

Instrucciones de uso

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

Uso previsto

VeriSeq NIPT Solution v2 es una prueba diagnóstica *in vitro* concebida para su uso como prueba de cribado para la detección de anomalías genéticas fetales del genoma completo a partir de muestras de sangre completa periférica materna de mujeres embarazadas de un mínimo de 10 semanas de gestación.

VeriSeq NIPT Solution v2 usa la secuenciación del genoma completo para detectar duplicaciones y deleciones parciales de todos los autosomas, así como el estado de aneuploidía de todos los cromosomas. La prueba ofrece la opción de solicitar un informe sobre aneuploidía de cromosomas sexuales (SCA, Sex Chromosome Aneuploidy). Este producto no debe usarse como la única base para el diagnóstico ni para la toma de decisiones en relación con el embarazo.

VeriSeq NIPT Solution v2 incluye: VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 para VeriSeq NIPT Microlab STAR, VeriSeq NIPT Sample Prep y VeriSeq Onsite Server v2 con VeriSeq NIPT Assay Software v2.

VeriSeq NIPT Solution v2 está diseñada para su uso con un secuenciador de nueva generación.

Resumen y explicación del ensayo

Las anomalías cromosómicas, específicamente la aneuploidía (un número anormal de cromosomas), son una causa habitual de incapacidad reproductiva, anomalías congénitas, retraso en el desarrollo y discapacidad intelectual. La aneuploidía afecta aproximadamente a 1 de cada 300 nacidos vivos, y la tasa de aborto o muerte fetal es mucho más elevada.^{1,2} Hasta hace muy poco, había dos tipos de pruebas prenatales para estos trastornos: pruebas diagnósticas o cribados. Las pruebas diagnósticas llevan aparejados procedimientos invasivos como la amniocentesis o la biopsia de vellosidades coriónicas. Estos métodos se consideran los métodos de referencia para la detección de la aneuploidía fetal. Sin embargo, están asociados con un riesgo de pérdida del embarazo de entre el 0,11 % y el 0,22 %.³ Las pruebas de detección de marcadores múltiples no conllevan riesgo de pérdida del embarazo, ya que no son invasivas, con unas tasas de detección de trisomía del 21 que oscilan entre el 69 % y el 96 %, en función de la detección concreta, la edad de la madre y el tiempo de gestación en el momento de la prueba.⁴ Lo importante es que la tasa de falsos positivos es de un 5 % aproximadamente, por lo que puede necesitarse una confirmación mediante pruebas diagnósticas, que, como se ha mencionado, conllevan un riesgo de pérdida del embarazo.⁴ Los cribados mediante ecografía también pueden detectar anomalías cromosómicas, pero su grado de precisión es aún menor que el de los otros métodos mencionados.

La aneuploidía fetal de los cromosomas 21, 18, 13, X e Y se puede detectar con un alto grado de precisión mediante una prueba prenatal no invasiva (NIPT) con secuenciación del genoma completo del ADN sin células (cfDNA) obtenido del plasma materno a partir de la décima semana de gestación. De un metaanálisis más reciente que comprende varios estudios clínicos se desprenden las siguientes tasas de detección y especificidades agrupadas y ponderadas para la trisomía del 21 y la trisomía del 18 en embarazos con un único

embrión: para la trisomía del 21, 99,7 % y 99,96 % y para la trisomía del 18, 97,9 % y 99,96 %, respectivamente.⁵ En un estudio se sugiere que el uso de NIPT como herramienta de detección principal en todos los embarazos podría reducir un 89 % el número de procedimientos invasivos de confirmación.⁶

La reducción significativa de las tasas de falsos positivos de las NIPT, en comparación con el cribado de marcadores múltiples convencional, ha llevado a numerosas organizaciones de profesionales sanitarios a publicar comunicados en los que muestran su apoyo al uso de las NIPT.

En concreto, la International Society for Prenatal Diagnosis (ISPD), el American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)/Society for Maternal Fetal Medicine (SMFM), el American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) y la European Society of Human Genetics/American Society of Human Genetics se muestran a favor de que se ofrezcan NIPT a todas las mujeres embarazadas.^{7,8,9} Se recomienda ofrecer asesoramiento antes de la prueba, incluir un consentimiento informado y una prueba diagnóstica para confirmar un resultado positivo de la detección de ADN sin células.⁴

VeriSeq NIPT Solution v2 es una prueba de diagnóstico in vitro (DIV) no invasiva que utiliza secuenciación del genoma completo de fragmentos de ADN sin células procedentes de muestras de sangre completa periférica materna a partir de la décima semana de gestación. La prueba ofrece dos opciones para los tipos de cribado: básico y del genoma completo. El cribado básico proporciona información sobre la presencia de aneuploidías de los cromosomas 21, 18, 13, X e Y. Los cribados del genoma completo proporcionan información sobre la presencia de duplicaciones y deleciones parciales para todos los autosomas, así como de aneuploidías de todos los cromosomas. Ambos tipos de cribado ofrecen la opción de informar sobre aneuploidía del cromosoma sexual (SCA), con posibilidad de informar o no sobre el sexo del feto. Es posible desactivar la opción de informar sobre SCA. Si se desactiva la opción de informar sobre SCA, tampoco se informará sobre el sexo del feto. Para obtener más información sobre las opciones para informar sobre el sexo, consulte la *Guía de software de VeriSeq NIPT Solution v2 (n.º de documento 1000000067940)*.

Principios de procedimiento

VeriSeq NIPT Solution v2 es una solución automatizada para pruebas de NIPT en laboratorio, que consiste en la preparación de muestras y en el análisis de datos de secuenciación. Los kits VeriSeq NIPT Sample Prep constan de reactivos especializados de un solo uso que se usan junto con VeriSeq NIPT Microlab STAR para preparar lotes de 24, 48 o 96 muestras para la secuenciación de nueva generación. Los datos de secuenciación “paired-end” del genoma completo se analizan mediante software especializado, VeriSeq NIPT Assay Software v2, y se genera un informe que proporciona resultados cualitativos.

El flujo de trabajo consta de los procedimientos siguientes: recogida de muestras, aislamiento del plasma, extracción de ADN sin células, preparación de librerías, cuantificación de librerías, agrupación de librerías, secuenciación y análisis. A continuación, se describe con más detalle cada uno de los procedimientos:

- **Recogida de muestras:** 7-10 ml de sangre completa periférica materna en un tubo de recogida de sangre (BCT) Streck para ADN sin células, que evita la lisis celular y la contaminación genómica, además de estabilizar la sangre completa.

- **Aislamiento del plasma:** el plasma se aísla de la sangre completa periférica materna durante 5 días contados a partir de la recogida. Este aislamiento se logra mediante técnicas de centrifugado estándar. VeriSeq NIPT Microlab STAR aspira y dispensa el plasma en una placa de 96 pocillos profundos para el procesamiento siguiente. En caso de que sea necesario volver a realizar las pruebas, las muestras posprocesamiento pueden volver a taparse y almacenarse a 4 °C durante un periodo de cinco días más (hasta un total de diez días desde la recogida de la sangre).

**PRECAUCIÓN**

Superar los tiempos de almacenamiento indicados puede afectar de manera negativa a las tasas de error de las muestras individuales.

- **Extracción de ADN sin células:** la purificación del ADN sin células a partir de plasma se logra mediante la adsorción en una placa de unión, el lavado de la placa de unión para eliminar los contaminantes y la elución.
- **Preparación de librerías:** los fragmentos purificados de ADN sin células se someten a un proceso de reparación para convertir los 5' y 3' protuberantes en extremos romos. A continuación, se añade un nucleótido de desoxiadenosina a los extremos 3' para crear un protuberante de base individual. Los adaptadores indexados que contienen un 3' protuberante de desoxitimidina de base sencilla se ligan entonces a los fragmentos de ADN sin células procesados. El ADN ligado se purifica mediante bolas de inmovilización inversa de fase sólida. Cada muestra de un conjunto de 24, 48 o 96 recibe un adaptador indexado único. Los adaptadores cumplen dos funciones:

**PRECAUCIÓN**

Extreme las precauciones para evitar la contaminación cruzada de los índices, lo que podría dar lugar a resultados incorrectos.

- Los índices permiten la identificación de muestras en la secuenciación siguiente.
- Los adaptadores de índices contienen secuencias que permiten capturar librerías en la superficie sólida de una celda de flujo de secuenciación para la generación de grupos y la posterior secuenciación.
- **Cuantificación:** el producto de la librería se cuantifica mediante un colorante fluorescente cuya concentración viene dada por la comparación con una curva estándar de ADN.
- **Secuenciación y agrupamiento de librerías:** las librerías de muestras se agrupan en grupos de 24 o 48 muestras en cantidades que se ajustan para minimizar la variación de la cobertura. Cada grupo se secuencia luego mediante un sistema de secuenciación de nueva generación.
- VeriSeq NIPT Solution v2 no incluye el equipo de secuenciación ni los consumibles.
- **Análisis.** Para cada muestra, el análisis consiste en lo siguiente:
 - Identificación de los fragmentos de la librería según secuencia de índice y alineación de las lecturas "paired-end" con un genoma humano de referencia.
 - Estimación de la fracción fetal de la librería combinando la información de distribución de la longitud y de las coordenadas genéticas de los fragmentos de la librería.

- Tras descartar las tendencias conocidas, un modelo estadístico detecta las regiones del genoma que están sobrerrepresentadas o infrarrepresentadas en la librería de una forma compatible con una anomalía en el nivel estimado de fracción fetal.
- El informe NIPT ofrece los resultados resumidos del menú de prueba seleccionado en los que se indica ANOMALY DETECTED (ANOMALÍA DETECTADA) o NO ANOMALY DETECTED (ANOMALÍA NO DETECTADA) junto con una estimación de la fracción fetal para las muestras que superan el CC.
- El informe complementario proporciona criterios de medición cuantitativos que caracterizan cada anomalía detectada.

Limitaciones del procedimiento

Limitaciones del ensayo

- Las pruebas relativas a la sensibilidad y especificidad de la prueba cubren tanto embarazos de un único embrión como gemelares. Estas instrucciones de uso no proporcionan datos de sensibilidad ni especificidad para embarazos de trillizos o embarazos múltiples de orden superior.
- VeriSeq NIPT Solution v2 no está diseñada para la detección de poliploidías, tales como triploidías.
- VeriSeq NIPT Solution v2 no está diseñada para la detección de reordenamientos cromosómicos equilibrados.
- Para el ensayo hacen falta muestras de sangre completa periférica materna de mujeres embarazadas de un mínimo de 10 semanas de gestación.
- En el caso de cribados básicos, la prueba de VeriSeq NIPT Solution v2 busca anomalías cromosómicas específicas. Los informes con el resultado NO ANOMALY DETECTED (NO SE HAN DETECTADO ANOMALÍAS) no eliminan la posibilidad de que existan anomalías cromosómicas de los cromosomas probados. Un resultado negativo tampoco elimina la posibilidad de que el embarazo presente otras anomalías cromosómicas, afecciones genéticas o anomalías congénitas (por ejemplo, anomalía de tubo neural abierto).
- En el caso de cribados del genoma completo, las deleciones y duplicaciones grandes que son inferiores al 75 % del tamaño del cromosoma pueden indicar aneuploidía del cromosoma completo.
- En el caso de cribados del genoma completo, determinadas regiones quedan excluidas del análisis. En el sitio web de asistencia de Illumina encontrará una lista de dichas regiones excluidas. La detección de anomalías genómicas solo se realiza en las regiones que no están excluidas.
- La generación de informes sobre el sexo del feto no está disponible en todas las regiones, debido a las normativas locales aplicables a la generación de informes sobre el género del feto.
- Sobre la base de los datos recogidos en la bibliografía, los resultados del cribado del ADN sin células se pueden confundir debido a determinados factores maternos y fetales. He aquí algunos ejemplos:
 - Transfusión de sangre materna reciente
 - Trasplante de órgano/de células madre materno previo

- Enfermedad autoinmunitaria materna
- Neoplasias maternas (benignas y malignas)
- Mosaicismo materno
- Variaciones en el número de copias maternas
- Mosaicismo fetoplacentario / mosaicismo placentario confinado
- Pérdida del feto / reabsorción fetal

Generación de informes de VeriSeq NIPT Solution v2

- VeriSeq NIPT Solution v2 es una prueba de cribado y no debe utilizarse sin recurrir también a otros signos clínicos y resultados de pruebas. Las conclusiones sobre las posibles dolencias que afecten al feto y la toma de decisiones en relación con el embarazo no deben basarse solo en los resultados del cribado NIPT.⁷
- VeriSeq NIPT Solution v2 informa sobre los siguientes aspectos:
 - El cribado básico analiza la sobrerrepresentación de los cromosomas 13, 18 y 21.
 - El cribado del genoma completo evalúa si existe o no infrarrepresentación o sobrerrepresentación de todos los autosomas, incluidas las deleciones y duplicaciones parciales de como mínimo 7 Mb.
 - En el caso de embarazos de un único embrión en los que se haya seleccionado Yes (Sí) o SCA como opción de generación de informes sobre sexo, también analiza si existen o no las siguientes anomalías de cromosomas sexuales: XO, XXX, XXY y XYY.
 - En el caso de embarazos de un único embrión en los que se haya seleccionado Yes (Sí) como opción de generación de informes sobre sexo, se informa también sobre el sexo del feto.
 - La presencia o ausencia de un cromosoma Y en embarazos gemelares.

Componentes del producto

VeriSeq NIPT Solution v2 (n.º de referencia 20030577) consta de lo siguientes kits de preparación de muestras:

- VeriSeq NIPT Sample Prep (24 samples) (n.º de referencia 20025895)
- VeriSeq NIPT Sample Prep (48 samples) (n.º de referencia 15066801)
- VeriSeq NIPT Sample Prep (96 samples) (n.º de referencia 15066802)

VeriSeq NIPT Solution v2 (n.º de referencia 20030577) consta de lo siguientes componentes de software:

- VeriSeq NIPT Assay Software v2 (n.º de referencia 20047024), preinstalado en el VeriSeq Onsite Server v2.
 - VeriSeq Onsite Server v2 (n.º de referencia 20028403 o 20047000) o un VeriSeq Onsite Server (n.º de referencia 15076164 o 20016240) existente actualizado a v2.
- VeriSeq NIPT Workflow Manager v2, (n.º de referencia 20044988), preinstalado en VeriSeq NIPT Microlab STAR.
 - VeriSeq NIPT Microlab STAR (n.º de referencia de Hamilton Company Reno: 95475-01 (115 V) y 95475-02 (230 V), Hamilton Company Bonaduz: 806288).

- Local Run Manager VeriSeq NIPT Module (n.º de referencia 20044989)

Reactivos

Reactivos suministrados

Illumina suministra los reactivos siguientes: VeriSeq NIPT Sample Prep (24 samples) (n.º de referencia 20025895), VeriSeq NIPT Sample Prep (48 samples) (n.º de referencia 15066801) y VeriSeq NIPT Sample Prep (96 samples) (n.º de referencia 15066802). Los kits VeriSeq NIPT Sample Prep están configurados para su uso con VeriSeq NIPT Microlab STAR (ML STAR) (n.º de referencia 95475-01, 95475-02 o 806288), suministrado por Hamilton Company.

Preparación de muestras de VeriSeq NIPT, caja de extracción

Tabla 1 Caja de extracción VeriSeq NIPT (24) y (48), n.º de referencia 20025869 y 15066803

Nombre del reactivo en la etiqueta	Número de contenedores en el kit	Principios activos	Almacenamiento
Tampón de lisis	1	Clorhidrato de guanidina en solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C
Tampón de lavado I	1	Clorhidrato de guanidina y 2-propanol en solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C
Tampón de lavado II	1	Solución acuosa tamponada con sales.	Entre 15 °C y 30 °C
Tampón de elución	1	Solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C
Tampón de proteinasa	1	Glicerol en solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C
Proteinasa K	3	Proteinasa K liofilizada	Entre 15 °C y 30 °C

Tabla 2 Caja de extracción VeriSeq NIPT (96), n.º de referencia 15066807

Nombre del reactivo en la etiqueta	Número de contenedores en el kit	Principios activos	Almacenamiento
Tampón de lisis	1	Clorhidrato de guanidina en solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C

Nombre del reactivo en la etiqueta	Número de contenedores en el kit	Principios activos	Almacenamiento
Tampón de lavado I	1	Clorhidrato de guanidina y 2-propanol en solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C
Tampón de lavado II	2	Solución acuosa tamponada con sales.	Entre 15 °C y 30 °C
Tampón de elución	1	Solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C
Tampón de proteinasa	1	Glicerol en solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C
Proteinasa K	4	Proteinasa K liofilizada	Entre 15 °C y 30 °C

Preparación de muestras de VeriSeq NIPT, caja de preparación de librerías

Tabla 3 Caja de preparación de librerías VeriSeq NIPT (24) y (48), n.º de referencia 20026030 y 15066809

Nombre del reactivo en la etiqueta	Número de contenedores en el kit	Principios activos	Almacenamiento
Mezcla de reparación de extremos	1	ADN-polimerasa y dNTP en solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Mezcla de A-Tailing	1	ADN-polimerasa y dATP en solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Mezcla de ligadura	1	ADN-ligasa en solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Tampón de hibridación	1	Solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Placa adaptadora de ADN NIPT	1	Oligonucleótidos en solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C

Tabla 4 Caja de extracción VeriSeq NIPT (96), n.º de referencia 15066810

Nombre del reactivo en la etiqueta	Número de contenedores en el kit	Principios activos	Almacenamiento
Mezcla de reparación de extremos	1	ADN-polimerasa y dNTP en solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Mezcla de A-Tailing	2	ADN-polimerasa y dATP en solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Mezcla de ligadura	2	ADN-ligasa en solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Tampón de hibridación	1	Solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Placa adaptadora de ADN NIPT	1	Oligonucleótidos en solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C

Preparación de muestras de VeriSeq NIPT, caja de accesorios

Tabla 5 Caja de accesorios VeriSeq NIPT, n.º de referencia 15066811

Nombre del reactivo en la etiqueta	Número de contenedores en el kit	Principios activos	Almacenamiento
Placa de unión de ADN	1	Microplaca de polipropileno con membrana de silicona modificada	Entre 2 °C y 8 °C
Tampón de resuspensión	1	Solución acuosa tamponada	Entre 2 °C y 8 °C
Bolas de purificación de muestras	1	Bolas paramagnéticas de fase sólida en solución acuosa tamponada	Entre 2 °C y 8 °C
Reactivo de cuantificación de ADN	1	Colorante intercalado para ADN en DMSO	Entre 2 °C y 8 °C
Estándar de cuantificación de ADN	1	ADN bicatenario estándar, ADN no específico y acida sódica en solución acuosa tamponada	Entre 2 °C y 8 °C

Preparación de muestras, tubos de flujo de trabajo y etiquetas para VeriSeq NIPT

Tabla 6 Tubos de flujo de trabajo y etiquetas, n.º de referencia 15071543

Nombre del artículo en la etiqueta	Número de artículos en el kit	Almacenamiento
Etiqueta (LBL): código de barras de placa	9	Entre 15 °C y 30 °C
Etiqueta (LBL): código de barras de placa de pocillos profundos	12	Entre 15 °C y 30 °C
Tubo (TB): tubo de agrupación vacío	5	Entre 15 °C y 30 °C

Reactivos no suministrados**Reactivos necesarios no suministrados**

- Reactivos de secuenciación y consumibles necesarios para el sistema de secuenciación de nueva generación (NGS)
- Agua sin ARNasa ni ADNasa certificada
- Etanol al 100 % (etanol puro), de biología molecular

NOTA El uso de un etanol que no sea de biología molecular puede afectar de manera negativa el rendimiento del ensayo.

Reactivos opcionales, no suministrados

- Solución salina tampón fosfato Dulbecco (DPBS) para control sin cadena molde (NTC)

Conservación y manipulación

1. La temperatura ambiente se define como la temperatura que varía entre 15 °C y 30 °C.
2. Todos los reactivos son de un solo uso. Una vez preparados los reactivos para el uso, deben usarse de inmediato.
3. Si el embalaje o el contenido de los componentes de VeriSeq NIPT Solution resultan dañados o afectados, póngase en contacto con el servicio de atención al cliente de Illumina.
4. Los reactivos son estables si se almacenan siguiendo las indicaciones hasta la fecha de caducidad especificada en las etiquetas de los kits. Para consultar las condiciones de almacenamiento, vea la columna Almacenamiento en las tablas de la sección [Reactivos en la página 6](#). No utilice reactivos caducados.

5. Los cambios en el aspecto físico de los reactivos proporcionados son indicios del deterioro de los materiales. Si se producen cambios en el aspecto físico (p. ej., cambios evidentes en el color del reactivo o un aspecto turbio con contaminación microbiana), no utilice los reactivos.
6. Siga estas prácticas recomendadas para la manipulación de bolas de purificación de muestras:
 - No congele nunca las bolas.
 - Deje que las bolas alcancen la temperatura ambiente antes de usarlas.
 - Justo antes del uso, agite en vórtice las bolas hasta que queden bien suspendidas y el color tenga un aspecto homogéneo.
7. El tampón de lisis, el tampón de lavado I, el tampón de lavado II, el tampón de elución y el tampón de proteinasa pueden formar precipitados o cristales visibles. Antes del uso, agite en vórtice con fuerza y, a continuación, inspeccione visualmente para asegurarse de que no haya precipitados.
8. No congele nunca la sangre completa después de la recogida.
9. Secuencie las librerías lo antes posible tras la agrupación. Las librerías agrupadas son estables durante un periodo máximo de siete días a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C. No hace falta más desnaturalización si se almacenan con las condiciones de tiempo y temperatura descritas.

Materiales y equipo

Materiales y equipo necesarios, no suministrados

Equipo necesario, no suministrado

Equipo	Proveedor
Un sistema de secuenciación de nueva generación (NGS) con las siguientes capacidades: <ul style="list-style-type: none"> • Secuenciación “paired-end” de 2 × 36 pb • Compatible con los adaptadores de índices dobles de preparación de muestras VeriSeq NIPT • Producción automática de archivos .BCL. • Procesos químicos de dos canales • 400 millones de lecturas “paired-end” por experimento • Compatible con VeriSeq NIPT Assay Software v2 o un sistema de secuenciación NextSeq 550Dx 	Proveedor del instrumento o Illumina, n.º de referencia 20005715
Congelador, entre -25 °C y -15 °C	Proveedor de laboratorio general

Equipo	Proveedor
Microcentrifugado	Proveedor de laboratorio general
Ayuda para pipeta	Proveedor de laboratorio general
Refrigerador, entre 2 y 8 °C	Proveedor de laboratorio general
Pipetas de canal único de 20 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas de canal único de 200 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas de canal único de 1000 µl	Proveedor de laboratorio general
Mezclador vorticial	Proveedor de laboratorio general
Centrifugadora y ensamblaje de rotor para tubos de recogida de sangre	
Equivalente:	Proveedor de laboratorio general
<ul style="list-style-type: none"> Centrifugadora refrigerada con capacidad para 1600 × g sin opción de freno Rotor de contenedores móvil con contenedores Accesorios para inserción de contenedores, con capacidad para 24, 48 o 96 tubos, profundidad mínima de 76 mm Adaptadores de inserción que admiten 16 tubos de recogida de sangre de 100 mm 	Beckman Coulter, n.º de artículo 392304 (120 V o 230 V)
Recomendado:	
<ul style="list-style-type: none"> Centrifugadora de la serie Allegra X12R, 1600 g Rotor de la centrifugadora Allegra GH-3.8 con contenedores Cubiertas de los contenedores de la centrifugadora Allegra, conjunto de dos Ensamblaje del adaptador de la centrifugadora Allegra, 16 mm, conjunto de cuatro 	Beckman Coulter, n.º de artículo 369704 Beckman Coulter, n.º de artículo 392805 Beckman Coulter, n.º de artículo 359150
Centrifugador y ensamblaje de rotor para microplacas	

Equipo	Proveedor
<p>Equivalente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrifugadora con capacidad para 5600 × g • Rotor de placa móvil con portaplacas de 96 pocillos, 76,5 mm de profundidad mínima • Multifuge X4 Pro-MD 120V TX-1000BT • Centrifugadora Sorvall Legend XTR • Rotor de microplacas HIGHPlate 6000 • Rotor high plate 6000 <p>Base de apoyo para microplacas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Recomendado: <ul style="list-style-type: none"> • Base de apoyo MicroAmp para 96 pocillos • Portaplacas de PCR de 96 pocillos 	<p>Proveedor de laboratorio general</p> <p>Thermo Scientific VWR, n.º de catálogo 76326-254</p> <p>Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo 75004521 (120 V) o n.º de catálogo 75004520 (230 V)</p> <p>Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo 75003606</p> <p>Thermo Scientific VWR, n.º de catálogo 97040-244</p> <p>Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo 4379590</p> <p>Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo AB-0563/1000</p>
<p>Uno de los siguientes lectores de microplacas, o equivalente, (fluorímetro) con SoftMax Pro v6.2.2 o superior:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gemini XPS • SpectraMax M2, M3, M4 y M5 <ul style="list-style-type: none"> • El lector de microplacas incluye fragmento violeta para su uso en el flujo de trabajo 	<p>Molecular Devices, n.º de referencia XPS</p> <p>Molecular Devices, n.º de referencia M2, M3, M4 y M5</p>
<p>Adaptador USB en serie de alta velocidad SpectraMax</p>	<p>Molecular Devices, n.º de referencia 9000-0938</p>
<p>Ciclador térmico con las especificaciones siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tapa calefactada • Intervalo de temperatura de 4 °C a 98 °C • Precisión de temperatura de ±2 °C • Tasa de incremento mínima de 2 °C por segundo • Compatible con placa Twin.tec PCR de 96 pocillos, de borde completo 	<p>Proveedor de laboratorio general</p>
<p>VeriSeq NIPT Microlab STAR</p>	<p>Hamilton, n.º de referencia 95475-01 (115 V), n.º de referencia 95475-02 (230 V) o n.º de referencia 806288 (para Hamilton Company Bonaduz)</p>

Equipo	Proveedor
VeriSeq Onsite Server v2 o un servidor VeriSeq Onsite Server actualizado	illumina, n.º de referencia 20028403 o 20047000 (v2) o n.º de referencia 15076164 o n.º de referencia 20016240 (actualizado)
Si usa un sistema de secuenciación NextSeq 550Dx: • NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cycles)	illumina, n.º de referencia 20028870

Equipo opcional, no suministrado

Equipo	Proveedor
Sistema decapsulador Pluggo	LGP Consulting, n.º de referencia 4600 4450
Placa de validación de fluorescencia SpectraMax SpectraTest FL1	Molecular Devices, n.º de referencia 0200-5060
Girador/Rotador de tubos, tubos de 15 ml, 40 r/min, 100-240 V	Thermo Scientific, n.º de catálogo 88881001 (EE. UU.) o n.º de catálogo 88881002 (UE)

Materiales necesarios, no suministrados

Consumible	Proveedor
Puntas de filtros no estériles, conductoras, 1000 µl	Hamilton, n.º de referencia 235905
Puntas de filtros no estériles, conductoras, 300 µl	Hamilton, n.º de referencia 235903
Puntas de filtros no estériles, conductoras, 50 µl	Hamilton, n.º de referencia 235948
Depósito de pocillos profundos con las siguientes especificaciones: • Formato de microplaca SLAS 1-2004 con 96 pocillos de base piramidal o cónica y una capacidad mínima de 240 ml. • Polipropileno, preferiblemente de unión baja al ADN para todas las superficies de contacto con la muestra. • Las dimensiones internas (nivel de líquido) son compatibles con los pasos automatizados de aspiración y dispensación de VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Las dimensiones de altura son compatibles con los movimientos automatizados de VeriSeq NIPT Microlab STAR.	Proveedor de laboratorio general Depósitos compatibles: • Corning Axygen, n.º de producto RES-SW96-HP-SI • Agilent, n.º de producto 201246-100

Consumible	Proveedor
<p>Cubeta de reactivo con las siguientes especificaciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cubeta que encaja de forma segura y sin forzar en el portador de VeriSeq NIPT Microlab STAR, con fondo cónico y una capacidad mínima de 20 ml. • Polipropileno sin ARNasa/ADNasa. • Las dimensiones internas del depósito (nivel de líquido) generan niveles de líquido empleando volúmenes de reactivo de ensayo que son compatibles con los pasos automatizados de aspiración y dispensación de VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Las dimensiones de altura son compatibles con los movimientos automatizados de VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Proveedor de laboratorio general</p> <p>Cubetas compatibles:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Roche, n.º de producto 03004058001
<p>Placas de pocillos profundos con las siguientes especificaciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Formato de microplaca SLAS 1–2004, 3–2004 y 4–2004 con 96 pocillos de fondo piramidal o cónico y una capacidad mínima de 2 ml. • Polipropileno translúcido, preferiblemente material de unión baja al ADN para todas las superficies de contacto con la muestra. • Las dimensiones del pocillo generan un nivel de líquido compatible con los pasos automatizados de aspiración y dispensación de VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Faldón de placa que permite colocar los códigos de barras de placa con adhesión sobre una superficie plana. • Marco resistente a la torsión capaz de soportar un mínimo de 5600 x g. • Las dimensiones de altura de la placa son compatibles con los movimientos automatizados de VeriSeq NIPT Microlab STAR. 	<p>Proveedor de laboratorio general</p> <p>Placas compatibles:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, n.º de referencia 0030505301 • Eppendorf, n.º de referencia 30502302 • USA Scientific, n.º de referencia 1896-2000

Consumible	Proveedor
<p>Placas de 384 pocillos con las siguientes especificaciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplaca con 384 pocillos, optimizados para volúmenes bajos, con una capacidad mínima de los pocillos de 50 µl. • Poliestireno opaco negro con bloqueo de luz y de unión baja al ADN para todas las superficies de contacto con la muestra. • Las dimensiones del pocillo generan niveles de líquido compatibles con los pasos automatizados de aspiración y dispensación de VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Las dimensiones de altura de la placa son compatibles con los movimientos automatizados de VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Faldón de placa que permite colocar los códigos de barras de placa con adhesión sobre una superficie plana. 	<p>Proveedor de laboratorio general</p> <p>Placas compatibles:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Corning, n.º de producto 3820
<p>Placas de 96 pocillos con las siguientes especificaciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplaca con marco resistente a la torsión capaz de soportar un mínimo de 5600 x g y 96 pocillos translúcidos con fondo cónico, bordes elevados y una capacidad mínima del pocillo de 150 µl. • Polipropileno sin ARNasa/ADNasa y de unión baja al ADN para todas las superficies de contacto con la muestra. • Las dimensiones del pocillo generan niveles de líquido compatibles con los pasos automatizados de aspiración y dispensación de VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Las dimensiones de altura de la placa son compatibles con los movimientos automatizados de VeriSeq NIPT Microlab STAR. • Faldón de placa que permite colocar los códigos de barras de placa con adhesión sobre una superficie plana. • Compatible con cicladores térmicos para desnaturalización. 	<p>Proveedor de laboratorio general</p> <p>Placas compatibles:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, n.º de referencia 0030129512 • Eppendorf, n.º de referencia 30129580 • Eppendorf, n.º de referencia 30129598 • Eppendorf, n.º de referencia 30129660 • Eppendorf, n.º de referencia 30129679 • Bio-Rad, n.º de referencia HSP9601
<p>Una de las juntas siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microcierre metálico "F" • Cierres metálicos 	<p>Bio-Rad, n.º de catálogo MSF1001</p> <p>Beckman Coulter, n.º de artículo 538619</p>

Consumible	Proveedor
Tubo de recogida de sangre para ADN sin células con marca CE	Streck, n.º de catálogo 218997
Tapas a presión	Sarstedt, n.º de pedido 65.802
Tubos con tapa de rosca de 2 ml	Proveedor de laboratorio general
Puntas de filtros de 20 µl para pipeta de 20 µl	Proveedor de laboratorio general
Puntas de filtros de 200 µl para pipeta de 200 µl	Proveedor de laboratorio general
Puntas de filtros de 1000 µl para pipeta de 1000 µl	Proveedor de laboratorio general
Equivalente:	Proveedor de laboratorio general
<ul style="list-style-type: none"> • Un spray desinfectante rápido con alcohol • Una solución de detergente desinfectante 	
Recomendado:	
<ul style="list-style-type: none"> • Agua desionizada y etanol al 70 % 	

Material opcional, no suministrado

Consumible	Proveedor
Solución salina tampón fosfato Dulbecco (DPBS) para control sin cadena molde (NTC)	Proveedor de laboratorio general
Tubo, tapa de rosca, 10 ml (solo para las muestras de control)	Sarstedt, n.º de pedido 60.551
Tubo, tapa de rosca, 50 ml	Proveedor de laboratorio general
Pipetas serológicas de 25 ml	Proveedor de laboratorio general
Pipetas serológicas de 10 ml	Proveedor de laboratorio general

Recogida, transporte y conservación de muestras



PRECAUCIÓN

Manipule todas las muestras como si fueran agentes potencialmente infecciosos.

- Deben recogerse de 7 a 10 ml de muestras de sangre completa en tubos de recogida de sangre (BCT) Streck para ADN sin células.
- El transporte de la sangre completa debe efectuarse conforme a la normativa aplicable al transporte de agentes etiológicos. Se recomienda usar métodos urgentes de envío o transporte.

- Durante el transporte, las muestras deben almacenarse a una temperatura de entre 4 °C y 30 °C. Una vez recibidas, almacénelas a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C hasta que vaya a utilizarlas. Entre la recogida de sangre y el aislamiento del plasma inicial no deben transcurrir más de cinco días.
- En caso de que sea necesario volver a realizar las pruebas, las muestras posprocesamiento pueden volver a taparse y almacenarse a 4 °C durante un periodo de cinco días más (hasta un total de diez días desde la recogida de la sangre).



PRECAUCIÓN

Superar los tiempos de almacenamiento indicados puede afectar de manera negativa a las tasas de error de las muestras individuales.

Advertencias y precauciones

- Este ensayo contiene proteinasa K. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Úselo en un área bien ventilada, use ropa de protección, evite respirar el polvo y deseche los contenedores y los contenidos no usados de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona.
- Este ensayo contiene cloruro de guanidinio. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Úselo en un área bien ventilada, use ropa de protección y deseche los contenedores y los contenidos no usados de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona.
- Este ensayo contiene 2-propanol, un producto químico inflamable. Manténgalo lejos del calor y de llamas sin protección. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Úselo en un área bien ventilada, use ropa de protección y deseche los contenedores y los contenidos no usados de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona.
- Este ensayo contiene dimetilsulfóxido, un líquido corrosivo y combustible. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Úselo en un área bien ventilada, use ropa de protección y deseche los contenedores y los contenidos no usados de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona.
- Para evitar la formación de gases peligrosos, no deseche los residuos de extracción de ADN extracelular circulante (que contienen clorhidrato de guanidina) con residuos que contengan lejía (hipoclorito de sodio).
- Manipule todas las muestras como si contuvieran agentes potencialmente infecciosos.
- Utilice las precauciones rutinarias del laboratorio. No pipetee con la boca. No coma, beba ni fume en las zonas de trabajo designadas. Use guantes desechables y batas de laboratorio para la manipulación de muestras y reactivos del ensayo. Lávese bien las manos tras la manipulación de muestras y reactivos del ensayo.

- No use los componentes del ensayo una vez alcanzada la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja del ensayo. No intercambie los componentes del ensayo de lotes de ensayo distintos. Los lotes de ensayo se identifican con la etiqueta de la caja del ensayo. Almacene los componentes de ensayo a la temperatura especificada.
- Para evitar la degradación de las muestras o los reactivos, asegúrese de que se hayan disipado por completo todos los vapores del hipoclorito de sodio usado para limpiar antes de comenzar cualquier protocolo.
- El incumplimiento de los procedimientos descritos puede provocar resultados erróneos o una reducción considerable de la calidad de las muestras.
- Comunique de inmediato cualquier incidente grave relacionado con este producto a Illumina y las autoridades competentes de los Estados miembros en los que se encuentren el usuario y el paciente.
- Para obtener más información medioambiental, sanitaria y de seguridad, consulte las hojas de datos de seguridad (SDS) en support.illumina.com/sds.html.

Notas del procedimiento

Evitar la contaminación

- Use puntas y materiales de laboratorio consumibles recién preparados.
- Use puntas resistentes a aerosoles para reducir el riesgo de transferencia y contaminación cruzada entre muestras.
- Dado que existe posibilidad de contaminación, extreme las precauciones para asegurarse de que el contenido permanece íntegramente en el pocillo. Evite las salpicaduras de contenido. Centrifugue después de cada paso de agitación en mezclador vorticial.
- Siga la normativa aplicable a las prácticas de laboratorio y de higiene al manipular sangre y sus derivados.
- No rocíe con aerosol de lejía cuando lleve a cabo la preparación de librerías. La contaminación por rastros de lejía puede provocar un error en el ensayo.
- Al retirar el sello de una placa, procure colocar la placa en una superficie plana, sujetando la placa con firmeza. Retire el sello lentamente y evite que entre en contacto con los pocillos expuestos. Evite tocar los pocillos expuestos o alterar su contenido. La contaminación cruzada entre pocillos puede dar lugar a resultados incorrectos.

Limpieza de la plataforma de VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Compruebe si la plataforma está limpia antes de usarla. Realice el mantenimiento semanal y siga estas instrucciones de limpieza al menos una vez en semana.

- Quite todos los portadores no descargables, límpielos con un spray desinfectante rápido con agua desionizada y etanol al 70 % y déjelos secar. Si están muy sucios, sumérgalos después en una solución de detergente desinfectante, enjuáguelos con el desinfectante con alcohol y déjelos secar.
- Abra la cubierta delantera y limpie la plataforma con un trapo empapado en agua desionizada y etanol al 70 %. Debe comprobar especialmente la limpieza de los bloques deslizantes.
- Quite el distribuidor del sistema de vacío básico (BVS, Basic Vacuum System) y limpie el distribuidor, la junta y los compartimentos interiores del BVS con un trapo. Evite limpiar la junta con etanol: puede quebrar el material.
- Quite los residuos de las puntas del cabezal de 96 pipetas CORE y el canal independiente.
- Retire de la estación de residuos de puntas la placa de extracción de puntas del canal independiente y límpiela: aplique agua desionizada y etanol al 70 % directamente en la superficie y límpiela con un trapo. Coloque una nueva bolsa de plástico sobre el marco y vuelva a colocarla. Coloque la placa de extracción de puntas limpia de nuevo en su sitio.
- Aplique agua desionizada y etanol al 70 % directamente en la superficie de la caja y el contenedor de residuos del cabezal de 96 pipetas CORE y límpiela con un trapo.
 - Si es difícil quitar la acumulación de los residuos de las puntas, limpie con un trapo humedecido con agua sin ADNasa ni ARNasa hasta quitar la acumulación. Deseche el trapo de manera adecuada. Proceda a esterilizar con el desinfectante con alcohol.
- Humedezca un trapo que no deje pelusa o un hisopo de algodón en etanol al 70 %. Limpie la ventana del lector láser del lector de códigos de barras con el hisopo. Con el mismo trapo o hisopo, limpie todos los pocillos del adaptador de placa CPAC. Si usa un trapo, utilice la parte trasera de un bolígrafo para apretar contra el interior de cada pocillo del adaptador. De este modo, se asegura de que el fondo del pocillo se limpia correctamente.
- Limpie los canales independientes:
 - En los canales independientes, limpie el revestimiento de expulsión de las puntas (parte exterior de los canales de pipeteado) con un trapo que no deje pelusa humedecido con agua desionizada y etanol al 70 %. (Consulte la *Guía de referencia de Hamilton Microlab STAR*, n.º 15070074).
 - Limpie la arandela de fijación y las juntas tóricas del cabezal de pipeteado (parte exterior de los canales de pipeteado) con un trapo que no deje pelusa humedecido con agua desionizada y etanol al 70 %.
- Limpie el cabezal de 96 pipetas CORE:
 - Utilice el mismo trapo humedecido en agua desionizada y etanol al 70 % para limpiar la funda del cabezal de 96 pipetas en la parte inferior de las arandelas de fijación.
 - Con este mismo paño, o con un jirón de este, humedecido con agua desionizada y etanol al 70 %, limpie los laterales de los canales de pipeteado del cabezal de 96 pipetas para limpiar las juntas tóricas. Para ello, use el paño como si fuera hilo dental. Repita este procedimiento en cada canal de pipeteo del cabezal de 96 pipetas.
- Aplique agua desionizada y etanol al 70 % sobre las cubiertas frontal y lateral, y séquelas con un paño.

- Limpie la cinta protectora de Autoload con un paño humedecido con agua desionizada y etanol al 70 % sin ejercer presión.
- Cuando la plataforma y los componentes estén completamente secos, sustituya los portadores.

NOTA Una limpieza y mantenimiento incorrectos de ML STAR puede provocar contaminación cruzada y afectar negativamente al rendimiento del ensayo.

Control de calidad

Se puede realizar una evaluación del material de control con características de rendimiento conocidas para detectar diferencias en el procesamiento y los procedimientos técnicos en laboratorio.

Los experimentos con una muestra de control o de control sin cadena molde (NTC) reducen el número total de muestras maternas desconocidas que se pueden procesar con cada preparación de muestras.

No use más de dos muestras de NTC por cada lote de 24 o 48 muestras ni más de cuatro muestras de NTC por cada lote de 96 muestras.

Instrucciones de uso

Sugerencias y técnicas

A menos que se haya especificado un punto de detención de seguridad en el protocolo, continúe inmediatamente con el siguiente paso.

Colocación del código de barras en las placas

- Los códigos de barras para placas de borde completo comienzan por PL.
- Los códigos de barras para placas de pocillos profundos comienzan por DW.
- Aplique los códigos de barras a las placas de borde completo y las de pocillos profundos en el lado junto a la columna 12.
- Cargue las placas con el código de barras orientado hacia arriba para permitir el escaneo automatizado.

Colocación y retirada de la junta en el plato

- Extreme las precauciones para evitar la contaminación cruzada; no debe haber líquido visible en la parte inferior del sello.
 - Asegúrese de que la parte inferior expuesta no entre en contacto con los pocillos expuestos.
 - Evite tocar los pocillos expuestos.
- Selle siempre la placa de 96 pocillos antes de llevar a cabo los siguientes pasos del protocolo:
 - Centrifugado

- Termociclado
- Para sellar la placa, aplíquelo el cierre metálico y después el sello. Asegúrese de ejercer presión por toda la placa y de que el sello está bien fijado en cada uno de los pocillos.
- Siga estos pasos antes de retirar el sello de la placa:
 - Centrifugue brevemente la placa de 96 pocillos a 1000 × g durante 20 segundos.
 - Coloque la placa en una superficie plana y retire lentamente el sello.

VeriSeq NIPT Microlab STAR

- Antes de su uso, realice y registre el mantenimiento necesario conforme a las instrucciones del fabricante.
- Observe ML STAR durante los pasos automatizados. Supervise la interfaz del software VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 para ver las indicaciones y las instrucciones para el operador.
- La cubierta delantera debe estar colocada durante el funcionamiento.
- No debe haber ningún objeto en la plataforma.
- Si está disponible el botón con la opción **Exclude** (Excluir) durante un evento de manejo de errores, absténgase de elegir esta opción bajo ninguna circunstancia. Si el método no puede avanzar más allá del evento de manejo de errores o dispone de opciones limitadas de manejo de errores, anule el experimento.
- Durante los pasos de vacío de la placa, si VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 se lo indica, ayude manualmente a formar la junta entre la placa y el distribuidor de vacío.
- Deje que el sistema deseche automáticamente las puntas del adaptador. No quite las puntas manualmente a menos que se lo indique el software.
- Quite los reactivos gastados y los consumibles usados conforme a las indicaciones de Workflow Manager.
- Vacíe a diario los depósitos de residuos de vacío. El primer depósito no debe superar nunca la mitad de su capacidad. El desbordamiento de los residuos de vacío puede dañar la bomba de vacío y reducir el vacío aplicado al sistema.
- Para los lotes de 24, 48 y 96 muestras, cargue una gradilla completa de puntas de ocho canales contadas individualmente antes de iniciar el método.

Procesamiento de muestras

Procedimiento

1. Complete los siguientes pasos para cada alícuota:
 - a. Centrifugue las muestras con código de barras a 1600 × g durante 10 minutos a 4 °C con el freno desactivado.
 - b. Cuando la centrifugadora se detenga por completo, retire los tubos de muestras. Inicie el aislamiento de plasma 15 minutos tras el centrifugado. Si transcurren más de 15 minutos, vuelva a centrifugar.

2. Inspeccione todos los tubos para determinar la idoneidad de la muestra haciendo las verificaciones siguientes:

- El volumen de muestra es el esperado.
- Se observa una clara separación entre las capas de eritrocitos y plasma de las muestras tras la centrifugación.
- El nivel de plasma es de al menos 1,5 ml por encima de la capa leucocitaria.
- La muestra no está muy hemolizada (es decir, el plasma no es de un color rojo oscuro).
- La muestra no tiene un aspecto lechoso (es decir, el plasma no tiene un aspecto blanco y turbio o lechoso y opaco).
- No se observa coagulación en la muestra.



PRECAUCIÓN

Las muestras que no se han conservado o manipulado de la manera adecuada pueden no ser aptas para su uso. Si se procesan muestras no aptas con el flujo de trabajo, estas pueden causar una obstrucción en la placa de unión durante las extracciones y provocar desbordamientos de muestra en los pocillos adyacentes.

3. Destape los tubos y cárguelos en los portatubos. Cargue todas las muestras y cualquier control de plasma del lote.



PRECAUCIÓN

Durante un evento de manejo de errores, si se presenta en la opción Exclude (Exclure), no lo seleccione. Si el método no puede avanzar más allá del evento de manejo de errores y dispone de opciones limitadas de manejo de errores, anule el experimento.

Aislamiento de plasma

Preparación

1. Etiquete una placa de pocillos profundos de plasma intermedio y adhiérole un código de barras.
2. Etiquete una placa de pocillos profundos de plasma final y adhiérole un código de barras.
3. Para los lotes de 24, 48 y 96 muestras, cargue una gradilla completa de puntas de ocho canales contadas individualmente antes de iniciar el método.



PRECAUCIÓN

Asegúrese de utilizar el tipo de placa correcto para las placas de plasma intermedio y plasma final. El uso de un depósito de pocillos profundos en lugar de una placa de pocillos profundos da lugar a la amalgamación de muestras, de modo que se pueden generar resultados incorrectos.

Procedimiento

1. Abra AppLauncher y luego seleccione **VeriSeq NIPT Method** (Método de VeriSeq NIPT).
2. Introduzca un ID de lote y nombre de usuario exclusivos y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
El ID de lote debe contener 26 caracteres como máximo. Puede usar números, letras, guiones bajos (_) o guiones (-). Por ejemplo: 16-10-2025_Lote3.
El ID de lote no distingue entre mayúsculas y minúsculas. Los ID de lote que distinguen entre mayúsculas y minúsculas no se consideran exclusivos.
Los nombres de lote deben ser exclusivos y no deben diferir únicamente en el uso de mayúsculas y minúsculas. Por ejemplo, los nombres de lote Lote01 y lote01 no son exclusivos. Para los ID de la muestra se aplica la misma norma.
3. Seleccione **New Batch** (Lote nuevo).
4. Tras el inicio, seleccione **OK** (Aceptar) para iniciar el aislamiento de plasma.
5. Realice uno de los siguientes pasos:
 - Para cargar una hoja de muestras existente, seleccione la que se encuentra asociada al lote y, a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).
 - Para continuar sin seleccionar una hoja de muestras, seleccione **No Sample Sheet** (Sin hoja de muestras).

Para obtener información sobre cómo crear una hoja de muestras, consulte la *Guía de VeriSeq NIPT Solution v2 Software* (n.º de documento 1000000067940).

NOTA Para garantizar un adecuado análisis de los datos debe registrarse con precisión para cada muestra el tipo de muestra, si se trata de embarazo de un único embrión o de un embarazo gemelar. Si selecciona **No Sample Sheet** (Sin hoja de muestras), asegúrese de que ha definido los valores predeterminados en las Service Tools (Herramientas de servicios) de Workflow Manager. Para obtener más información, consulte la *Guía de VeriSeq NIPT Solution v2 Software* (n.º de documento 1000000067940).

6. Seleccione el tamaño del lote y, a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).
7. Seleccione el número de controles sin cadena molde (NTC, no template controls) y, a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).
Las ranuras NTC siempre son las últimas ranuras seleccionadas. Por ejemplo, con dos NTC en un experimento de 24 muestras, las posiciones 23 y 24 son las NTC.

8. Confirme que todos los códigos de barras estén colocados y, a continuación, cargue las muestras, las puntas y las placas (con el código de barras orientado hacia la derecha) en el portador.
9. Seleccione **OK** (Aceptar) cada vez que se muestre un mensaje de carga.

Tamaño del lote de muestras	Portador Tipo	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Puntas	7-12	Puntas de 1000 µl	5
			Puntas de 1000 µl (solo lote de 96)	4 y 5
	Tubo	15	Tubos de muestras de sangre preparados 1-24 (para lotes de todos los tamaños)	1-24
	Tubo	16	Tubos de muestras de sangre preparados 25-48 (para lotes de los tamaños 48 y 96)	25-48
	Tubo	17	Tubos de muestras de sangre preparados 49-72 (para lotes del tamaño 96)	49-72
	Tubo	18	Tubos de muestras de sangre preparados 73-96 (para lotes del tamaño 96)	73-96
	Multiflex	19-24	Placa de pocillos profundos vacía, plasma final, con código de barras	4
	Multiflex	19-24	Placa de pocillos profundos vacía, plasma intermedio, con código de barras	5
Reactivo	47	[Opcional] Solución salina tampón fosfato Dulbecco (DPBS) utilizada para control sin cadena molde (NTC)	5	

10. Asegúrese de que los portadores, el material de laboratorio y los reactivos se hayan cargado correctamente.
11. En la pantalla Pre-Spin Deck Verification (Verificación de la plataforma previa al centrifugado), seleccione **OK** (Aceptar).
12. Observe ML STAR mientras realiza los pasos automatizados.
13. Si recibe un mensaje de Workflow Manager, compruebe que la plataforma de carga de ML STAR no tiene obstrucciones y permite que ML STAR descargue los portadores.
14. Seleccione **Unload** (Descargar) para descargar la plataforma.
15. Retire la placa de pocillos profundos de plasma intermedio como se indica a continuación.
 - a. Inspeccione la placa para comprobar que los volúmenes de todos los pocillos sean homogéneos (que no haya errores de pipeta). El volumen previsto es de 1000 µl.
 - b. Registre cualquier incoherencia cuando haya terminado el procedimiento de aislamiento de plasma.
 - c. Selle la placa, realice la carga de manera equilibrada y centrifugue a 5600 × g durante 10 minutos con el freno desactivado o con la configuración más baja.

16. Seleccione **Yes** (Sí) para continuar con la preparación del plasma final.
17. Retire la junta de la placa y cárguela de nuevo en el portador.

Tamaño del lote de muestras	Portador Tipo	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Multiflex	19-24	Placa de pocillos profundos de plasma intermedio	5

18. Seleccione la casilla de verificación **Intermediate Plasma plate has been spun** (Se ha centrifugado la placa de plasma intermedio) y, a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).
19. Observe ML STAR mientras realiza los pasos automatizados.
20. Si recibe un mensaje de Workflow Manager, compruebe que la plataforma de carga de ML STAR no tiene obstrucciones y permite que ML STAR descargue los portadores.
21. Seleccione **Unload** (Descargar) para descargar la plataforma.
22. Cuando Workflow Manager se lo indique, vacíe los portadores y la plataforma.
23. Retire la placa de pocillos profundos de plasma final.
24. Inspeccione visualmente la placa para comprobar lo siguiente:
 - Los volúmenes son heterogéneos en todos los pocillos. El volumen previsto es de 900 µl.
 - Los pellets de células son visibles.
 - La hemólisis es excesiva.

Si observa anomalías en los pellets de células visibles o una hemólisis excesiva, invalide la muestra afectada al final del método de aislamiento de plasma o use Batch Manager. Para obtener más información sobre Batch Manager, consulte la *Guía de VeriSeq NIPT Solution v2 Software* (n.º de documento 1000000067940).
25. Cuando Workflow Manager se lo indique, seleccione **OK** (Aceptar).
26. Escriba los comentarios sobre los pocillos afectados y seleccione **OK** (Aceptar).
27. Realice uno de los siguientes pasos.
 - Para pasar a la extracción de ADN sin células, seleccione **Yes** (Sí).
 - Para terminar, seleccione **Exit** (Salir).

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si va a detener el proceso, selle la placa de plasma final y almacénela a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C durante un periodo de 7 días como máximo.

Extracción de ADN sin células

Preparación

1. Examine visualmente las cajas de extracción y de accesorios para confirmar que el kit no haya caducado.

2. Prepare los siguientes reactivos. Etiquete las cubetas de los depósitos y los depósitos de pocillos profundos con los nombres de los reactivos.

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Placa de pocillos profundos de plasma final	Entre 2 °C y 8 °C	Si estaba almacenada, déjela reposar durante 30 minutos hasta que alcance la temperatura ambiente. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos. Retire la junta de la placa de pocillos profundos de plasma final antes de usarla.

3. Añada lentamente 3,75 ml de tampón de proteinasa a cada frasco de reactivo de proteinasa K.

- Prepare tres frascos para 24 y 48 muestras.
- Prepare cuatro frascos para 96 muestras.

4. Tape los frascos de proteinasa K y agite en vórtice hasta que se resuspenda.



PRECAUCIÓN

No contamine el tapón de goma, ya que, si entra en contacto con otras sustancias, podría contaminar futuras muestras.

5. Agrupe la proteinasa K preparada de todos los frascos en un tubo de reactivo y etiquételo indicando que se trata de proteinasa K.
6. Añada 100 ml de EtOH al 100 % a cada botella de reactivo de tampón de lavado II.
- Prepare un frasco para 24 y 48 muestras.
 - Prepare dos frascos para 96 muestras.
7. Invierta las botellas de tampón de lavado II para mezclar.
8. Marque las casillas de verificación en las botellas de tampón de lavado II.
9. Etiquete una nueva placa de borde completo intermedia y colóquela un nuevo código de barras de placa.
10. Etiquete una nueva placa de borde completo de elución de ADN sin células y colóquela un nuevo código de barras de placa.
11. Etiquete una nueva placa de pocillos profundos de extracción intermedia y colóquela un nuevo código de barras de placa de pocillos profundos.
12. Coloque un código de barras de placa en la placa de unión de ADN.
13. Aplique un cierre metálico en los pocillos sin usar para lotes de 24 y 48 muestras.
14. Prepare una solución de limpieza de EtOH al 70 % (70 % de EtOH y 30 % de agua sin ADNasa ni ARNasa) para limpiar el sistema de vacío.

15. Prepare el sistema de vacío de la manera siguiente.
 - a. Quite el distribuidor de vacío y límpielo con EtOH al 70 %.
Evite limpiar la junta con EtOH: puede quebrar el material.
 - b. Vacíe los residuos de vacío.
 - c. Asegúrese de que el sistema de vacío de ML STAR esté activado.

Procedimiento

1. Seleccione **OK** (Aceptar) para iniciar la extracción del ADN sin células.
2. Si **VeriSeq NIPT Method** no está abierto, realice lo siguiente:
 - a. Abra AppLauncher y luego seleccione **VeriSeq NIPT Method** (Método de VeriSeq NIPT).
 - b. Introduzca el ID de lote y el nombre de usuario y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
3. Cargue las puntas en los portadores de puntas del modo siguiente y, después, seleccione **OK** (Aceptar).



PRECAUCIÓN

Antes de iniciar el método para lotes de 24, 48 y 96 muestras, añada una gradilla completa de puntas de ocho canales.

Tamaño del lote de muestras	Portador Tipo	Pista	Elemento	Posición del centro
24	Puntas	1-6	Puntas de 1000 µl	1
		7-12	Puntas de 300 µl	1
48	Puntas	1-6	Puntas de 1000 µl	1 y 2
		7-12	Puntas de 300 µl	1
96	Puntas	1-6	Puntas de 1000 µl	1, 2, 3 y 4
		7-12	Puntas de 300 µl	1

4. Cargue las puntas contadas en los portadores de puntas del modo siguiente.

Tamaño del lote de muestras	Portador Tipo	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Puntas	49-54	Puntas de 1000 µl	1
			Puntas de 300 µl	2
			Puntas de 50 µl	3

5. Introduzca la ubicación de la primera y la última punta de cada gradilla de puntas y, después, seleccione **OK** (Aceptar).

6. Escanee los códigos de barras de las cajas de extracción.
7. Introduzca el nombre de usuario o las iniciales del preparador del reactivo y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
8. Escanee los códigos de barras de la caja de los accesorios.
9. Introduzca el nombre de usuario o las iniciales del preparador del reactivo y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
10. Confirme que los códigos de barras están colocados.
11. Retire el sello de la placa de pocillos profundos de plasma final, si fuera necesario.
12. Cargue las placas (con el código de barras orientado hacia la derecha) en el portador de la placa del modo siguiente y, a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Portador Tipo	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Multiflex	19-24	Nueva placa con borde completo, intermedia, con código de barras	1
			Nueva placa con borde completo, elución de ADN sin células, con código de barras	2
			Nueva placa de pocillos profundos, intermedia de extracción, con código de barras	4
			Placa de pocillos profundos de plasma final, con código de barras	5

13. Confirme que la placa de unión de ADN tiene código de barras y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
14. Para lotes con placa parcial, coloque una junta de placa recortadas sobre los pocillos in usar (columnas 4-12 para lotes de 24 muestras y columnas 7-12 para lotes de 48 muestras).
15. Cargue la placa de unión de ADN en el distribuidor de vacío con el código de barras orientado hacia la derecha.
16. Antes de colocar la placa de unión en el distribuidor de BVS, inspeccione visualmente los pocillos para detectar cualquier posible obstrucción.
Esto podría impedir el flujo de reactivos durante el vacío.
17. Si se utilizan lotes de 24 o 48 muestras, cubra los pocillos sin usar y aplique un cierre metálico. Marque la casilla de verificación **Are DNABinding Plate Columns Sealed?** (¿Está colocada la junta de las columnas de la placa de unión de ADN?), y seleccione **OK** (Aceptar).

18. Cargue los tubos de reactivo en el portarreactivos del modo siguiente y, después, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Portador Tipo	Pista	Elemento	Posición del centro
24 y 48	Reactivo	47	Tampón de elución, 16 ml	1
			Proteinasa K, 11 ml	2
96	Reactivo	47	Tampón de elución, 16 ml	1
			Proteinasa K, 15 ml	2

19. Transfiera los reactivos especificados a los depósitos de pocillos profundos y, después, cargue los depósitos en los portadores de pocillos profundos como se indica a continuación.

20. Seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Portador Tipo	Pista	Elemento	Posición del centro
24 y 48	Pocillo profundo	39-44	Tampón de lavado II, 125 ml	1
			Tampón de lavado I, 125 ml	2
			EtOH al 100 %, 60 ml	3
			Tampón de lisis, 100 ml	4
			Agua sin ARNasa ni ADNasa, 60 ml	5
96	Pocillo profundo	39-44	Tampón de lavado II, 200 ml	1
			Tampón de lavado I, 125 ml	2
			EtOH al 100 %, 100 ml	3
			Tampón de lisis, 100 ml	4
			Agua sin ARNasa ni ADNasa, 100 ml	5

21. Espere a que finalice la comprobación automatizada de volúmenes de reactivos.

22. Confirme que el depósito de residuos de vacío esté vacío (se recomienda que esté medio lleno) y, después, seleccione **OK** (Aceptar).

23. Confirme la colocación de todos los portadores, materiales de laboratorio y reactivos y seleccione **OK** (Aceptar) en la pantalla Extraction Deck Verification (Verificación de plataforma de extracción).

24. Observe ML STAR durante los pasos automatizados.



Debe invalidar manualmente los desbordamientos de muestra que no haya detectado el sistema antes de que puedan contaminarse los pocillos cercanos.

25. Tras el paso de vacío final, retire la placa de unión de ADN y limpie la superficie inferior con EtOH al 70 %.

26. Selle cualquier pocillo no tapado en la placa de unión de ADN y coloque esta placa sobre la placa de pocillos profundos de plasma final vacía.
27. Centrifugue el conjunto de placa de unión de ADN y placa de plasma final a 5600 × g durante 10 minutos con el freno aplicado.
28. Seleccione **OK** (Aceptar).
29. Durante el centrifugado de la placa de unión de ADN, realice la limpieza de vacío:
 - a. Retire el distribuidor de vacío y seleccione **OK** (Aceptar).
 - b. Espere a que finalice la limpieza de residuos automatizada.
 - c. Limpie el distribuidor de vacío y el interior del sistema de vacío con EtOH al 70 % y, después, reemplace el distribuidor de vacío.
 - d. Marque la casilla de verificación **Manifold is on Vacuum** (El distribuidor está en vacío) para iniciar la transferencia de la placa de elución en el distribuidor de vacío. Después, seleccione **OK** (Aceptar).
30. Tras el centrifugado, quite el sello de los pocillos que contienen muestras de la placa de unión de ADN.
31. Coloque la placa de unión de ADN encima de la placa de elución de ADN sin células que se encuentra en el distribuidor de vacío.
32. Cargue la placa de unión de ADN con el código de barras a la derecha y seleccione **OK** (Aceptar).
33. Observe ML STAR durante los pasos automatizados.
34. Tras el paso de incubación, marque la casilla de verificación **Plates are assembled as indicated** (Las placas están colocadas conforme se indica). Confirme que el conjunto de las placas de unión de ADN/elución de ADN sin células está sobre una base de apoyo (si es necesario para centrifugar).
35. Selle los pocillos descubiertos en la placa de unión de ADN.
36. Centrifugue a 5600 × g durante 2 minutos con el freno activado y, a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).
37. Inspeccione visualmente la placa de elución de ADN sin células para comprobar que los volúmenes de cada pocillo sean homogéneos.
El volumen previsto es de unos 55 µl.
38. Selle y conserve la placa de elución de ADN sin células para la preparación de librerías.
39. Si recibe un mensaje de Workflow Manager, compruebe que la plataforma de carga de ML STAR no tiene obstrucciones y permite que ML STAR descargue los portadores.
40. Seleccione **Unload** (Descargar) para descargar la plataforma.
41. Descargue todos los portadores y limpie la plataforma de ML STAR; a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).
42. Escriba los comentarios sobre los pocillos afectados y seleccione **OK** (Aceptar).
43. Realice uno de los siguientes pasos:
 - Para ir a la preparación de librerías, seleccione **Yes** (Sí).
 - Para terminar, seleccione **Exit** (Salir).

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si va a detener el proceso, selle la placa de elución de ADN sin células y almacénela a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C durante un periodo de 7 días como máximo.

Preparación de librerías**Preparación**

1. Examine visualmente las cajas de preparación de librerías y de accesorios para confirmar que los kits no hayan caducado.
2. Prepare los siguientes reactivos. Etiquete los cubos de los depósitos y los depósitos de pocillos profundos con los nombres de los reactivos.

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Mezcla de A-Tailing	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
Placa de elución de ADN sin células	Entre -25 °C y -15 °C	Si la placa estaba almacenada, confirme que no llevaba más de siete días y que se ha descongelado a temperatura ambiente. Agite en vórtice a 1500 r/min durante 1 minuto. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos.
Mezcla de reparación de extremos	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar.
Tampón de hibridación	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar. Devuelva al almacenamiento después de su uso.
Mezcla de ligadura	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
Placa adaptadora de ADN NIPT	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos.
Tampón de resuspensión	Entre 2 °C y 8 °C	Agite en vórtice para mezclar. Devuelva al almacenamiento después de su uso.

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Bolas de purificación de muestras	Entre 2 °C y 8 °C	Deje reposar durante 30 minutos hasta que alcance la temperatura ambiente. Agite enérgicamente con un vórtice antes de cada uso. Mezcle con un vórtice o inversor hasta que todas las bolas estén en suspensión y la mezcla sea homogénea.



PRECAUCIÓN

Retire el sello de la placa adaptadora de ADN NIPT con sumo cuidado para evitar la contaminación cruzada de aerosoles entre pocillos, lo que podría dar lugar a resultados incorrectos.

3. Si la placa de elución de ADN sin células se ha almacenado congelada, prepárela como se indica.
 - a. Descongele a temperatura ambiente.
 - b. Agite en vórtice a 1500 r/min durante 1 minuto.
 - c. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos.
4. Etiquete una nueva placa de borde completo de librerías y colóquela un nuevo código de barras de placa.
5. Prepare EtOH al 80 % a partir de EtOH absoluto. Combine 40 ml de EtOH al 100 % y 10 ml de agua sin ADNasa ni ARNasa. Invierta para mezclar.
6. Asegúrese de que la regulación térmica de ML STAR esté activada.

Dilución de enzimas

1. Combine una mezcla de A-Tailing con un tampón de resuspensión (RSB, Resuspension Buffer) en un tubo con tapa de rosca. Agite en vórtice para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.

Tamaño del lote de muestras	Mezcla de A-Tailing (µl)	Tampón de resuspensión (µl)
24 y 48	900	1200
96	1800	2400

2. Combine una mezcla de ligación con un tampón de resuspensión en un tubo con tapa de rosca. Agite en vórtice para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.

Tamaño del lote de muestras	Mezcla de ligadura (µl)	Tampón de resuspensión (µl)
24 y 48	230	1713
96	440	3278

Procedimiento

1. Seleccione **OK** (Aceptar) para iniciar la preparación de librerías. Si aún no está abierto **VeriSeq NIPT Method**, realice lo siguiente:
 - a. Abra AppLauncher y seleccione **VeriSeq NIPT Method** (Método de VeriSeq NIPT).
 - b. Introduzca el ID de lote y el nombre de usuario y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
2. Confirme que los siguientes consumibles están listos conforme a las indicaciones de la pantalla de preparación de reactivos:
 - Mezcla de A-Tailing, mezcla de ligadura y EtOH al 80 %
 - Bolas de purificación de muestras, mezcla de reparación de extremos y placa adaptadora de ADN NIPT
3. Seleccione las casillas de verificación y seleccione **OK** (Aceptar).
4. Escanee los códigos de barras de la caja de preparación de librerías.
5. Introduzca el nombre de usuario o las iniciales del preparador del reactivo y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
6. Escanee los códigos de barras de la caja de los accesorios.
7. Introduzca el nombre de usuario o las iniciales del preparador del reactivo y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
8. Cargue las puntas en los portadores de puntas del modo siguiente y, después, seleccione **OK** (Aceptar) para cada portador.

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24	Puntas	1-6	Puntas de 50 µl	1
		7-12	Puntas de 300 µl	1 y 2
48	Puntas	1-6	Puntas de 50 µl	1 y 2
		7-12	Puntas de 300 µl	1, 2, 3 y 4
96	Puntas	1-6	Puntas de 50 µl	1, 2, 3 y 4
		7-12	Puntas de 300 µl	1, 2, 3, 4 y 5

9. Si detuvo el protocolo tras el procedimiento de extracción de ADN sin células, cargue las puntas contadas en los portadores de puntas del modo siguiente.

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Puntas	49-54	Puntas de 1000 µl	1
			Puntas de 300 µl	2
			Puntas de 50 µl	3

10. Introduzca la ubicación de la primera punta de cada gradilla de puntas y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
11. Confirme que los códigos de barras están colocados y cargue las placas (con el código de barras orientado hacia la derecha) en el portador de placas del modo siguiente. Después, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Multiflex	19-24	Placa de elución de ADN sin células, con código de barras	1
			Placa adaptadora de ADN NIPT, con código de barras	2
			Nueva placa de 96 pocillos con borde completo, librerías, con código de barras	3
			Nuevas placas de 96 pocillos con borde completo	4 y 5

12. Cargue el portador de pocillos profundos del modo siguiente y, después, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Pocillo profundo	39-44	50 ml de EtOH al 80 % en un depósito de pocillo profundo	1
			Nuevas placas de 96 pocillos con borde completo	2, 3, 4, 5

13. Cargue los tubos de reactivo en el portarreactivos del modo siguiente y, después, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Reactivo	47	Mezcla de reparación de extremos de 2,5 ml	1
			Mezcla de A-Tailing preparada (volumen total)	2
			Mezcla de ligación preparada (volumen total)	3
			Bolas de purificación de muestras de 10 ml	4
			Tampón de hibridación de 12 ml	5

14. Guarde el resto de los 12 ml de tampón de hibridación (HT1) en el contenedor para la agrupación.

15. Asegúrese de que los portadores, los materiales de laboratorio y los reactivos estén cargados como se indica; a continuación, seleccione **OK** (Aceptar) en la pantalla Library Deck Verification (Verificación de la plataforma de librerías).

16. Espere a que finalice la comprobación automatizada de volúmenes de reactivos.

17. Observe ML STAR durante los pasos automatizados.

18. Si recibe un mensaje de Workflow Manager, compruebe que la plataforma de carga de ML STAR no tiene obstrucciones y permite que ML STAR descargue los portadores.

19. Seleccione **Unload** (Descargar) para descargar la plataforma.

20. Inspeccione la placa de librerías para comprobar que los volúmenes de todos los pocillos sean homogéneos.



PRECAUCIÓN

Si los volúmenes no son homogéneos, las muestras pueden ofrecer resultados incorrectos.

21. Selle y conserve la placa de librerías cuando la almacene.

22. Descargue todos los portadores, limpie la plataforma y, a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).

23. Escriba los comentarios sobre los pocillos afectados y seleccione **OK** (Aceptar).

24. Realice uno de los siguientes pasos:

- Para ir a la cuantificación de librerías, seleccione **Yes** (Sí).
- Para terminar, seleccione **Exit** (Salir).

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si va a detener el proceso, selle la placa de librerías antes de su almacenamiento. La placa de librerías permanece estable hasta siete días a contar desde la fecha de preparación, a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C.

Cuantificación de librerías

Preparación

1. Prepare los siguientes reactivos:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Reactivo de cuantificación de ADN	Entre 2 °C y 8 °C	Proteger de la luz. Descongele a temperatura ambiente durante 30 a 150 minutos. (Se recomienda retirar el reactivo al inicio del procedimiento de preparación de librerías.) Agite en vórtice para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
Estándar de cuantificación de ADN	Entre 2 °C y 8 °C	Agite en vórtice para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
Tampón de resuspensión	Entre 2 °C y 8 °C	Agite en vórtice para mezclar.

2. Si la placa de librerías se ha almacenado congelada, prepárela como se indica.
 - a. Confirme que no llevaba más de siete días y que se ha descongelado a temperatura ambiente.
 - b. Agite en vórtice para mezclar.
 - c. Centrifugue a 1000 × g durante 1 minuto.
3. Encienda el fluorímetro 10 minutos antes de usarlo.
4. Adhiera una etiqueta de código de barras en una nueva placa de 384 pocillos.
5. Adhiera una etiqueta de código de barras en una nueva placa de bordes completos.

Procedimiento

1. Seleccione **OK** (Aceptar) para iniciar la cuantificación.
2. Si aún no está abierto VeriSeq NIPT Method, realice lo siguiente:
 - a. Abra AppLauncher y seleccione **VeriSeq NIPT Method** (Método de VeriSeq NIPT).
 - b. Introduzca el ID de lote y el nombre de usuario y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
3. Escanee los códigos de barras de la caja de los accesorios.
4. Introduzca el nombre de usuario o las iniciales del preparador del reactivo y, después, seleccione **OK** (Aceptar).

5. Cargue las puntas en el portador de puntas del modo siguiente y, después, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24 y 48	Puntas	1-6	Gradilla de puntas de 300 µl	1
			Gradilla de puntas de 50 µl	2
96	Puntas	1-6	Gradilla de puntas de 300 µl	1
			Gradilla de puntas de 50 µl	2 y 3

6. Confirme que los códigos de barras están colocados.
 7. Si fuera necesario, retire el sello de la placa de librerías.
 8. Cargue las placas (con el código de barras orientado hacia la derecha) en el portador Multiflex del modo siguiente y, a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Multiflex	19-24	Nuevas placas con borde completo, con código de barras	1
			Nueva placa de 384 pocillos, con código de barras	2
			Placa de librerías, con código de barras	3
			Nuevas placas de 96 pocillos con borde completo	4 y 5

9. Cargue los tubos de reactivo sin tapa en el portatubos del modo siguiente y, después, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Tubo	46	Estándar de cuantificación de ADN	1
			Reactivo de cuantificación de ADN	2

10. Cargue los tubos de reactivo en el portarreactivos del modo siguiente y, después, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Reactivo	47	Nuevo tubo de reactivo (vacío)	1
			Tampón de resuspensión de 16 ml	2

11. Si detuvo el protocolo tras el procedimiento de extracción de preparación de librerías, cargue las puntas contadas en los portadores de puntas del modo siguiente.

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Puntas	49-54	Puntas de 1000 µl	1
			Puntas de 300 µl	2
			Puntas de 50 µl	3

12. Introduzca la ubicación de la primera y la última punta de cada gradilla de puntas y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
13. Asegúrese de que los portadores, los materiales de laboratorio y los reactivos estén cargados como se indica; a continuación, seleccione **OK** (Aceptar) en la pantalla Quant Deck Verification (Verificación de la plataforma de cuantificación).
14. Espere a que finalice la comprobación automatizada de volúmenes de reactivos.
15. Observe ML STAR durante los pasos automatizados.
16. Si recibe un mensaje de Workflow Manager, compruebe que la plataforma de carga de ML STAR no tiene obstrucciones y permite que ML STAR descargue los portadores.
17. Seleccione **Unload** (Descargar) para descargar la plataforma.
18. Descargue la placa de librerías.
- Inspeccione la placa para comprobar que los volúmenes de todos los pocillos sean homogéneos.
 - Selle la placa de librerías y almacénela a temperatura ambiente hasta que se complete el análisis de datos fluorométricos.
19. Descargue las placas de 96 pocillos restantes e inspecciónelas para comprobar que los volúmenes de todos los pocillos sean homogéneos.
Si hay errores notables en el volumen, tal vez haya un problema con los pasos del pipeteado.
20. Descargue la placa de 384 pocillos e inspecciónela para comprobar que haya líquido en los pocillos correspondientes.
21. Selle la placa con un cierre metálico.
22. Centrifugue a 1000 × g durante 20 segundos.
23. Incube a temperatura ambiente y protegiendo de la luz durante 10 minutos.

24. Descargue todos los portadores.
25. Limpie la plataforma de ML STAR; a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).



PRECAUCIÓN

No deseche los reactivos de cuantificación hasta que se hayan obtenido los datos. Le harán falta los reactivos si necesita realizar una recuantificación.

26. Tras la incubación, quite el cierre metálico y cargue la placa de 384 pocillos en el lector de microplacas. Asegúrese de utilizar la placa adaptadora violeta (número de referencia: 0310-4336) suministrada por Molecular Devices, o equivalente, si procede con el instrumento utilizado.
 - Al cargarla, asegúrese de que A1 esté en la esquina superior izquierda.
27. Haga doble clic en la cadena molde de VeriSeq NIPT para abrirla en SoftMax Pro.
28. Seleccione **New Experiment** (Nuevo experimento) en la ficha Home (Inicio).
29. Seleccione **Read** (Leer).
30. Exporte los datos en formato XML como se explica a continuación.
 - a. Haga clic con el botón derecho en **Plate** (Placa) y, a continuación, seleccione **Rename** (Renombrar).
 - b. Realice la lectura del código de barras de la placa de cuantificación y, a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).
 - c. Seleccione el icono de placa que aparece en la esquina superior izquierda y, a continuación, seleccione **Export** (Exportar) en el menú.
 - d. Marque la casilla de comprobación **Expt name** (Nombre de exportación), establezca la opción de fecha de placa como sin procesar, elija XML como formato de salida y, a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).
 - e. Defina la ruta y el nombre del archivo de salida y seleccione **Save** (Guardar).
Debe poderse acceder a la ubicación del archivo desde el ordenador Hamilton. No utilice espacios en el nombre ni en la ruta del archivo.

Análisis

1. En la pantalla Scanner Information (Información del lector) de ML STAR, introduzca el ID del fluorímetro.
2. Escriba los comentarios sobre el experimento del fluorímetro y seleccione **OK** (Aceptar).
3. Navegue al archivo *.xml de cuantificación que contiene los datos fluorométricos y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
4. Revise los resultados de los análisis de curva estándar y concentración de muestras y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
5. Si necesita repetir la lectura de la placa, seleccione **Rescan** (Repetir lectura).
Las muestras son sensibles al tiempo y la luz. Si es necesario repetir la lectura, hágalo inmediatamente.
6. Escriba los comentarios sobre los pocillos afectados y seleccione **OK** (Aceptar).

7. Evalúe los resultados y continúe como se indica a continuación.
 - Si los resultados superan la especificación, vaya a [Agrupación de librerías en la página 40](#). Para obtener información sobre las especificaciones, consulte la tabla de criterios de medición y límites de CC de la cuantificación en la *Guía de VeriSeq NIPT Solution v2 Software* (n.º de documento 1000000067940).
 - Si los resultados no superan la especificación, el sistema cancela el método. Repita los procedimientos de cuantificación empezando por [Preparación en la página 36](#).
8. Realice uno de los siguientes pasos:
 - Para proceder a la [Agrupación de librerías en la página 40](#), seleccione **Yes** (Sí).
 - Para terminar, seleccione **Exit** (Salir).

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si va a detener el proceso, selle la placa de librerías antes de su almacenamiento. La placa de librerías permanece estable hasta siete días almacenada a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C .

Agrupación de librerías

Preparación

1. Prepare los siguientes reactivos:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Tampón de hibridación	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar. Devuelva al almacenamiento después de su uso.

2. Si la placa de librerías se ha almacenado congelada, prepárela como se indica.
 - a. Confirme que no llevaba más de siete días y que se ha descongelado a temperatura ambiente.
 - b. Agite en vórtice a 1500 r/min durante 1 minuto.
 - c. Centrifugue a $1000 \times g$ durante 20 segundos.
 - d. Pipetee para mezclar.
3. Etiquete un tubo de agrupación vacío como Grupo A. En el caso de muestras de 96, etiquete un segundo tubo de agrupación vacío como Grupo B.
4. Guarde el siguiente programa de desnaturalización en el ciclador térmico con una tapa calentada.
 - a. Seleccione la opción de tapa precalentada y establezca la temperatura a 102 °C .
 - b. Defina el volumen de la reacción en $50\ \mu\text{l}$.
 - c. Defina la tasa de incremento en el valor máximo ($\geq 2\text{ °C}$ por segundo).
 - d. Incube a 96 °C durante 10 minutos y, después, a 4 °C durante 5 segundos.
 - e. Mantenga la temperatura a 4 °C .

Procedimiento

- Coloque la placa de librerías en el ciclador térmico preprogramado y ejecute el programa de desnaturalización.
No desnaturalice la placa de librerías antes de que la cuantificación haya superado los criterios de medición de CC: puede que quiera realizar una recuantificación.
- Centrifugue la placa de librerías a 1000 × g durante 20 segundos.
- Seleccione **OK** (Aceptar) para iniciar la agrupación de librerías.
- Si VeriSeq NIPT Method no está abierto, realice lo siguiente:
 - Abra AppLauncher y seleccione **VeriSeq NIPT Method** (Método de VeriSeq NIPT).
 - Introduzca el ID de lote y el nombre de usuario y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
- Seleccione la concentración del grupo y, a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).
La densidad de grupos objetivo es 220-260 k/mm².

NOTA Puede que sea necesario aumentar las concentraciones y/o los volúmenes de generación de grupos para los lotes de 24 muestras para mantener densidades de grupos similares a las obtenidas con los lotes de 48 y 96 muestras.

- Si se lo indica Workflow Manager, realice uno de los siguientes pasos:
 - Para cargar una hoja de muestras, seleccione la hoja de muestras asociada al lote y, a continuación, seleccione **Load** (Cargar).
 - Para usar los valores predeterminados del sistema con el resto de tipos de muestras, informes sobre el sexo o tipos de cribado, seleccione **Use Default** (Usar predeterminados) en cada ajuste.
Para obtener información sobre cómo crear una hoja de muestras, consulte la *Guía de VeriSeq NIPT Solution v2 Software (n.º de documento 1000000067940)*.
- Seleccione **Start** (Iniciar) para activar el temporizador de la desnaturalización de la placa.
- Cargue las puntas en los portadores de puntas del modo siguiente.

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Puntas	7-12	Puntas de filtros de 50 µl	1

- Cargue la placa de librería desnaturalizada (con el código de barras orientado hacia la derecha) en el portador Multiflex del modo siguiente y, a continuación, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Multiflex	19-24	Placa de librería desnaturalizada (con código de barras)	1

10. Cargue los tubos de grupos en el portatubos del modo siguiente y, después, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24 y 48	Tubo	46	Nuevo tubo de 2 ml, grupo A	1
96	Tubo	46	Nuevo tubo de 2 ml, grupo A	1
			Nuevo tubo de 2 ml, grupo B	2

11. Cargue los tubos de reactivo en el portarreactivos del modo siguiente y, después, seleccione **OK** (Aceptar).

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Reactivo	47	Tampón de hibridación de 3 ml	1

12. Cargue las puntas en los portadores de puntas del modo siguiente.

Tamaño del lote de muestras	Tipo de portador	Pista	Elemento	Posición del centro
24, 48 y 96	Puntas	49-54	Puntas de filtros de 1000 µl	1
			Puntas de filtros de 300 µl	2
			Puntas de filtros de 50 µl	3

13. Introduzca la ubicación de la primera y la última punta de cada gradilla de puntas y, después, seleccione **OK** (Aceptar).
14. Asegúrese de que los portadores, el material de laboratorio y los reactivos se hayan cargado según las indicaciones.
15. En la pantalla Pooling Deck Verification (Verificación de la plataforma de agrupación), seleccione **OK** (Aceptar).
16. Observe ML STAR durante los pasos automatizados.
17. Escriba los comentarios sobre los pocillos afectados y seleccione **OK** (Aceptar).
18. Si recibe un mensaje de Workflow Manager, compruebe que la plataforma de carga de ML STAR no tiene obstrucciones y permite que ML STAR descargue los portadores.
19. Seleccione **Unload** (Descargar) para descargar la plataforma.
20. Descargue el portatubos.
21. Tape todos los tubos de agrupación, agite en vórtice y, a continuación, centrifugue brevemente.
22. Seleccione **OK** (Aceptar).
23. Secuencie las librerías lo antes posible tras la agrupación. Selle la placa de librerías y almacénela a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C durante un periodo máximo de siete días para permitir la reagrupación.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si va a detener el proceso, tape los tubos de agrupación y almacénelos a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C durante un periodo de 7 días como máximo.

Preparación de librerías agrupadas para la secuenciación**Preparación**

1. Prepare los siguientes reactivos:

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones
Tubos de grupo	Entre -25 °C y -15 °C	Si han estado almacenados, deben descongelarse a temperatura ambiente. Agite en vórtice brevemente. Centrifugue brevemente.

2. Prepare el sistema de secuenciación de nueva generación; para ello, complete los siguientes campos en el módulo Local Run Manager VeriSeq NIPT Module:
 - a. Run Name (Nombre del experimento)
 - b. **[Opcional]** Escriba una descripción para identificar el experimento.
 - c. Código de barras de grupo

**PRECAUCIÓN**

El código de barras de grupo introducido en el módulo de LRM debe coincidir con el introducido en Workflow Manager. El software de análisis rechaza las configuraciones de experimentos incorrectas y tal vez requiera una resecuenciación.

Para obtener más información sobre cómo usar el Local Run Manager VeriSeq NIPT Module, consulte la *Guía de VeriSeq NIPT Solution v2 Software (n.º de documento 1000000067940)*.

Procedimiento

1. Combine los siguientes volúmenes en el cartucho de reactivos y, a continuación, pipetee para mezclar.
 - Tampón de hibridación (900 µl)
 - Mezcla A (450 µl)
2. Proceda con la secuenciación en un sistema de secuenciación de nueva generación, siguiendo la guía del sistema.

Consulte la guía del instrumento de secuenciación de nueva generación que esté utilizando. Si utiliza NextSeq 550Dx, consulte la *Guía de referencia del instrumento NextSeq 550Dx (n.º de documento 1000000009513)* o las *Instrucciones de uso del instrumento NextSeq 550Dx (n.º de documento 1000000043133)*.
3. Confirme que la configuración del experimento es correcta cuando se le indique.

4. Si es necesario, repita este procedimiento para el grupo B.
 - Para alcanzar el intervalo de densidad de grupos objetivo, la placa de librería puede reagruparse con una concentración del grupo distinta en el ordenador Hamilton. Al volver a crear el grupo se invalida el grupo original.
 - Si lo prefiere, puede modificar el cociente del grupo a HT1 (450 µl + 900 µl) para alcanzar el intervalo de densidad de grupos objetivo.

Secuenciación de nueva generación

VeriSeq NIPT Solution v2 puede usarse con un sistema de secuenciador de nueva generación con las especificaciones siguientes:

- Capacidad para 2 × 36 lecturas "paired-end".
- Compatibilidad con adaptadores de índices de VeriSeq NIPT Sample Prep.
- Procesos químicos de dos canales.
- Producción automática de archivos .BCL (datos sin procesar del instrumento de secuenciación).
- 400 millones de lecturas "paired-end" por experimento.
- Compatible con VeriSeq NIPT Assay Software v2.

NextSeq 550Dx es compatible con VeriSeq NIPT Solution v2.

Análisis de datos de secuencias

Una vez completada la secuenciación, los datos de secuenciación se envían automáticamente a VeriSeq NIPT Assay Software v2, que realiza un análisis y genera un informe. El informe incluye las clasificaciones de cada muestra del lote, así como una evaluación de todos los criterios de medición de CC aplicados. El proceso de análisis de un lote de 48 muestras tarda aproximadamente 4 horas desde que finaliza la secuenciación hasta que se obtienen los resultados finales. Para obtener información detallada sobre análisis de datos y el archivo de resultados, consulte la *Guía de VeriSeq NIPT Solution v2 Software* (n.º de documento 1000000067940).

Interpretación de resultados

El algoritmo de VeriSeq NIPT Solution v2 emplea un complejo modelo estadístico que combina distintos tipos de información a partir de la recogida de fragmentos de librería secuenciados con lecturas "paired-end". Este modelo se emplea para detectar regiones del genoma que estén infrarrepresentadas o sobrerrepresentadas en la librería de cada muestra. Lo importante de este modelo es que representa si el grado de infrarrepresentación o sobrerrepresentación detectado es indicador o no, desde el punto de vista cuantitativo, de la existencia de aneuploidías en el genoma fetal al nivel de la fracción fetal estimada para la librería.

En el caso de todos los cromosomas, los datos de secuenciación "paired-end" se alinean con el genoma de referencia (HG19). Las lecturas alineadas no duplicadas exclusivas se añaden en grupos de 100 kb. Los recuentos de grupos correspondientes se ajustan a la tendencia de GC y a la cobertura genómica específica de cada zona anteriormente establecida. Con dichos recuentos de grupos normalizados, se derivan puntuaciones estadísticas para cada autosoma mediante la comparación de las regiones de cobertura que pueden verse afectadas por la aneuploidía con el resto de los autosomas. Se calcula un cociente de verosimilitud logarítmica (LLR) para cada muestra teniendo en cuenta estas puntuaciones basadas en las coberturas y en el cálculo de la fracción fetal. El LLR es la probabilidad de que una muestra se vea afectada por la cobertura observada y la fracción fetal frente a la probabilidad de que una muestra no se vea afectada por la misma cobertura observada. El cálculo de este cociente también tiene en cuenta la incertidumbre estimada en la fracción fetal. Para futuros cálculos, se utiliza el logaritmo natural de la relación. Assay Software evalúa el cociente de verosimilitud logarítmica (LLR) de cada cromosoma objetivo y de cada muestra para determinar las aneuploidías.

Durante la creación del lote, debe definir para cada muestra el tipo de muestra (embarazo de un único embrión o gemelar), el tipo de cribado (básico o del genoma completo) y si se elaborarán o no informes sobre el cromosoma sexual (Yes [Sí], No y SCA [aneuploidía de los cromosomas sexuales]). Juntas, estas opciones determinarán qué información recogerá el informe de cada muestra.

En todos los tipos de muestra será el tipo de cribado el que determine sobre qué anomalías autosómicas se informará. En el tipo de cribado básico, solo se incluirán en el informe eventos de trisomía cromosómica que afecten a los cromosomas 13, 18 y 21. En el tipo de cribado del genoma completo, se incluirán en el informe las deleciones o duplicaciones cromosómicas parciales o completas de cualquier cromosoma autosómico. Para que una deleción o duplicación parcial se incluya en el informe su longitud deberá ser como mínimo de 7 Mb.

En el caso de muestras de embarazos de un único embrión, puede desactivarse la inclusión en el informe del cromosoma sexual. También puede configurar si desea que, en el informe, además de las aneuploidías del cromosoma sexual, se incluya o no información sobre el sexo de las muestras euploides.

En el caso de muestras gemelares, si se selecciona Yes (Sí) para que se incluyan en el informe datos sobre el cromosoma sexual, el resultado se limitará a indicar la presencia o ausencia de un cromosoma Y en la librería. No es posible incluir en el informe datos sobre la aneuploidía del cromosoma sexual para muestras gemelares.

El resultado ANOMALY DETECTED (ANOMALÍA DETECTADA) indica que se han detectado en la muestra una o más anomalías de acuerdo con el tipo de cribado y la opción de informe sobre el cromosoma sexual que se hayan seleccionado. Cuando se detecta una anomalía, el informe proporciona una descripción de esta anomalía con nomenclatura citogenética.

VeriSeq NIPT Assay Software v2 usa estadísticas generadas durante la secuenciación para ofrecer una estimación de la fracción fetal (FFE) de cada muestra. La FFE es el componente de ADN sin células fetal estimado que se recupera en el ensayo y sobre el cual se informa con un porcentaje redondeado para cada muestra. La desviación estándar media de esta estimación en todas las muestras es del 1,3 %. La FFE no se debe usar de manera aislada para excluir muestras al generar informes de los resultados.

Para realizar llamadas de representación cromosómica, VeriSeq NIPT Assay Software v2 utiliza la prueba de confianza de aneuploidía fetal individual (iFACT, individualized Fetal Aneuploidy Confidence Test), un criterio de medición de umbral dinámico que indica si el sistema ha generado una cobertura de secuenciación

suficiente, basándose en el cálculo de la fracción fetal de cada muestra. Las llamadas negativas se indican solo si la muestra alcanza el umbral de iFACT. Si una muestra no logra alcanzar este umbral, la evaluación de CC muestra FAILED iFACT (iFACT FALLIDA) y el sistema no genera un resultado.

Además de la prueba iFACT, VeriSeq NIPT Assay Software v2 evalúa algunos otros criterios de medición de CC durante el análisis. Entre los criterios de medición se incluyen la evaluación de la uniformidad de cobertura en las regiones genómicas de referencia y la distribución de longitudes de fragmento de ADN sin células. La evaluación de CC muestra una marca de CC o un error de CC para cualquier criterio de medición que esté fuera del rango admitido. En el caso de que haya un error de CC, el sistema no genera un resultado para la muestra. Si la muestra no supera el CC, puede reprocesarse siempre que haya suficiente volumen de plasma en el tubo de recogida de sangre.

VeriSeq NIPT Solution v2 genera datos que se usan en un informe final. No genera un informe final para el paciente. Los clientes son los responsables del diseño y los contenidos del informe final que se entregará al profesional médico. Illumina no se hace responsable de la precisión de la redacción en el informe final del cliente.



PRECAUCIÓN

Compruebe las estimaciones de la fracción fetal de todas las muestras. Si los valores son similares para todas las muestras de un mismo experimento, es posible que se haya producido una amalgamación de las muestras que afecte a los resultados. Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina para que le ayuden a solucionar el problema.

Características de rendimiento

Los datos siguientes descritos en las secciones de rendimiento clínico y rendimiento analítico se generaron mediante los protocolos y materiales descritos en Instrucciones de uso, empezando por el plasma. Todos los datos de secuenciación de esta sección se generaron en un sistema de secuenciación NextSeq 500/550 o en un sistema de secuenciación NextSeq 550Dx con las configuraciones siguientes:

	NextSeq 500/550	NextSeq 550Dx
Software integrado en el instrumento	NextSeq Control Software 4.0	NextSeq Operating Software 1.3
Versión del kit de reactivos	NextSeq 500/550 High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit	NextSeq 550Dx High Output v2.5 (75 cycle) Reagent Kit
Método de secuenciación	Experimento de secuenciación "paired-end" 2 × 36 en modo de rendimiento elevado	Experimento de secuenciación "paired-end" 2 × 36 en modo de rendimiento elevado

Estudio clínico

La precisión clínica de VeriSeq NIPT Solution v2 se demostró mediante la evaluación de muestras de plasma de mujeres con embarazo de un único embrión o embarazo gemelar. Las muestras se obtuvieron de bancos de muestras de plasma sin identificar que se habían procesado previamente a partir de muestras de sangre completa periférica. Se consideraron más de 45 000 muestras para su inclusión en el estudio. Dichas muestras se sometieron previamente a cribado prenatal para la detección de aneuploidías cromosómicas fetales y deleciones y duplicaciones parciales de 7 Mb o más. Todas las muestras de embarazos afectados, así como un subconjunto de muestras consecutivas de embarazos no afectados, podían ser aptas para la prueba si se disponía de los resultados clínicos y se cumplían los criterios de muestra. El conjunto de análisis para la prueba incluyó un total de 2335 muestras. De este conjunto, 2328 muestras pertenecían a embarazos de un único embrión y siete a embarazos gemelares.

De esas muestras, 28 (el 1,2 %, 28 de 2335) no superaron el CC del ensayo en la primera ronda durante el análisis de los datos secuenciados:

- 27 fallos de iFACT (1 XO, 26 no afectados)
- Un fallo por datos fuera del intervalo previsto

Demografía y características del embarazo

La edad de la madre, la edad gestacional y el trimestre del embarazo se resumen en la [Tabla 7](#) para las muestras del cribado del genoma completo, incluidas las muestras de mosaicos conocidos. La mayoría (98 %) de las muestras analizadas son representativas del primer trimestre del embarazo.

Se evaluaron las características demográficas entre las cohortes del cribado básico y el del genoma completo y no se detectó diferencia estadística. Las características demográficas y de embarazo eran similares tanto si se incluían los mosaicos conocidos como si se excluían.

Tabla 7 Demografía y características del embarazo

Resumen estadístico	Genoma completo (incluidos mosaicos conocidos)
Número de muestras	2307*
Edad de la madre: años	
Media	35,08
Desviación estándar	4,04
Mediana	34,95
Percentil 25, percentil 75	32,31, 37,79
Mínimo, máximo	20,22, 53,02
Edad gestacional en el momento de la extracción: semanas	
Media	10,93
Desviación estándar	1,20
Mediana	10,57
Percentil 25, percentil 75	10,29, 11,14
Mínimo, máximo	10,00, 27,86
Trimestre de embarazo: n (%)	
<Primero (<14 semanas)	2252 (98 %)
Segundo	54 (2 %)
Tercero (≥27 semanas)	1 (0 %)

*Las muestras finales presentadas incluían 7 gemelos.

Rendimiento clínico

Los resultados obtenidos del ensayo con VeriSeq NIPT Solution v2 se compararon con los resultados estándar de la referencia clínica. Todas las muestras del estudio mostraron resultados acordes con los resultados estándar de la referencia clínica (realidad clínica) para aneuploidía cromosómica fetal y deleciones y duplicaciones parciales de 7 Mb o más. El resultado estándar de la referencia clínica para las muestras incluidas en este estudio se basó en los resultados del análisis cromosómico o de un examen físico del recién nacido con un cribado de NIPT negativo basado en NGS (Next Generation Sequencing). Personal del estudio, debidamente cualificado, realizó la clasificación de los datos estándar de la referencia clínica de acuerdo con el documento de codificación médica del patrocinador.

Entre los métodos de análisis cromosómico se incluyeron el cariotipado, la hibridación in situ de fluorescencia (FISH, Fluorescence In Situ Hybridization) o la microarray cromosómica (CMA, Chromosome Microarray) de hibridación genómica comparativa. El análisis cromosómico se realizó a partir de saliva o sangre periférica de recién nacidos o lactantes, muestras de productos de la concepción (POC, Products Of Conception), amniocitos, vellosidades coriónicas, tejidos placentarios o sangre del cordón umbilical extraída después del nacimiento.

El mosaicismo es la presencia de dos o más líneas celulares de distinta composición cromosómica en un mismo individuo. Las líneas celulares tienen su origen en el mismo cigoto. El tipo y el nivel de mosaicismo varía y depende de cuándo aparezcan los eventos de mosaico durante la embriogenia y el desarrollo fetal. En los diagnósticos prenatales aparecen distintos tipos de mosaicismo, dependiendo de la distribución de las líneas celulares anómalas frente a las normales en el citotrofoblasto, el mesénquima o el feto.¹⁰ Si bien el mosaicismo puede apreciarse con cualquier anomalía cromosómica, la prevalencia del mosaicismo en trisomías poco frecuentes es superior en las trisomías de los cromosomas 21, 18 y 13 (T21, T18 y T13).¹¹ En la evaluación del rendimiento, los casos de mosaicos se incluyeron en el análisis del genoma completo, puesto que en este ensayo el objetivo de este tipo de cribado es la detección de las aneuploidías autosómicas raras (RAA, por sus siglas en inglés).

Rendimiento de cribado básico

En el cribado básico, entre las anomalías se incluyen T21, T18 y T13. El análisis incluyó un total de 2243 muestras de embarazos de un único embrión y gemelares. Se detectó la presencia de T21 en los siete embarazos gemelares; no se reflejan en la siguiente tabla.

Tabla 8 Sensibilidad y especificidad de VeriSeq NIPT Solution v2 para la detección de trisomías del 21, 18 y 13 en el cribado básico para embarazos de un único embrión (excluidos mosaicos conocidos)

	T21	T18	T13
Sensibilidad	>99,9 % (130/130)	>99,9 % (41/41)	>99,9 % (26/26)
IC del 95 % bilateral	97,1 %, 100 %	91,4 %, 100 %	87,1 %, 100 %
Especificidad	99,90 % (1982 de 1984)	99,90 % (1995 de 1997)	99,90 % (2000 de 2002)
IC del 95 % bilateral	99,63 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %	99,64 %, 99,97 %

El rendimiento del ensayo en el cribado básico, tal y como se muestra en la [Tabla 8](#), se calcula sin incluir un subconjunto de 64 muestras afectadas por RAA, duplicaciones o eliminaciones autosómicas parciales, o mosaicismo conocido. Entre estas 64 muestras se incluyen tres mosaicos T18 y ocho T21. Se ha identificado que cinco de estas 11 muestras se ven afectadas por la anomalía detectada por el software VeriSeq NIPT Assay Software v2.

Rendimiento de cribado del genoma completo

Para el cribado del genoma completo, se incluyen en la categoría "cualquier anomalía" las trisomías, las monosomías y las deleciones o duplicaciones parciales de 7 Mb o más. Las muestras para el cribado del genoma completo incluían 36 muestras con mosaicismo conocido. Se analizó un total de 2307 muestras de embarazos de un único embrión y gemelares. Se detectó la presencia de una anomalía del cromosoma 21 en los siete embarazos gemelares; no se informan en las siguientes tablas.

Rendimiento del cribado del genoma completo para cualquier anomalía

Tabla 9 Sensibilidad y especificidad de VeriSeq NIPT Solution v2 para la detección de cualquier anomalía en el cribado del genoma completo (incluidos mosaicos conocidos)

	Sensibilidad	Especificidad
% de estimación (n/N)	95,5 % (318 de 333)	99,34 % (1954 de 1967)
IC del 95 % bilateral	92,7 %, 97,3 %	98,87 %, 99,61 %

Rendimiento del cribado del genoma completo para aneuploidía autosómica rara

Tabla 10 Sensibilidad y especificidad de VeriSeq NIPT Solution v2 para aneuploidía autosómica rara (RAA) en el cribado del genoma completo (incluidos mosaicos conocidos)

	Sensibilidad	Especificidad
% de estimación (n/N)	96,4 % (27 de 28)	99,80 % (2001 de 2005)
IC del 95 % bilateral	82,3 %, 99,4 %	99,49 %, 99,92 %

Rendimiento del cribado del genoma completo para deleciones y duplicaciones parciales

Tabla 11 Sensibilidad y especificidad de VeriSeq NIPT Solution v2 para deleciones y duplicaciones parciales de 7 Mb o más en el cribado del genoma completo (incluidos mosaicos conocidos)

	Sensibilidad	Especificidad
% de estimación (n/N)	74,1 % (20 de 27)	99,80 % (2000 de 2004)
IC del 95 % bilateral	55,3 %, 86,8 %	99,49 %, 99,92 %

Diferencias en el rendimiento de los cribados básicos y del genoma completo

La metodología de puntuación de las trisomías comunes y aneuploidías en cromosomas sexuales es la misma tanto para cribados básicos como del genoma completo. El cribado básico solo aplica el algoritmo a las T21, T18 y T13. Por su parte, el cribado del genoma completo va más allá de esta metodología a fin de evaluar todas las trisomías, las deleciones y duplicaciones parciales y RAA.

Existen dos diferencias en la generación de informes de rendimiento descrita entre los cribados básicos y de genoma completo. En primer lugar, para el cribado del genoma completo, se incluyeron en los criterios de medición de rendimiento las muestras con mosaicismo conocido tanto para trisomías comunes como RAA y deleciones y duplicaciones parciales. En segundo lugar, el cribado del genoma completo puede informar de forma preferencial de la detección de una duplicación o deleción parcial en la trisomía completa. La presencia de una trisomía completa, además de una duplicación o deleción parcial, puede apreciarse haciendo referencia a la puntuación de LLR que se proporciona en el informe adicional.

Inclusión de mosaicos en cribados del genoma completo

El mosaicismo se incluye como limitación en este ensayo. De producirse, la señal fetal de una anomalía se reduce y, por tanto, su detección sin poner en peligro la especificidad general del ensayo puede resultar más complicada. Sin embargo, dado que el mosaicismo es más relevante para contenido ampliado, se incluyeron en el cribado del genoma completo las muestras con él.

De las 64 muestras incluidas en el cribado del genoma completo, pero no en el básico, se identificó que 36 contenían mosaicismo según el estándar de referencia clínica. De estas 36 muestras, 23 llamadas coincidieron con el estándar de referencia clínica.

Detección de deleciones o duplicaciones parciales frente a aneuploidía del cromosoma completo

VeriSeq NIPT Solution v2 contiene opciones de menú tanto para cribado básico como para cribado del genoma completo. En el cribado básico, solo se informa sobre un resultado ANOMALY DETECTED (ANOMALÍA DETECTADA) si se detecta una aneuploidía completa en los cromosomas 21, 18 o 13 y si se cumplen todos los criterios de medición del control de calidad. En el cribado del genoma completo, el sistema detecta la aneuploidía en todos los autosomas, así como deleciones y duplicaciones parciales de 7 Mb o más.

Durante el cribado del genoma completo, en casos con un evento de cromosoma completo y un evento de CNV en el mismo cromosoma que superan el umbral de LLR, el sistema da prioridad a informar sobre un evento de deleción o duplicación parcial frente a una llamada del cromosoma completo, si la deleción o duplicación parcial cubre un 75 % o menos del cromosoma en el que se ha detectado el evento. Si la región detectada de deleción y duplicación parcial es superior al 75 % del tamaño del cromosoma, el evento se considerará una trisomía o monosomía completa del cromosoma completo, siempre que, al mismo tiempo, también se supere el umbral de LLR para el cromosoma completo. Por ello, las deleciones y duplicaciones de un tamaño notable inferiores o iguales al 75 % del tamaño del cromosoma pueden indicar aneuploidía del genoma completo.

En todas las muestras, la puntuación de LLR para la clasificación del genoma completo estará disponible en el informe complementario. La puntuación de LLR deberá revisarse de acuerdo con el valor de corte especificado en la [Probabilidades de detección del 95 % para regiones promedio por tamaño, para VeriSeq NIPT Solution v2 en la página 63](#), antes de interpretar el resultado. Por ejemplo, una llamada de CNV en la que las puntuaciones de LLR a nivel cromosómico que superen el valor de corte ofrecen más evidencia para una interpretación compatible con una aneuploidía del cromosoma completo (consultar el ejemplo de la [Tabla 12](#)).

En el estudio clínico hubo dos muestras de embarazo gemelar con duplicaciones notablemente grandes (una en el cromosoma 21 y otra en el cromosoma 18) cuyo tamaño era menor al 75 % del tamaño relativo del cromosoma (consulte la [Tabla 12](#)). En el informe, ambos eventos constaron como duplicaciones parciales en lugar de como una trisomía completa para ese cromosoma. Las puntuaciones de LLR para estos eventos superaban el valor de corte compatible con un resultado afectado de una trisomía completa. Tras una detección de NIPT, tanto en el caso de duplicación parcial como en el de trisomía completa, se ofrece al paciente un seguimiento consistente en una prueba de confirmación mediante diagnóstico prenatal.

Tabla 12 Ejemplos de eventos de duplicación de tamaño grande identificados en el cribado del genoma completo

	Realidad clínica	Resultado del sistema del genoma completo	Tamaño de anomalía (Mb)	% del cromosoma	Puntuaciones de LLR
Muestra 1	Embarazo de un único embrión con trisomía 21	Duplicación parcial en la 21	22,50	48,9	19,43
Muestra 2	Embarazo de un único embrión con trisomía del 18	Duplicación parcial en la 18	47,00	60,2	12,99

Consulte la *Guía de software de VeriSeq NIPT Solution v2 (n.º de documento 1000000067940)* para obtener más información sobre los criterios de medición del Control de calidad utilizados para informar sobre los resultados de aneuploidía.

Cromosomas sexuales

Los resultados de cromosomas sexuales de VeriSeq NIPT Solution v2 se compararon con los resultados estándar de la referencia clínica y se resumen en la tabla siguiente. Se calculó el porcentaje de concordancia para cada cromosoma sexual, dentro de los resultados estándar de la referencia clínica. El porcentaje de concordancia se calculó como el número de muestras en las que la llamada de cromosomas sexuales de VeriSeq NIPT Solution v2 coincidió con la clasificación estándar de la referencia clínica, dividida entre el número total de muestras con la misma clasificación estándar en la referencia clínica.

Tabla 13 Porcentaje de concordancia para la clasificación del sexo del feto*

Clasificación del sexo del feto		Fenotipo según examen físico del recién nacido		Resultados citogenéticos							
		Niña	Niño	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY	Otros**	Ausente
Anomalía no detectada	XX	997	0	21	0	2	0	0	0	0	0
Anomalía no detectada	XY	0	966	0	15	0	0	0	0	0	1
Anomalía detectada	XO	0	0	0	0	19	0	0	1	0	0
Anomalía detectada	XXX	0	0	0	0	0	17	0	0	1	0
Anomalía detectada	XXY	0	0	0	0	0	0	23	0	1	0
Anomalía detectada	XYY	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0
Total		997	966	21	15	21	17	23	12	2	1
Porcentaje de concordantes		100	100	100	100	90,5	100	100	91,7	No aplicable	No aplicable

*Cinco embarazos gemelares con presencia de Y se clasificaron correctamente. Dos embarazos sin presencia de Y se clasificaron correctamente.

**Otros resultados citogenéticos fueron XXXXX y XXYY.

Valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de VeriSeq NIPT Solution v2

El valor predictivo positivo (PPV, Positive Predictive Value) y el valor predictivo negativo (NPV, Negative Predictive Value) de la prueba proporcionan información relativa a su capacidad para informar de decisiones clínicas en función de la sensibilidad de la prueba, su especificidad y la probabilidad de prueba previa de que el feto esté afectado por una trisomía (prevalencia). Dado que los PPV y NPV dependen de la prevalencia y que la prevalencia de estas aneuploidías puede variar entre las diferentes poblaciones objeto, los PPV y NPV se han calculado para un intervalo de valores de prevalencia factibles a partir de la sensibilidad y especificidad observadas en el cribado básico (sin mosaicos conocidos) del estudio de exactitud clínica. La [Tabla 17](#) está basada en el cribado del genoma completo (con mosaicos conocidos).

Tabla 14 Prevalencia de trisomía 21, PPV y NPV en cribado básico (excluyendo mosaicos conocidos)

Prevalencia (%)	PPV (%)	NPV (%)
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

Tabla 15 Prevalencia de trisomía 18, PPV y NPV en cribado básico (excluyendo mosaicos conocidos)

Prevalencia (%)	PPV (%)	NPV (%)
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

Tabla 16 Prevalencia de trisomía 13, PPV y NPV en cribado básico (excluyendo mosaicos conocidos)

Prevalencia (%)	PPV (%)	NPV (%)
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

Tabla 17 Prevalencia de cualquier anomalía, PPV y NPV en el cribado del genoma completo (incluyendo mosaicos conocidos)

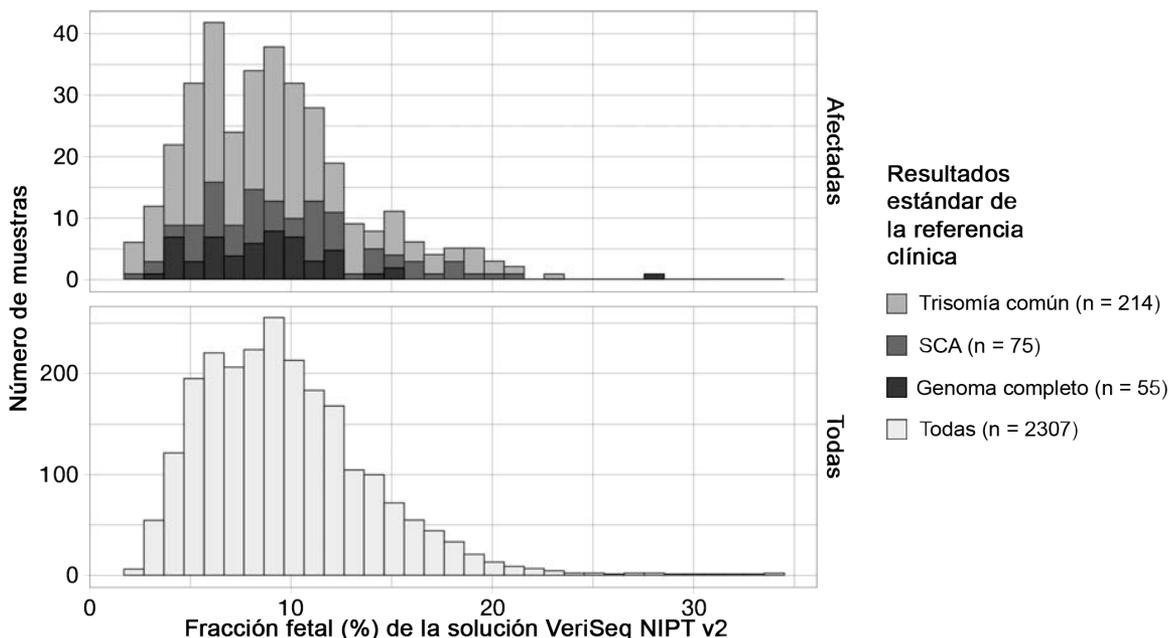
Prevalencia (%)	PPV (%)	NPV (%)
0,01	1,42	>99,99
0,02	2,81	>99,99
0,05	6,74	>99,99

Prevalencia (%)	PPV (%)	NPV (%)
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

Distribución de la fracción fetal

La distribución de las estimaciones de fracción fetal (FF) de VeriSeq NIPT Solution v2 a partir del cribado del genoma completo con mosaicos se muestra en la categoría Resultados estándar de la referencia clínica de la [Figura 1](#).

Figura 1 Distribución de la fracción fetal



Cinco muestras mostraron anomalías en varias categorías.

Dentro de "Trisomía común" se incluyen muestras con trisomía del 21, del 18 o del 13.

Dentro de "Genoma completo" se incluyen muestras con aneuploidías autosómicas raras (RAA), con deleciones o duplicaciones parciales o con ambas dolencias.

Las estimaciones de la FF mostraban un intervalo general de entre el 2 % y el 34 %, con una mediana del 9 % y un intervalo intercuartílico (IQ, Interquartile) de entre el 6 % y el 12 %. La estimación de la mediana de la FF para las trisomías comunes y los eventos detectados mediante el cribado del genoma completo es del 8 % y para las SCA es del 9 %. El intervalo en las estimaciones de FF era homogéneo en todos los resultados. No hay desplazamiento evidente en la distribución de la FF entre trisomías comunes, SCA, eventos detectados mediante el cribado del genoma completo o todas las muestras del análisis del genoma completo.

Rendimiento en embarazos gemelares

Estimación de la trisomía 13, 18 y 21 y rendimiento del cromosoma Y en embarazos gemelares

Debido a la baja prevalencia de la trisomía 21, 18 y 13 en embarazos gemelares, solo se dispuso de un pequeño número de muestras gemelares afectadas para el estudio clínico. Para estimar con mayor precisión el rendimiento de VeriSeq NIPT Solution v2 en embarazos gemelares, se usaron modelos por ordenador (*in silico*) basados en observaciones provenientes de muestras clínicas, para simular poblaciones de embarazos gemelares. Esta simulación fue compatible con la población para el uso previsto. Se determinó la distribución de la fracción fetal a partir de aproximadamente 4500 muestras gemelares y se comparó con la distribución de aproximadamente 120 000 muestras de embarazos de un único embrión. Se determinó la distribución de la fracción fetal con aneuploidía a partir de llamadas posiblemente de embarazos de un único embrión (1044 de trisomía 21, 307 de trisomía 18 y 192 de trisomía 13). La combinación de las dos distribuciones permitió inferir la detección de aneuploidía en gemelos. Se simularon conjuntos de gemelos dicigóticos y monocigóticos y se tomó un promedio ponderado que representara su prevalencia en la población para el uso previsto (2 dicigóticos: 1 monocigótico) para estimar la sensibilidad. Para estimar la especificidad se simularon conjuntos de gemelos no afectados.

La fracción de cada muestra simulada afectada por trisomía (es decir, la fracción afectada) se calculó de forma distinta para cada categoría de muestra:

- En el caso de los gemelos monocigóticos, la fracción afectada de cada muestra se estableció como 1,0 porque, en esta situación, la trisomía afecta a ambos gemelos.
- En el caso de los gemelos dicigóticos, se asumió que solo uno de los gemelos estaba afectado (es muy improbable que ambos gemelos dicigóticos se vean afectados). Los valores de la fracción afectada se simularon mediante la distribución conocida de los cocientes de fracción fetal según se determina en muestras gemelares clínicas de distinto sexo. Se adoptó un enfoque conservador según el que se asumió que el gemelo afectado siempre tenía la fracción fetal menor de los dos gemelos. Se aplicó un factor de corrección a las fracciones fetales con menor afectación promedio en embarazos con trisomía 13 y 18.
- En el caso de los gemelos no afectados, la fracción afectada de cada muestra se estableció en cero.

En el caso de los gemelos afectados por trisomía 18 o 13, se redujo la fracción fetal correspondiente a la fracción afectada de la muestra. Dicha reducción fue proporcional a la reducción promedio de la fracción fetal observada en los datos clínicos en embarazos de un único embrión con trisomía 18 o 13 frente a embarazos de un único embrión euploide.

Tanto la fracción fetal general como la fracción afectada de cada muestra simulada se usaron, a continuación, para calcular una puntuación de aneuploidía mediante el algoritmo estándar de VeriSeq NIPT Solution v2. La sensibilidad se calculó determinando la frecuencia con la que las puntuaciones de aneuploidía para los gemelos afectados simulados eran superiores al correspondiente valor de corte de aneuploidía. De manera análoga, para calcular la especificidad se determinó la frecuencia con la que las puntuaciones de aneuploidía para los

gemelos no afectados simulados era inferior al correspondiente umbral de corte de aneuploidía (Tabla 18). Se estimaron intervalos de confianza del 95 % según el número de muestras gemelares clínicas reales del conjunto de datos original, que se clasificaron como afectados o no afectados por la trisomía en cuestión.

Para estimar la sensibilidad del cromosoma Y en muestras gemelares, se simularon conjuntos de gemelos e XY/XY y XX/XY. Se tomó un promedio ponderado que representara su prevalencia en la población para el uso previsto (1 XY/XY: 1 XX/XY). Para estimar la especificidad del cromosoma Y en gemelos, se simuló un conjunto de gemelos de XX/XX. Los valores de fracción fetal total se simularon de acuerdo con la distribución conocida de la fracción fetal en muestras gemelares clínicas.

En el caso de los gemelos de XY/XY y XX/XY, se estimaron las puntuaciones de cromosoma Y correspondientes usando la relación conocida entre la fracción fetal y las puntuaciones de cromosoma Y en muestras clínicas de un único embrión clasificadas como masculinas. En el caso de los gemelos de XX/XY solo, se simularon los valores de la fracción fetal afectada (es decir, masculina) usando la distribución conocida de los cocientes de fracción fetal observados entre gemelos del mismo embarazo, según determinan las muestras gemelares clínicas de distinto sexo. Se adoptó un enfoque conservador según el que se seleccionó la fracción afectada de forma que correspondiera a la menor de entre los dos gemelos. Para cada muestra simulada de XX/XY, se multiplicó la puntuación de cromosoma Y por la fracción afectada.

En el caso de los gemelos de XX/XX, las puntuaciones de cromosoma Y se tomaron a partir de las puntuaciones observadas en muestras clínicas de embarazo de un único embrión clasificadas como femeninas. La puntuación de cromosoma Y y la fracción fetal general se usaron, a continuación, para clasificar cada muestra simulada según la presencia o ausencia del cromosoma Y, mediante el algoritmo estándar de VeriSeq NIPT Solution v2.

La sensibilidad se calculó determinando la frecuencia con la que los gemelos simulados de XY/XY o XX/XY se clasificaban correctamente como con presencia del cromosoma Y. La sensibilidad se calculó determinando la frecuencia con la que los gemelos simulados de XX/XX se clasificaban correctamente como con ausencia del cromosoma Y. Se estimaron intervalos de confianza del 95 % según el número de muestras gemelares clínicas reales del conjunto de datos original que se clasificaron como con presencia del cromosoma Y o con ausencia del cromosoma Y.

Tabla 18 Estimaciones para trisomía del 21, 18 y 13 en población simulada de embarazos gemelares

	Trisomía 21	Trisomía 18	Trisomía 13	Presencia de Y
Sensibilidad	96,4 %	95,7 %	93,6 %	>99,9 %
IC del 95 % bilateral	(86,4 %, 98,9 %)	(68,3 %, 99,4 %)	(64,1 %, 98,9 %)	(99,9 %, >99,9 %)
Especificidad	99,9 %	>99,9 %	>99,9 %	>99,9 %
IC del 95 % bilateral	(99,8 %, >99,9 %)	(99,9 %, >99,9 %)	(99,9 %, >99,9 %)	(99,7 %, >99,9 %)

La Tabla 18 proporciona las estimaciones puntuales y los intervalos de confianza estimados del 95 % para la sensibilidad y la especificidad de VeriSeq NIPT Solution v2 para detectar la trisomía del 21, 18 y 13 y la presencia de Y en una población simulada de embarazos gemelares compatible con la población para el uso indicado. Los intervalos de confianza se estimaron según el número de muestras gemelares clínicas que

superaron el CC clasificadas como afectadas o no afectadas por la trisomía correspondiente. El cálculo de sensibilidad asume que dos tercios de los embarazos gemelares afectados son dicigóticos con un gemelo afectado, mientras que un tercio de los embarazos gemelares afectados son monocigóticos con ambos gemelos afectados.

Las estimaciones que figuran en la [Tabla 18](#) corresponden solo a embarazos gemelares. Debido a que su prevalencia es aún menor, los datos de embarazos múltiples de orden superior (trillizos o más) eran insuficientes para establecer modelos estadísticos adecuados para estimar la precisión de la detección de la aneuploidía.

Rendimiento analítico

Precisión

Para evaluar y cuantificar la precisión del ensayo, se llevó a cabo un nuevo análisis de los datos mediante el software de procesos de análisis de VeriSeq NIPT Solution v2, a partir de dos estudios previos con VeriSeq NIPT Solution:

- Un estudio de reproducibilidad descentralizado, que incluyó tres experimentos realizados por tres operadores en tres centros usando un único lote de reactivos para un total de nueve experimentos.
- Un estudio de precisión dentro de un mismo laboratorio, que incluyó 12 experimentos en un único centro usando dos plataformas ML STAR, dos sistemas de instrumento de secuenciación y tres lotes de reactivos de secuenciación.

El objetivo del estudio de precisión era cuantificar la precisión del ensayo respecto a la trisomía 21 (T21) y al cromosoma Y, así como estimar la variabilidad entre distintos instrumentos, kits de preparación de librerías y lotes de reactivos de secuenciación.

Se creó un grupo de T21 con el 5 % de fracción fetal mediante la combinación de ADN extracelular circulante extraído de plasma materno de embarazadas (con feto afectado por T21) y ADN extracelular circulante extraído del plasma de mujeres no embarazadas. También se creó un grupo de ADN extracelular circulante materno de feto masculino (XY) con el 10 % de fracción fetal. El panel de muestras para cada estudio y para cada experimento incluyó 4 réplicas del grupo de muestras afectadas por T21 con el 5 % de fracción fetal y 20 réplicas del grupo de ADN extracelular circulante materno de feto masculino con el 10 % de fracción fetal. Se realizaron pruebas durante 10 días con un total de 21 experimentos en los dos estudios combinados.

Para la evaluación, se eligieron la detección de la T21 y la presencia del cromosoma Y por la representatividad de las afecciones clínicas y la complejidad de la detección de la anomalía. Puesto que se trata del autosoma humano más pequeño, el tamaño del cromosoma 21 tiene un impacto directo sobre la sensibilidad de la detección de la T21, especialmente con valores bajos de fracción fetal, como los utilizados en este estudio. El cromosoma Y, como se presenta en el plasma materno, es de origen exclusivamente fetal y, por lo tanto, más fácil de detectar en el ensayo.

Las desviaciones media y estándar observadas para la puntuación del LLR del cromosoma 21 y los valores cromosómicos normalizados (NCV, Normalized Chromosomal Values) del cromosoma Y mostraron que la desviación estándar (SD, Standard Deviation) de réplica fue la mayor fuente de variabilidad. La variación entre centros, instrumentos y lotes de reactivos añadió una variabilidad despreciable, como evidencia la diferencia entre SD total y SD de réplica que figuran en la [Tabla 19](#) y la [Tabla 20](#).

Tabla 19 Resumen de desviación estándar (SD) de respuesta de secuenciación en estudio descentralizado (reproducibilidad)

Respuesta	N	Media	SD de réplica	Total de SD de reproducibilidad*
Puntuación del cociente de verosimilitud logarítmica (LLR) del cromosoma 21	36	34,43	11,36	11,36
Valores cromosómicos normalizados (NCV) del cromosoma Y	180	190,56	7,96	10,20

*El total incluye la variabilidad debida al centro, al operador, al experimento, al día y a la réplica.

Tabla 20 Resumen de precisión de respuesta de secuenciación en un mismo laboratorio

Respuesta	N	Media	SD de réplica	SD total en un mismo laboratorio*
Puntuación del cociente de verosimilitud logarítmica (LLR) del cromosoma 21	48	36,01	9,07	10,25
Valores cromosómicos normalizados (NCV) del cromosoma Y	240	198,68	7,63	7,82

*El total incluye la variabilidad debida al instrumento de secuenciación, al lote de reactivos, al operador, al experimento, al día y a la réplica.

Se llevó a cabo un estudio adicional para comparar la precisión de secuenciación de VeriSeq NIPT Solution v2 (desviación estándar total) usando la versión 2.0 de una celda de flujo en comparación con la versión 2.5. El estudio incluyó dos tipos de celdas de flujo (v2.0 y v2.5), tres lotes de kits de secuenciación, cuatro sistemas de instrumentos y dos experimentos de secuenciación por combinación para un total de 48 experimentos en un único centro. Se preparó un grupo de secuenciación para placas de ADN extracelular circulante preparadas manualmente. El panel de muestras incluyó 4 réplicas del grupo de muestras afectadas por T21 con el 5 % de fracción fetal y 20 réplicas del grupo de ADN extracelular circulante materno de feto XY (masculino) con el 10 % de fracción fetal. Los resultados del estudio se presentan en la [Tabla 21](#) y confirman que no hay diferencias en lo tocante a precisión de la secuenciación si se usan celdas de flujo v2.0 o celdas de flujo v2.5.

Tabla 21 Resumen de precisión de la respuesta de secuenciación en celdas de flujo v2.0 frente a celdas de flujo v2.5

Respuesta	Número de observaciones por versión	Total de desviación estándar (SD) de v2.0*	Total de desviación estándar (SD) de v2.5*	Resultado estadístico**
Puntuación del cociente de verosimilitud logarítmica (LLR) del cromosoma 21	96	9,56	8,44	Significación estadística (valor de p=0,25)
Valores cromosómicos normalizados (NCV) del cromosoma Y	480	7,74	7,38	Significación estadística (valor de p=0,38)

*El total incluye la variabilidad debida al instrumento de secuenciación, al lote de reactivos, al experimento, al día y a la réplica.

**Basado en prueba F para igualdad de varianzas (cuadrado de la desviación estándar).

Contaminación cruzada

Se evaluó la contaminación cruzada en el flujo de trabajo de preparación de muestras de VeriSeq NIPT Solution. Se analizaron grupos de plasma de mujeres no embarazadas (XX) y hombres adultos (XY) en un patrón de damero con el formato de placas de 96 pocillos en 4 placas. N = 48 cada una para muestras de mujeres y hombres por placa, para un total de 192 muestras femeninas y 192 muestras masculinas. Ninguna de las muestras femeninas mostró una cobertura de cromosoma Y que fuera estadísticamente superior a la del contexto estimado, lo que indica una ausencia de contaminación cruzada de muestras masculinas dentro de la misma placa. No se observó contaminación cruzada detectable en VeriSeq NIPT Solution.

Sustancias potencialmente interferentes

Mediante VeriSeq NIPT Solution se evaluó el efecto de sustancias potencialmente interferentes, analizando el rendimiento del ensayo en presencia de dichas sustancias.

Se introdujo albúmina, bilirrubina, hemoglobina y triglicéridos (endógenos) en los grupos de plasma materno de embarazos de feto femenino (XX) no afectados. Se analizaron con dos concentraciones por cada sustancia de prueba (n=16 para cada una). No se observaron interferencias en el rendimiento del ensayo.

Tabla 22 Sustancias potencialmente interferentes (endógenas)

Sustancia de prueba	Concentración de prueba baja (mg/ml)	Concentración de prueba elevada (mg/ml)
Albúmina	35	50

Sustancia de prueba	Concentración de prueba baja (mg/ml)	Concentración de prueba elevada (mg/ml)
Bilirrubina	0,01	0,15
Hemoglobina	100	200
Triglicéridos	1,5	5

El ADN genómico (ADNg) materno presente de manera natural en el plasma también puede interferir potencialmente en el rendimiento del ensayo, ya que se puede extraer junto con el ADN extracelular circulante fetal. Se añadieron niveles de ADN genómico de 1,6 ng, 3,3 ng y 4,9 ng por muestra (que se corresponden con una desviación estándar de 1, 2 y 3 sobre la media prevista de concentración de ADN genómico tras 7 días de almacenamiento de sangre completa¹²) al ADN sin células extraído del plasma materno de embarazos femeninos (feto XX) no afectados. A continuación, las muestras se analizaron en VeriSeq NIPT Solution (n=16 para cada concentración). No se observaron interferencias en el rendimiento del ensayo en presencia de niveles elevados de ADN genómico.

Se analizaron veinte medicamentos potencialmente interferentes (exógenos) que se toman o recetan habitualmente durante el embarazo conforme a EP7-A2 (Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline; 2.ª edición). Los 20 medicamentos potencialmente interferentes se combinaron en cuatro grupos, se introdujeron en el plasma materno de embarazos femeninos (feto XX) no afectados y se probaron en VeriSeq NIPT Solution (n = 16 para cada grupo). No se observó interferencia en el rendimiento del ensayo en presencia estas sustancias exógenas.

Tabla 23 Sustancias potencialmente interferentes (exógenas)

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Paracetamol	Difenhidramina	Salbutamol	Cetirizina
Acetilcisteína	Eritromicina	Bupropión	Dextrometorfano
Bisoprolol	Guaifenesina	Cafeína	Ácido L-ascórbico
Citalopram	Heparina	Sertralina	Metoprolol
Desloratadina	Lidocaína	Fluoruro de sodio	Nadolol

Límite de detección

El límite de detección (LOD, Limit Of Detection) se define como el nivel de fracción fetal que corresponde a la probabilidad de detección del 95 % de una afección de interés, como la T21. Para evaluar el LOD de VeriSeq NIPT Solution v2 para distintas afecciones comunes, se han realizado varios estudios y análisis estadísticos.

La probabilidad de detectar una afección de interés en una muestra afectada procesada mediante VeriSeq NIPT Solution v2 depende fundamentalmente de tres factores:

- la fracción fetal
- la profundidad de secuenciación
- el tamaño y la complejidad de la región genómica de interés.

Si se asume una profundidad de secuenciación constante, es más fácil detectar una aberración determinada en muestras que tengan un porcentaje de fracción fetal mayor que en muestras que tengan un porcentaje de fracción fetal menor. Y viceversa: si se asume una fracción fetal constante, es más fácil detectar una aberración determinada en muestras que tengan una profundidad de secuenciación mayor que en muestras que tengan una profundidad de secuenciación menor. Por último, es más difícil detectar aberraciones en regiones genómicas más pequeñas o más complejas que en regiones genómicas más grandes o menos complejas, si se asumen una fracción fetal y una profundidad de secuenciación constantes.

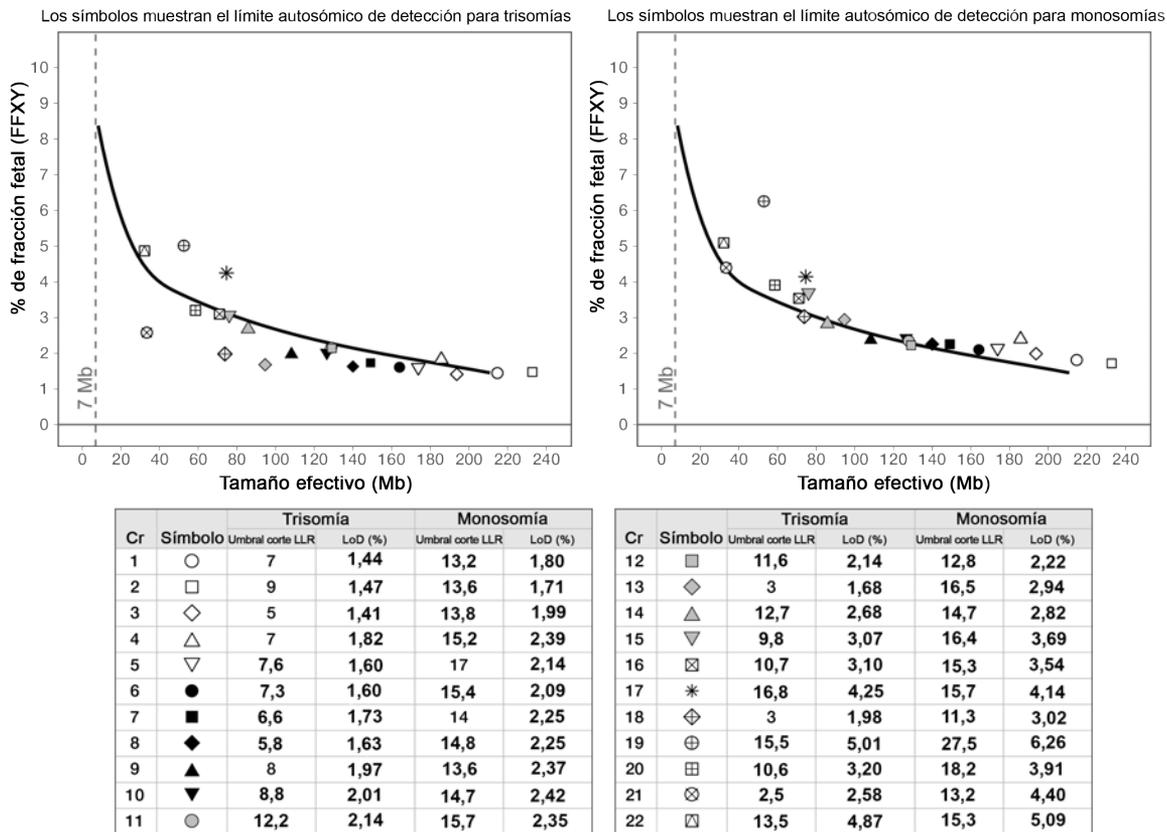
Para determinar el LOD para la detección de la T21, se analizaron muestras que incluían mezclas de muestras con T21 agrupadas y muestras no afectadas agrupadas. Los dos tipos de analitos se mezclaron en series de valoración para crear un conjunto de siete niveles de fracción fetal (0 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 % y 10 %). Cada nivel se representó mediante un total de 10 réplicas.

Para aumentar adicionalmente la resolución de la cuadrícula de fracción fetal para el análisis del LOD, a los datos de este estudio se han añadido datos obtenidos a partir de una dilución por ordenador. Los efectos de la dilución y valoración experimentales se simularon mediante una mezcla controlada de datos de secuenciación. Los datos de esta valoración por ordenador cubrían un conjunto de 14 niveles de fracción 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 % y 4,50 %) con 32 réplicas para cada nivel. Se aplicó un análisis probit a los datos resultantes para determinar el LOD para T21.

De manera independiente, se desarrolló un modelo estadístico para predecir, mediante fracciones fetales, profundidad de secuenciación y tamaño/complejidad genómica, la probabilidad de detección de cualquier aberración en cualquier muestra. Se estableció dicho modelo a partir de los datos correspondientes a un conjunto de 1405 muestras de XY. Se determinó que el LOD para T21, según predecía dicho modelo, concordaba con la estimación basada en probit descrita anteriormente. Se usó este modelo estadístico para estimar los valores del LOD para aneuploidías en todos los autosomas y para deleciones y duplicaciones parciales.

La [Figura 2](#) muestra la probabilidad de detección del 95 % para regiones promedio por tamaño y los límites autosómicos de la detección de todas las trisomías y monosomías.

Figura 2 Probabilidades de detección del 95 % para regiones promedio por tamaño, para VeriSeq NIPT Solution v2



Solución de problemas

Solución de problemas para VeriSeq NIPT Solution v2

Tipo de fallo	Resultado posible	Interpretación	Acción recomendada	Comentarios
Entrada insuficiente de plasma	Error de CC de muestra	Volumen de plasma insuficiente.	Vuelva a extraer la muestra.	Según inspección visual de volumen de plasma.
Fallo de tubo de sangre	Sin separación de sangre en capas	Muestra no centrifugada.	Asegúrese de que se inició el centrifugado y de que el tubo se centrifugó con la fuerza correcta. Vuelva a extraer la muestra.	
		Transporte o almacenamiento incorrecto de la muestra (hemólisis de la muestra).	Vuelva a extraer la muestra.	Las muestras congeladas no se separan. Un transporte o almacenamiento incorrectos pueden provocar la hemólisis de las muestras.

Tipo de fallo	Resultado posible	Interpretación	Acción recomendada	Comentarios
Obstrucción en la muestra o flujo lento	Contaminación del plasma	Las muestras individuales pueden obstruir la placa de unión si hay contaminación suficiente en la muestra de plasma.	Inspeccione la muestra. Si el plasma que queda en el tubo es de color rojo o lechoso, cancele la muestra y solicite una nueva extracción. Si el aspecto de la muestra es normal, repita la prueba de la muestra.	
	Desbordamiento de muestra	Inspección visual inadecuada de cada tubo para determinar la idoneidad de la muestra.	Invalide las muestras de pocillos cercanos afectados por el desbordamiento.	Puede indicar unas condiciones de transporte o conservación incorrectas de la muestra antes del procesamiento. Las muestras no aptas deben descartarse del procesamiento.
	Fallo de hardware	Digestión inadecuada del material durante la extracción.	Repita la prueba de la muestra. Si el problema persiste en otros pocillos con otras muestras, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.	

Tipo de fallo	Resultado posible	Interpretación	Acción recomendada	Comentarios
Error de CC de análisis de muestra individual	Error de CC de secuenciación	Posibles causas: <ul style="list-style-type: none"> • Material genético insuficiente • Error de transferencia durante la manipulación de la muestra • Fallo del reactivo de secuenciación 	Compruebe la anotación de la muestra. Compruebe si ha habido un rendimiento similar en muestras anteriores con posiciones de placa relacionadas. Repita la prueba de la muestra.	Indica una entrada de muestras insuficiente o un error de transferencia de ML STAR. El material genético insuficiente puede deberse a la escasez de ADN sin células en el plasma o a que el ADN con células provoque una dilución de la muestra excesiva para la secuenciación.
	Recuento bajo de FF (fracción fetal) o sitios no excluidos (NES, non-excluded sites)	No se han generado datos suficientes para elaborar un informe preciso.	Repita la prueba del plasma.	

Tipo de fallo	Resultado posible	Interpretación	Acción recomendada	Comentarios
Error de CC de cuantificación	Error de ejecución de la cuantificación. Mediana del lote inferior al mínimo	Rendimiento del proceso insuficiente.	Repita la cuantificación. Si la repetición da error, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.	Los criterios de medición que no superan la curva estándar indican problemas con la preparación de librerías (es decir, uso de etanol no adecuado para biología molecular) o problemas con el proceso de cuantificación.
	Error de ejecución de la cuantificación	Fallo de curva estándar.	Repita la cuantificación. Si la repetición da error, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.	
Error de agrupación	Error al realizar la agrupación de la muestra	El análisis de agrupación no puede calcular los volúmenes correctos de los grupos.	Evalúe de nuevo la concentración del grupo objetivo y realice de nuevo el análisis de agrupamiento.	

Solución de problemas de VeriSeq NIPT Microlab STAR

Paso del proceso	Código de error	Cuadro de diálogo de error	Descripción	Solución
Creación de lotes	EM0044	El ID de lote introducido contiene caracteres no permitidos.	VeriSeq NIPT Solution v2 solo admite números, letras, guiones y guiones bajos en los campos de datos.	Cambie el nombre del lote con un nombre que no contenga caracteres especiales.
Creación de lotes	EM0051	El ID de lote supera los 36 caracteres.	La VeriSeq NIPT Solution v2 tiene un límite de 36 caracteres para los nombres de lote.	Cambie el nombre del lote con un nombre de menos de 36 caracteres.
Creación de lotes	EM0076	No es posible conectar con el VeriSeq Onsite Server v2.	El VeriSeq Onsite Server v2 no responde a las solicitudes de datos de Workflow Manager.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Asegúrese de que ML STAR está conectado a la red. 2. Asegúrese de que VeriSeq Onsite Server v2 está encendido. 3. Compruebe que ML STAR se puede conectar al VeriSeq Onsite Server v2 (mediante solicitud de ping). 4. Compruebe la botella de residuos de vacío. Si la botella de residuos está por encima de la mitad de su capacidad, vacíela. 5. Si los pasos anteriores no resuelven el problema, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Creación de lotes	EM0118	Este lote ha fallado y no se puede seguir procesando.	El lote especificado ha fallado y no se puede seguir procesando.	El registro del lote del VeriSeq Onsite Server v2 indica que el lote seleccionado ha fallado. No se puede seguir procesando. Cree otro lote con las muestras requeridas.

Paso del proceso	Código de error	Cuadro de diálogo de error	Descripción	Solución
Creación de lotes	No aplicable	Este lote ya ha completado el procesamiento. ¿Quiere volver a crear un grupo?	El lote indicado se ha procesado mediante agrupación. El único procesamiento permitido es volver a crear un grupo.	<p>Vuelva a crear un grupo, de la manera siguiente.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Seleccione Re-Pool (Volver a crear un grupo). • Anule el método y asegúrese de que el nombre de lote es correcto antes de volver a crear un grupo.
Aislamiento del plasma	WP0087	Se han cargado códigos de barras de muestras por duplicado.	En el sistema hay cargadas muestras con códigos de barras idénticos.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Siga las indicaciones de Workflow Manager para identificar las muestras duplicadas. 2. Quite los duplicados y cambie las etiquetas o sustitúyalas. 3. Vuelva a cargar las muestras.
Aislamiento del plasma	EP0102	Las muestras especificadas en la hoja de muestras no se han cargado.	Hay muestras incluidas en la hoja de muestras que no se han incluido en los códigos de barras cargados.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Siga las indicaciones de Workflow Manager para identificar las muestras que faltan. 2. Complete una de las opciones siguientes: <ul style="list-style-type: none"> • Añada las muestras que faltan al lote y vuelva a cargarlas. • Anule el método y modifique la hoja de muestras según corresponda. Reinicie el método.
Carga de placas	No aplicable	Error de máscara de código de barras Venus.	Workflow Manager se encarga de aplicar la asociación correcta entre placa y lote mediante máscaras de código de barras Venus.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Compruebe la ubicación de las placas para confirmar que su disposición sea correcta. 2. Asegúrese de que la placa cargada es la correcta para el lote indicado.

Paso del proceso	Código de error	Cuadro de diálogo de error	Descripción	Solución
Extracción del ADN sin células	WE0150	La presión de la cámara de vacío es demasiado baja.	Workflow Manager no continuará si el sensor de presión de la línea de vacío en reposo es inferior a 400 torr.	<ol style="list-style-type: none">1. Compruebe si la línea de vacío está retorcida u obstruida.2. Abra las pinzas de desconexión del conducto de residuos, deje que se reduzca la presión y cierre de nuevo las pinzas.3. Asegúrese de que el controlador de vacío y la bomba estén encendidos.4. Si el problema no se resuelve, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Extracción del ADN sin células	WE0153	La presión de la cámara de vacío es demasiado alta.	Si la presión de la cámara de vacío es demasiado alta antes de iniciar el control de presión, puede que haya algún fallo en el sistema.	Revise si en la parte trasera del controlador están bien colocados todos los conductos de vacío y todas las conexiones.

Paso del proceso	Código de error	Cuadro de diálogo de error	Descripción	Solución
Extracción del ADN sin células	WE0996	Junta de vacío errónea.	Debe solucionarse el problema de sellado para poder continuar.	<p>Verifique que se ha resuelto el fallo de sellado antes de seleccionar OK (Aceptar).</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Compruebe que la placa de unión se ha lavado en el distribuidor de vacío. Póngase un guante y presione la placa de unión con fuerza. 2. Escuche el ruido del vacío y observe el flujo de agua que atraviesa la placa de unión. 3. Abra la vista de rastreo en Workflow Manager. Cuando la lectura real de la presión alcance las 50 unidades de presión por debajo de la lectura ambiental, seleccione OK (Aceptar) para continuar con la extracción de ADN sin células. 4. Si la lectura de presión requerida no se alcanza durante el tiempo asignado, seleccione OK (Aceptar) para continuar con la primera carga de lisado. 5. Pause el método después de que el lisado se haya dispensado en la placa de unión. Vuelva a colocarlo y presione la placa de unión con fuerza. 6. Si el lisado no fluye a través de la placa, escriba un correo electrónico al servicio de asistencia técnica de Illumina.

Paso del proceso	Código de error	Cuadro de diálogo de error	Descripción	Solución
Extracción del ADN sin células	WM0219	Si el vacío está activado, detenga la bomba manualmente.	El vacío puede permanecer activo tras anular un método durante la extracción.	<ol style="list-style-type: none"> 1. En el controlador de vacío, pulse el botón de encendido para apagar el vacío. 2. Espere 10 segundos y pulse de nuevo el botón de encendido para encender el vacío.
Extracción del ADN sin células	EE0477	Se ha producido un error durante el desplazamiento de una placa. (Error de iSWAP)	Si se detecta un error de iSWAP (se ha caído la placa, no se ha podido recoger, etc.), el sistema le indicará que termine de mover la placa manualmente.	<p>Asegúrese de que la placa se puede recuperar (no se ha derramado material).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Si no se puede recuperar la placa, anule el experimento. • Si se puede recuperar la placa, siga las instrucciones mostradas para realizar la transferencia de la placa manualmente.
Extracción del ADN sin células	EE0519	Los códigos de barras escaneados no coinciden con el código de barras de unión registrado.	La placa de unión cargada no coincide con el código de barras de la placa quitada.	Asegúrese de que la placa que está en proceso de carga coincide con el código de barras registrado (consulte el registro de rastreo para comprobar el código de barras previsto).

Paso del proceso	Código de error	Cuadro de diálogo de error	Descripción	Solución
API	EA0372	No es posible conectar con el servidor de datos.	El VeriSeq Onsite Server v2 no responde a las solicitudes de datos de Workflow Manager.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Asegúrese de que ML STAR está conectado a la red. 2. Asegúrese de que VeriSeq Onsite Server v2 está encendido. 3. Compruebe que ML STAR se puede conectar al VeriSeq Onsite Server v2 (mediante solicitud de ping).
	EA0774	Error de conexión. No se ha podido validar la conexión con el servidor de la API.	El VeriSeq Onsite Server v2 ha dejado de responder a las solicitudes de datos de Workflow Manager.	<p>Compruebe lo siguiente:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Asegúrese de que ML STAR está conectado a la red. 2. Compruebe que ML STAR se puede conectar al VeriSeq Onsite Server v2 (mediante solicitud de ping). 2. Asegúrese de que el VeriSeq Onsite Server v2 está encendido.
	EA0780	403: solicitud no válida La transacción actual no es válida.	Los datos enviados no cumplen la lógica del flujo de trabajo del sistema.	Consulte los detalles del error para obtener más información. Este error suele deberse a un exceso de caracteres o al uso de caracteres no permitidos.

Referencias

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, Nicolaides 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. I 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.

Historial de revisiones

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de documento 1000000078751 v08	Agosto de 2022	Se ha actualizado el número de referencia del flujo de trabajo Se ha eliminado la instrucción de pipetear para mezclar si la placa de librería estaba congelada.
N.º de documento 1000000078751 v07	Mayo de 2022	Limitaciones de división del procedimiento en la generación de informes de VeriSeq NIPT Solution v2 e inclusión de las dos primeras viñetas. Resto del texto en un nuevo encabezado Limitaciones del ensayo. Eliminado <ul style="list-style-type: none"> • VeriSeq de todas las etiquetas de los reactivos. • Coloque un código de barras de placa en la placa adaptadora VeriSeq NIPT en Preparación de librerías. Añadido <ul style="list-style-type: none"> • El término "certificada" al agua sin ARNasa ni ADNasa. • Uno de los lectores de microplacas siguientes, o equivalente y SpectraMax M2, M3, M4, M5, y nota. • En la sección VeriSeq NIPT Microlab STAR para explicar cómo proceder durante un evento de manejo de errores. • Una nota sobre la inspección visual de los pocillos. • Instrucciones para lotes de 24 y 48 muestras en todas las secciones del protocolo. • Pasos para el momento de utilizar la placa adaptadora violeta, o equivalente. • Se ha modificado la terminología de la sección Demografía y características del embarazo para incluir los resultados del primer trimestre del embarazo. • Se ha añadido una viñeta en las especificaciones de la placa de pocillos profundos para incluir la resistencia a la torsión. Actualizado

Documento	Fecha	Descripción del cambio
		<ul style="list-style-type: none">• Terminología para nombres de lote exclusivos para mayor claridad e inclusión de un ejemplo.• Símbolos y formatos para Notas, Precauciones y Advertencias.• Subviñetas de resultados de ensayo.• De tiocianato de guanidina a clorhidrato de guanidina.• De CVS a BVS (Basic Vacuum System, sistema de vacío básico).• Terminología para usar la pantalla de Genoma completo y la puntuación de LLR.• Especific.: especific. cubeta de reactivos, placas de pocillos profundos, placas de 384 pocillos, placas de 96 pocillos.
N.º de documento 1000000078751 v06	Agosto de 2021	Se ha modificado la dirección del representante autorizado en la UE.

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de documento 1000000078751 v05	Diciembre de 2020	<p>Se han actualizado las secciones Principios de procedimiento, Advertencias y precauciones y Etiquetado de productos con aclaraciones adicionales para cumplir los requisitos normativos. Se han hecho actualizaciones menores en el contenido del protocolo para adaptarlo al estilo y la organización actuales de Illumina.</p> <p>Se ha corregido la descripción del cromosoma 21 de "segundo autosoma humano más pequeño" a "autosoma humano más pequeño" en el apartado Precisión de la sección Rendimiento analítico.</p> <p>Se han añadido enunciados de precaución para abordar el uso inadecuado de los depósitos y el riesgo de amalgamación de muestras en el apartado Preparación de la sección Aislamiento de plasma y en la sección Interpretación de resultados.</p> <p>Se han añadido nuevos números de referencia de servidor y software para el lanzamiento de un nuevo modelo de servidor y las actualizaciones del número de referencia del software.</p> <p>Se han añadido precauciones al protocolo, además de información sobre la solución de problemas para abordar y prevenir los desbordamientos de muestra.</p> <p>Se han actualizado los ingredientes activos del estándar de cuantificación de ADN de la caja de accesorios para que coincida con la hoja de datos de seguridad.</p> <p>Se han actualizado las convenciones de nomenclatura del módulo VeriSeq NIPT de Local Run Manager por coherencia con otra documentación.</p> <p>Se ha añadido un historial de revisiones.</p>
N.º de documento 1000000078751 v04	Octubre de 2020	Correcciones menores.
N.º de documento 1000000078751 v03	Septiembre de 2020	Se ha actualizado la lista de materiales para incluir las especificaciones del material de laboratorio junto con las opciones compatibles conocidas.

Documento	Fecha	Descripción del cambio
N.º de documento 1000000078751 v02	Febrero de 2020	<p>Se ha actualizado la presentación de la información de Resultados clínicos para transmitir mejor las diferencias entre los cribados básicos y del genoma completo.</p> <p>Se ha añadido la sección Diferencias en el rendimiento de los cribados básicos y del genoma completo</p> <p>Se ha eliminado información contradictoria sobre la naturaleza opcional del informe adicional de la sección Principios de procedimiento.</p> <p>Se ha actualizado la convención de nomenclatura del software VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 en todo el documento para lograr una coherencia estilística.</p> <p>Se ha actualizado el etiquetado de las direcciones de Australia e Illumina Netherlands para reflejar los cambios recientes.</p>
N.º de documento 1000000078751 v01	Agosto de 2019	Se ha eliminado un paso duplicado en Extracción de ADN sin células a causa de un error en el software de edición.
N.º de documento 1000000078751 v00	Mayo de 2019	Publicación inicial.

Patentes y marcas comerciales

Este documento y su contenido son propiedad de Illumina, Inc. y sus afiliados ("Illumina") y están previstos solamente para el uso contractual de sus clientes en conexión con el uso de los productos descritos en él y no para ningún otro fin. Este documento y su contenido no se utilizarán ni distribuirán con ningún otro fin ni tampoco se comunicarán, divulgarán ni reproducirán en ninguna otra forma sin el consentimiento previo por escrito de Illumina. Illumina no transfiere mediante este documento ninguna licencia bajo sus derechos de patente, marca comercial, copyright ni derechos de autor o similares derechos de terceros.

Para asegurar el uso correcto y seguro de los productos descritos en este documento, el personal cualificado y adecuadamente capacitado debe seguir las instrucciones incluidas en este de manera rigurosa y expresa. Se debe leer y entender completamente todo el contenido de este documento antes de usar estos productos.

SI NO SE LEE COMPLETAMENTE EL DOCUMENTO Y NO SE SIGUEN EXPRESAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES DESCRITAS EN ESTE, PODRÍAN PRODUCIRSE DAÑOS EN EL PRODUCTO, LESIONES PERSONALES, INCLUIDOS LOS USUARIOS U OTRAS PERSONAS Y DAÑOS EN OTROS BIENES Y QUEDARÁ ANULADA TODA GARANTÍA APLICABLE AL PRODUCTO.

ILLUMINA NO ASUME RESPONSABILIDAD ALGUNA DERIVADA DEL USO INCORRECTO DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (INCLUIDAS LAS PIEZAS O EL SOFTWARE).

© 2022 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Para obtener información específica sobre las marcas comerciales, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

Información de contacto



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 (EE. UU.)
+1 800 809 ILMN (4566)
+ 1 858 202 4566 (fuera de Norteamérica)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE
2797



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Países Bajos

Patrocinador australiano

Illumina Australia Pty Ltd
Nursing Association Building
Level 3, 535 Elizabeth Street
Melbourne, VIC 3000
Australia

Etiquetado de productos

Para obtener una información detallada sobre los símbolos que aparecen en las etiquetas o en el embalaje del producto, consulte la leyenda que se ofrece en support.illumina.com en la ficha *Documentation* (Documentación) del kit.

Encontrará un resumen de la seguridad y el rendimiento (SSP, Summary of Safety and Performance) en <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>, tras el lanzamiento de la base de datos europea sobre productos sanitarios (Eudamed, European Database on Medical Devices), que está vinculada al sistema Basic UDI-DI (0081627002NIPTRP).