteres ou menos.	Atribua um nome ao lote com menos de 26 caracteres.

Passo do processo	Código de erro	Caixa de diálogo do erro	Descrição	Resolução por parte do utilizador
Criação de lotes	EM0076	Unable to connect to VeriSeq Onsite Server v2 (Não foi possível ligar ao VeriSeq Onsite Server v2).	O VeriSeq Onsite Server v2 deixou de responder aos pedidos de dados do Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho).	Certifique-se de que: 1. O ML STAR está ligado à rede. 2. O VeriSeq Onsite Server v2 está ligado. 3. É possível ligar o ML STAR ao VeriSeq Onsite Server v2 (através de pedido de ping). 4. Se os passos acima não resolverem o problema, envie um e-mail para o Suporte Técnico da Illumina. 5. Verifique se o frasco de resíduos de vácuo está mais de meio. Se estiver, esvazie o frasco de resíduos.
Criação de lotes	EM0118	This batch has been failed and cannot be further processed. (Este lote falhou e não pode ser processado).	O lote especificado já falhou e não pode mais ser processado.	O registo do lote no VeriSeq Onsite Server v2 indica que o lote selecionado falhou. Não são permitidos mais processamentos. Crie outro lote com as amostras pretendidas.
Criação de lotes	N/D	This batch has already completed processing. Would you like to repool? (Este lote já concluiu o processamento. Pretende repetir o pool?)	O lote indicado foi processado através de pooling. O único processamento permitido é a repetição do pool.	Para repetir o pool, selecione <b>Re-Pool</b> (Repetir pool). OU Interrompa o método e verifique novamente o Nome do lote.
Isolamento do plasma	WP0087	Duplicate sample barcodes loaded. (Foram carregados códigos de barras de amostras duplicados).	Foram carregadas no sistema amostras com códigos de barras idênticos.	1. Siga as instruções do Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho) para identificar as amostras duplicadas. 2. Remova essas amostras e coloque uma nova etiqueta ou substitua as mesmas. 3. Volte a carregar as amostras.
Isolamento do plasma	EP0102	Samples specified in the Sample Sheet were not loaded. (As amostras especificadas na ficha de amostras não foram carregadas).	As amostras incluídas na ficha de amostras não foram incluídas nos códigos de barras carregados.	1. Siga as instruções do Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho) para identificar as amostras em falta. 2. Adicione as amostras em falta ao lote e volte a carregar as amostras OU Interrompa o método, modifique a ficha de amostras conforme necessário, reinicie o método.

Passo do processo	Código de erro	Caixa de diálogo do erro	Descrição	Resolução por parte do utilizador
Carregamento de placas	N/D	Venus Barcode Mask Error (Erro de máscara de código de barras Venus)	O Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho) executa a associação correta placa-lote com as máscaras de código de barras Venus.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Verifique a colocação da placa para confirmar que a disposição da placa está correta.</li> <li>2. Certifique-se de que a placa carregada é a placa correta para o lote indicado.</li> </ol>
Extração de cfDNA	WE0150	Pressure in the vacuum chamber is too low. (A pressão na câmara de vácuo é demasiado baixa).	O Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho) não continua se o sensor de pressão da linha de vácuo em repouso for < 400 Torr.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Verifique se existem dobras ou outras obstruções na linha de vácuo.</li> <li>2. Abra os grampos de desengate da linha de resíduos, deixe sair a pressão e feche totalmente os grampos de desengate da linha.</li> <li>3. Certifique-se de que o controlador de vácuo e a bomba estão ligados.</li> <li>4. Se o problema persistir, contacte o Suporte Técnico da Illumina.</li> </ol>
	WE0153	Pressure in the vacuum chamber is too high. (A pressão na câmara de vácuo é demasiado alta).	Se a pressão de vácuo medida estiver demasiado alta antes de iniciar o controlo de pressão, o sistema pode funcionar incorretamente.	Na parte de trás do controlador, certifique-se de que todas as ligações e linhas de vácuo estão fixas.
	WE0996	Vacuum failed to seal. (Falha ao selar o vácuo).	O sistema não consegue selar o vácuo na placa de ligação.	<p><b>NOTA: não seleccione OK até que a falha de selagem esteja completamente resolvida.</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Certifique-se de que a placa de ligação está nivelada com o tubo de vácuo. Utilize uma luva na mão para pressionar com força a placa de ligação para baixo.</li> <li>2. Seleccione <b>OK</b> para continuar a extração de cfDNA.</li> <li>3. Se esta mensagem de erro for apresentada mais de três vezes num ensaio, envie um e-mail ao Suporte Técnico da Illumina.</li> </ol>
	WM0219	If Vacuum is on, manually rest the pump. (Se o vácuo estiver ligado, coloque a bomba em repouso manualmente).	O vácuo pode ficar ligado após interromper um método durante a extração.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. No controlador de vácuo, prima o botão Power (Alimentação) para desligar o vácuo.</li> <li>2. Aguarde 10 segundos e, em seguida, prima o botão Power (Alimentação) novamente para ligar o vácuo.</li> </ol>

Passo do processo	Código de erro	Caixa de diálogo do erro	Descrição	Resolução por parte do utilizador
	EE0477	An error has occurred while moving a plate. (iSWAP error) (Ocorreu um erro ao mover uma placa [erro iSWAP]).	Se ocorrer um erro iSWAP (queda da placa, falha ao pegar, etc.), o sistema solicita ao utilizador que conclua o movimento da placa manualmente.	Certifique-se de que é possível recuperar a placa (sem material derramado). - Caso contrário, interrompa o ensaio. - Em caso afirmativo, siga as instruções apresentadas 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 registo).	A placa de ligação carregada não corresponde ao código de barras da placa removida.	Certifique-se de que a placa carregada corresponde ao código de barras registado (consulte o registo de traçado do código de barras esperado).
API	EA0372	Unable to connect to the data server. (Não foi possível ligar ao servidor de dados).	O VeriSeq Onsite Server v2 deixou de responder aos pedidos de dados do Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho).	Certifique-se de que: 1. O ML STAR está ligado à rede. 2. É possível ligar o ML STAR ao VeriSeq Onsite Server v2 (através de pedido de ping). 3. O VeriSeq Onsite Server v2 está ligado.
	EA0774	Connection Error The API server connection failed to validate. (Erro de ligação. A validação da ligação ao servidor API falhou).	O VeriSeq Onsite Server v2 deixou de responder aos pedidos de dados do Workflow Manager (Gestor de fluxo de trabalho).	Certifique-se de que: 1. O ML STAR está ligado à rede. 2. É possível ligar o ML STAR ao VeriSeq Onsite Server v2 (através de pedido de ping). 3. O VeriSeq Onsite Server v2 está ligado.
	EA0780	403: Invalid Request The current transaction is not valid. (403: Pedido inválido. A transação atual não é válida).	Os dados enviados violam a lógica do fluxo de dados do sistema.	Consulte os detalhes de erro para obter mais informações. As causas comuns envolvem dados demasiado longos ou 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 1000000078751 v06	Agosto de 2021	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atualizado o endereço do Representante autorizado da UE.</li> </ul>
Documento n.º 1000000078751 v05	Dezembro de 2020	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atualização das secções Princípios do procedimento, Avisos e precauções e Etiquetas do produto com esclarecimentos adicionais de forma a cumprir os requisitos regulamentares.</li> <li>• Pequenas atualizações no conteúdo do protocolo para corresponder ao estilo e organização atual da Illumina.</li> <li>• Correção da descrição do cromossoma 21 de "o segundo autossoma humano mais pequeno" para "o autossoma humano mais pequeno" na secção Precisão do Desempenho analítico.</li> <li>• Adição de declarações de atenção para abordar a utilização incorreta de reservatórios e riscos de junção de amostras nas secções de Preparação de plasma isolado e Interpretação dos resultados.</li> <li>• Adição de novas referências de servidor e software para a publicação de um novo modelo de servidor e atualizações de referência de software.</li> <li>• Adição de precauções ao protocolo e informações de resolução de problemas para abordar o impedimento de excessos de amostra.</li> <li>• Atualização dos ingredientes ativos no reagente padrão de quantificação de ADN na Caixa de acessórios para estar de acordo com a ficha de dados de segurança.</li> <li>• Atualização das convenções de atribuição de nomes do módulo VeriSeq NIPT do Local Run Manager para fins de consistência com outra documentação.</li> <li>• Adição do histórico de revisões.</li> </ul>
Documento n.º 1000000078751 v04	Outubro de 2020	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pequenas correções.</li> </ul>
Documento n.º 1000000078751 v03	Setembro de 2020	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atualização da lista de materiais para apresentar as especificações do material de laboratório em conjunto com as opções compatíveis conhecidas.</li> </ul>
Documento n.º 1000000078751 v02	Fevereiro de 2020	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atualização da apresentação de informações relativas ao desempenho clínico, para transmitir de melhor forma as diferenças entre os tipos de rastreio básico e genómico.</li> <li>• Adição da nova secção Diferenças no desempenho entre o rastreio básico e genómico.</li> <li>• Remoção de informação contraditória sobre a opção do relatório complementar da secção Princípios do procedimento.</li> <li>• Atualização da convenção de atribuição de nomes do software VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 ao longo do documento para consistência estilística.</li> <li>• Atualização das etiquetas para os endereços da Austrália e Illumina Netherlands, para refletir as alterações recentes.</li> </ul>
Documento n.º 1000000078751 v01	Agosto de 2019	Remoção do passo duplicado em Extração de cfDNA causado por um erro do software de publicação.
Documento n.º 1000000078751 v00	Maió de 2019	Edição inicial.

## Patentes e marcas comerciais

Este documento e respetivo conteúdo são propriedade da Illumina, Inc. e das suas afiliadas ("Illumina") e destinam-se unicamente a utilização contratual por parte dos clientes relativamente à utilização dos produtos descritos no presente documento e para nenhum outro fim. Este documento e respetivo conteúdo não podem ser utilizados ou distribuídos para qualquer outro fim e/ou de outra forma transmitidos, divulgados ou reproduzidos por qualquer via, seja de que natureza for, sem a autorização prévia por escrito da Illumina. A Illumina não concede qualquer licença ao abrigo da sua patente, marca comercial, direito de autor ou direitos de jurisprudência nem direitos semelhantes de quaisquer terceiros por via deste documento.

As instruções contidas neste documento têm de ser estrita e explicitamente seguidas por pessoal qualificado e com a devida formação para garantir a utilização adequada e segura dos produtos aqui descritos. Todo o conteúdo deste documento tem de ser integralmente lido e compreendido antes da utilização dos referidos produtos.

A NÃO OBSERVÂNCIA DA RECOMENDAÇÃO PARA LER INTEGRALMENTE E SEGUIR EXPLICITAMENTE TODAS AS INSTRUÇÕES AQUI CONTIDAS PODE RESULTAR EM DANOS NOS PRODUTOS, LESÕES EM PESSOAS, INCLUINDO NOS UTILIZADORES OU OUTROS, E EM DANOS MATERIAIS, E IRÁ ANULAR QUALQUER GARANTIA APLICÁVEL AOS PRODUTOS.

A ILLUMINA NÃO ASSUME QUALQUER RESPONSABILIDADE RESULTANTE DA UTILIZAÇÃO INADEQUADA DOS PRODUTOS AQUI DESCRITOS (INCLUINDO PARTES DOS MESMOS OU DO SOFTWARE).

© 2021 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

Todas as marcas comerciais são propriedade da Illumina, Inc. ou dos respetivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Informações de contacto



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 EUA

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (fora da América do Norte)

[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

[www.illumina.com](http://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

## Etiquetas do produto

Para uma referência completa dos símbolos que podem ser apresentados nas embalagens e etiquetas do produto, consulte a chave de símbolos para o seu kit em [support.illumina.com](http://support.illumina.com).

Pode encontrar um Resumo de segurança e desempenho (SSP, Summary of Safety and Performance) em <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, após o lançamento da base de dados europeia para os dispositivos médicos (Eudamed), onde está associado ao UDI-DI básico (0081627002NIPTRP).