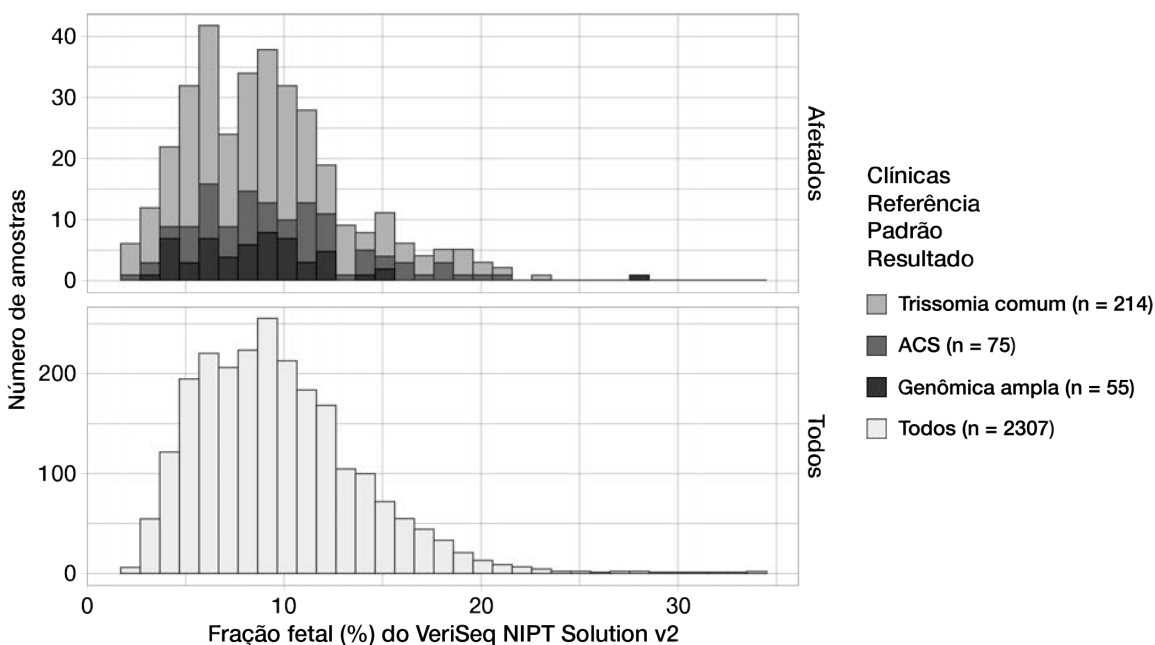


Prevalência (%)	VPP (%)	VPN (%)
0,10	12,64	>99,99
0,20	22,45	99,99
0,50	42,07	99,98
1,00	59,34	99,95
1,50	68,75	99,93
2,00	74,68	99,91

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.

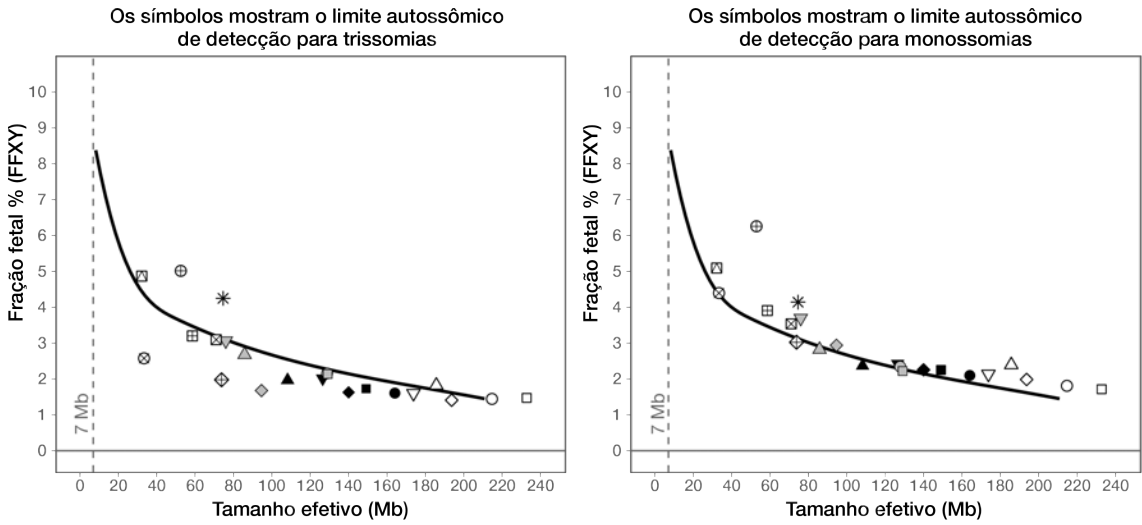
Para determinar o LOD para detecção de T21, foram analisadas amostras constituídas por misturas de amostras de pool de T21 e amostras de pool não afetadas. Os dois tipos de analitos foram misturados em uma série de titulação para criar um grupo de sete níveis de fração fetal (0, 2, 3, 4, 5, 6 e 10%).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