



Plasma-SeqSensei™

Breast Cancer IVD Kit

Instruções de utilização

Dezembro de 2023

ZR150547.R3

TESTE IN VITRO/Para diagnóstico in vitro

Glossário de símbolos			
	Fabricante		Utilizar até
	Número de catálogo		Número de lote
	Conteúdo suficiente para <n> testes		Atenção
	Limite de temperatura		Consulte as instruções de utilização
	Diagnóstico in vitro		Não reutilizar
	Manter afastado da luz		Manter seco
	Limite de humidade		

Índice

1	Utilização prevista.....	3
2	Introdução	4
3	Princípio do teste	5
4	Regiões abrangidas	7
5	Interpretação dos resultados das variantes	8
6	Limitações	9
7	Reagentes, consumíveis e equipamento	10
7.1	Material fornecido	10
7.2	Material não fornecido	13
7.3	Consumíveis	14
7.4	Equipamento	14
8	Armazenamento e manuseamento	16
8.1	Condições de transporte	16
8.2	Precauções gerais de manuseamento	16
8.3	Avisos e precauções.....	16
8.3.1	Medidas específicas.....	17
8.3.2	Manuseamento e armazenamento.....	17
8.3.3	Precauções de manuseamento de reagentes	18
8.3.4	Precauções relativas a segurança e contaminação.....	19
9	Fluxo de trabalho	21
9.1	UID PCR (Multiplex PCR)	22
9.2	Purificação de UID PCR	28
9.3	Index PCR	32
9.4	Purificação de Index PCR.....	37
9.5	CQ da biblioteca (Bioanalisador)	41
9.6	Sequenciação no Illumina NextSeq™ 500/550.....	45
10	Assistência técnica.....	49
11	Características de desempenho	50
11.1	Sensibilidade analítica	50
11.2	Especificidade analítica	50
11.3	Precisão/repetibilidade	50
11.4	Intervalo de medição/linearidade.....	51
11.5	Substâncias interferentes	51
11.6	Características e desempenho clínico	51
11.7	Limitações.....	52
12	Glossário e terminologia	53
13	Referências.....	55
14	Direitos reservados e marcas comerciais	56
15	Histórico de revisões.....	57

1 Utilização prevista

O Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit é um ensaio quantitativo de sequenciação de nova geração (NGS) destinado à detecção e identificação de mutações de genes alvo AKT1, ERBB2, ESR1, KRAS, PIK3CA e TP53 em ADN sem células (cfDNA) circulante humano isolado do plasma sanguíneo de doentes com cancro de mama, para detecção de doença residual mínima, vigilância de reincidência e monitorização de resposta (neo-)adjuvante em doentes.

O Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit apenas deve ser utilizado em conjunto com o Plasma-SeqSensei™ IVD Software para alcançar a utilização prevista e tem de ser realizado por pessoal qualificado num ambiente de laboratório profissional. As informações geradas nunca devem ser o único fator determinante para a tomada de decisões médicas.

Nota: *O Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit não se destina a ser utilizado no rastreio, no diagnóstico de cancro ou como diagnóstico complementar.*

2 Introdução

O cancro da mama é o cancro mais frequentemente diagnosticado e a principal causa de morte por cancro entre as mulheres em todo o mundo (1). Durante os últimos anos, realizou-se uma investigação aprofundada sobre cirurgia curativa, terapia (neo-)adjuvante e terapia orientada, que resultou num aumento da taxa de sobrevivência (2).

As células tumorais que sofrem apoptose, necrose ou secreção metabólica libertam pequenas quantidades do respetivo ADN na corrente sanguínea. A fração específica do tumor de cfDNA é denominada ADN tumoral circulante (ctDNA) e contém a informação genética do tumor principal e mesmo das metástases. Uma multiplicidade de estudos e ensaios de investigação demonstrou a aplicação clínica da caracterização do ctDNA em diferentes fases do tratamento do cancro, incluindo seleção da terapêutica, prognóstico e monitorização (3).

Estão disponíveis várias tecnologias baseadas em NGS para a deteção de ctDNA. No entanto, devido a erros/desvios de sequenciação e PCR, a maioria não é adequada para a deteção de variantes raras. Plasma-SeqSensei™ é uma nova tecnologia baseada em NGS que implementa identificadores moleculares únicos (UID) no fluxo de trabalho de sequenciação. Isto resulta numa redução significativa de erros, conduzindo a uma sensibilidade ultraelevada da tecnologia Plasma-SeqSensei™ (4).

3 Princípio do teste

O Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit deteta mutações de genes no ctDNA isolado do plasma sanguíneo. Para aumentar a sensibilidade do método, os fragmentos de ADN são marcados com UIDs durante o primeiro passo de amplificação. Isto resulta na formação de famílias de UIDs que são constituídas por várias cópias de cada UID atribuído. Durante a segunda etapa de amplificação, a cada membro de uma família de UID é adicionalmente atribuído um código de barras específico do poço e da placa (4). Por razões de validade, é incluído um controlo interno de entrada da quantificação (Quantispike), para além dos controlos externos positivos e negativos em cada série.

O fluxo de trabalho inclui a análise automatizada de dados e a geração de relatórios utilizando o Plasma-SeqSensei™ IVD Software. O software quantifica a entrada de cfDNA e identifica supermutações, que são famílias UID nas quais, pelo menos, 90 % de todos os fragmentos de PCR contêm mutações idênticas. Este conceito permite a discriminação de mutações reais de artefactos de PCR ou sequenciação presentes apenas num número muito reduzido de membros da família UID. O processo principal da tecnologia Plasma-SeqSensei™ é apresentado na Figura 1.

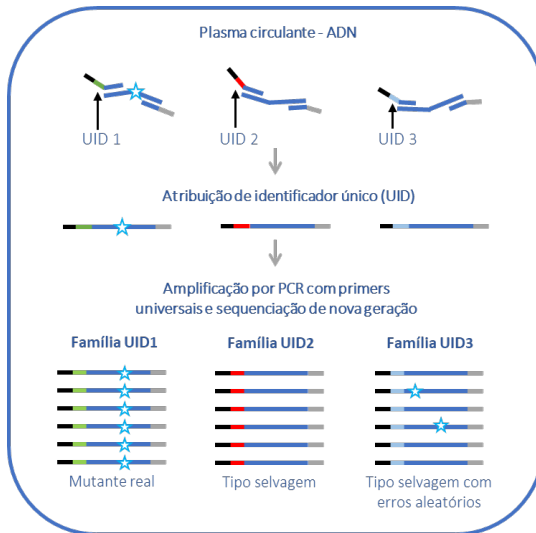


Figura 1: Princípio da tecnologia Plasma-SeqSensei™

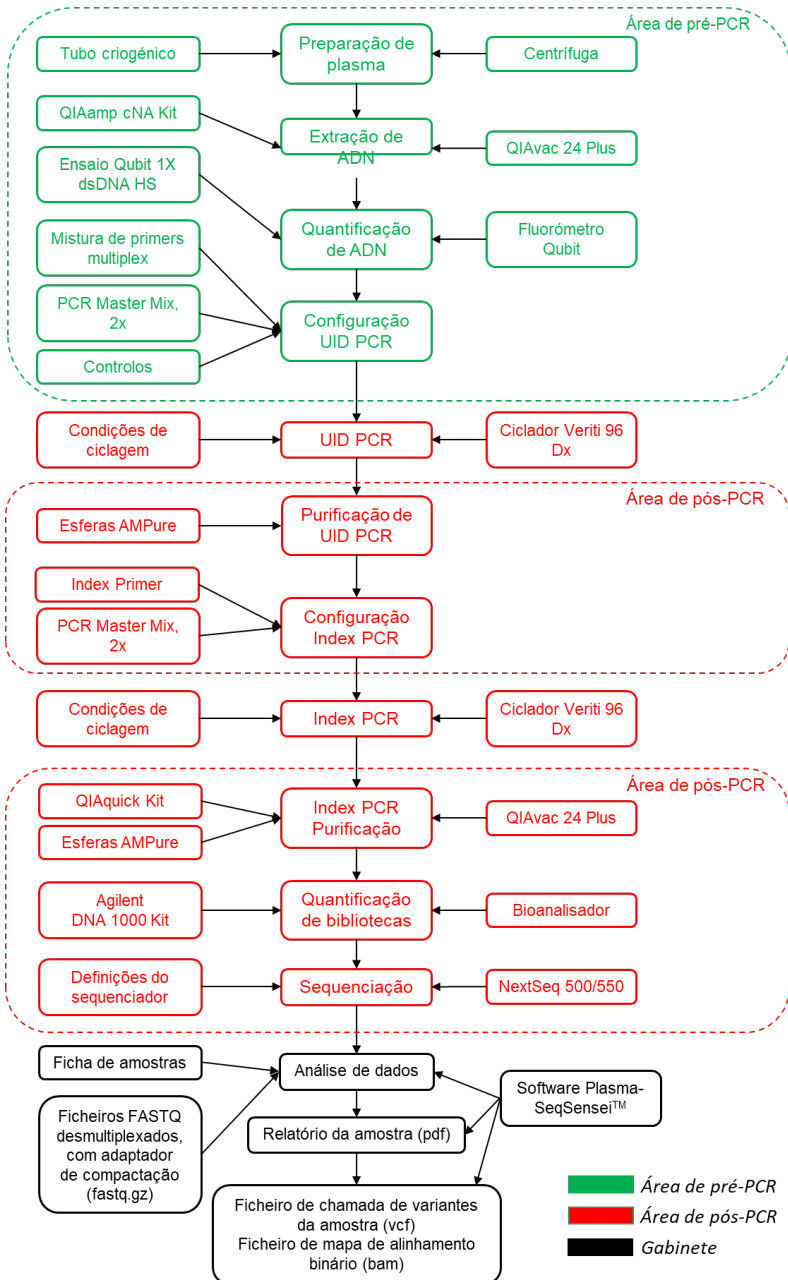


Figura 2: Vista geral do fluxo de trabalho do método Plasma-SeqSense™

4 Regiões abrangidas

Tabela 1: Regiões abrangidas com o Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit

Gene	Transcrição*	Início da sequência de codificação	Fim da sequência de codificação	Início do aminoácido	Fim do aminoácido
AKT1	ENST00000554581.1	47	69	17	23
ERBB2	ENST00000269571.5	907	947	303	315
ERBB2	ENST00000269571.5	2,258	2,307	754	769
ERBB2	ENST00000269571.5	2,308	2,360	770	786
ESR1	ENST00000440973.1	1,108	1,143	370	381
ESR1	ENST00000440973.1	1,378	1,420	460	473
ESR1	ENST00000440973.1	1,583	1,614	529	538
KRAS	ENST00000256078.4	8	43	4	14
PIK3CA	ENST00000263967.3	254	278	86	92
PIK3CA	ENST00000263967.3	329	352	111	117
PIK3CA	ENST00000263967.3	353	367	119	122
PIK3CA	ENST00000263967.3	1,033	1,058	345	352
PIK3CA	ENST00000263967.3	1,085	1,115	363	371
PIK3CA	ENST00000263967.3	1,252	1,264	418	421
PIK3CA	ENST00000263967.3	1,348	1,387	450	462
PIK3CA	ENST00000263967.3	1,611	1,659	538	553
PIK3CA	ENST00000263967.3	2,138	2,184	714	728
PIK3CA	ENST00000263967.3	3,118	3,169	1,040	1,056
TP53	ENST00000269305.4	144	232	49	77
TP53	ENST00000269305.4	293	375	99	125
TP53	ENST00000269305.4	376	423	126	141
TP53	ENST00000269305.4	451	537	151	179
TP53	ENST00000269305.4	574	659	192	219
TP53	ENST00000269305.4	695	782	233	260
TP53	ENST00000269305.4	783	856	262	285
TP53	ENST00000269305.4	888	919	297	306
TP53	ENST00000269305.4	920	993	308	331
TP53	ENST00000269305.4	994	1,080	332	360

*Fonte da sequência: base de dados Ensemble

5 Interpretação dos resultados das variantes

O ensaio foi concebido para detetar mutações somáticas no ctDNA derivado do plasma. Os resultados deste teste podem servir de complemento ao trabalho do médico que o solicita e, como tal, devem ser interpretados no contexto dos resultados clínicos, da patologia do tumor e de outros dados laboratoriais por um profissional de saúde qualificado.

Frequências de mutação:

As frequências de mutação são comunicadas como MAF (fração de alelos mutantes) e número absoluto de MM (moléculas mutantes). MAF é a proporção de ctDNA mutante em relação ao cfDNA total. A MAF pode ser utilizada para confirmar a presença ou ausência de mutações. No entanto, pode não refletir a carga tumoral global, uma vez que a proporção de ctDNA em relação ao cfDNA total numa amostra pode ser afetada por vários fatores, incluindo a localização anatómica do tumor, a renovação das células tumorais, a vascularização, o tratamento, os procedimentos de colheita de sangue, a preparação da amostra e as características clínicas do doente não relacionadas com o estado do tumor (5). O número absoluto de MM detetadas para uma determinada variante representa o número total de moléculas detetadas numa amostra e pode fornecer informações diretas sobre características da biologia tumoral exclusivas de cada doente (5)(6).

Variantes comunicadas:

São comunicadas as variantes com impacto funcional caracterizado, provável ou previsto. Estas baseiam-se em bases de dados publicamente disponíveis, como a COSMIC (7) e/ou na literatura científica revista por pares (6)(8)(9). Além disso, as variantes de origem suspeita da linha germinal, indicadas por um MAF observado entre 40 % e 60 % ou um MAF observado superior a 90 %, são apresentadas numa tabela separada do relatório.

6 Limitações

As suspeitas de mutações da linha germinal são excluídas dos relatórios de mutações somáticas com base nos valores MAF observados. No entanto, são listadas numa tabela separada e assinaladas como potenciais mutações da linha germinal, uma vez que este teste não pode determinar definitivamente se estas mutações têm origem na linha germinal sem a análise de células saudáveis correspondentes.

Além disso, as mutações comunicadas para determinados genes num pequeno subconjunto de doentes podem ser o resultado de hematopoiese clonal e devem ser avaliadas através da análise de células sanguíneas correspondentes.

A deteção do ctDNA depende de vários fatores, incluindo a carga tumoral, a biologia do tumor, as condições de colheita da amostra, a heterogeneidade da amostragem e as características clínicas. Foi demonstrado que o teste apresenta variações baixas, mas detetáveis, dependendo do contexto da sequência, especialmente em amostras com contagens de moléculas-alvo próximas do limiar.

Este teste deteta alterações de nucleótidos e as alterações de aminoácidos resultantes são descritas no relatório. No caso de tripletos de nucleótidos codificadores de aminoácidos apenas parcialmente abrangidos (limites do amplicão), a anotação de aminoácidos no relatório é feita com base no pressuposto de que as bases não abrangidas pelo ensaio correspondem à sequência de referência.

O Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit foi testado para detetar os seguintes tipos de mutações somáticas: variações de nucleótido único (SNVs), inserções (até 27 nucleótidos), deleções (até 48 nucleótidos) e variantes de deleção/inserção (até 17 nucleótidos).

7 Reagentes, consumíveis e equipamento

O Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit contém duas subcaixas e um saco. Uma caixa deve ser armazenada no laboratório de pré-PCR e a outra caixa, bem como o saco que contém a Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate, devem ser armazenados no laboratório de pós-PCR. Recomenda-se vivamente a divisão da caixa do Kit à chegada em dois laboratórios separados para minimizar o risco de contaminação dos reagentes. A caixa de pré-PCR destina-se a ser manuseada num laboratório onde não seja manuseado ADN amplificado. A caixa de pós-PCR e o saco devem ser manuseados num laboratório onde os frascos/placas de reação PCR são abertos e manuseados.

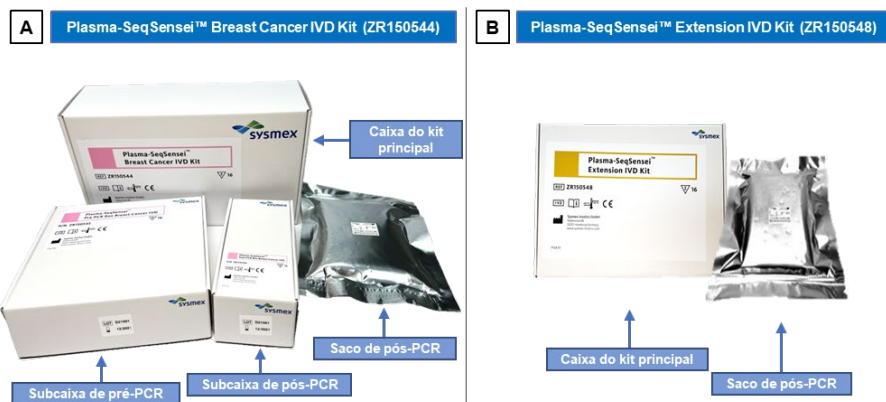
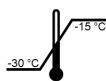


Figura 3: São apresentadas as caixas do Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit com saco (A) e a caixa e saco do Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit (B) com os respetivos locais de armazenamento (áreas de pré/pós-PCR).

7.1 Material fornecido

O material fornecido é essencial para o ensaio e não pode ser substituído por outros produtos.

7 Reagentes, consumíveis e equipamento



O Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit deve ser armazenado a uma temperatura entre -15 °C e -30 °C quando não estiver a ser utilizado.

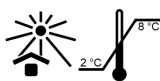


Depois de abertos, os reagentes permanecem estáveis durante 30 dias ou até ao fim da data de validade, consoante o que ocorrer primeiro (exceto água).

Tabela 2: Material fornecido com o Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit (ZR150544)

Caixa	Nome* (cor da tampa)	N.º cat.	Tubos	Ciclos de congelamento- descongelamento	Temperatura de armazenamento
Caixa de pré-PCR	Breast Cancer Mpx A (azul)	ZR851013	4	2	-15 °C a -30 °C
	Breast Cancer Mpx B (amarelo)	ZR851014	4	2	-15 °C a -30 °C
	Breast Cancer Positive Control (vermelho)	ZR855006	4	2	-15 °C a -30 °C
	No Template Control (transparente)	ZR854002	4	2	-15 °C a -30 °C
	Quantispike (verde)	ZR856001	4	2	-15 °C a -30 °C
	PCR Master Mix v2, 2x (preto)	ZR850001	4	4	-15 °C a -30 °C
Saco de pós-PCR	Index Primer Plate IND34 ^{1,2}	ZR852004	1	N/A	-15 °C a -30 °C
Caixa de pós-PCR	PCR Master Mix v2, 2x (preto)	ZR850001	2	4	-15 °C a -30 °C
	Água, sem nuclease (transparente/branco)	ZR224006	1	N/A	-15 °C a -30 °C

*Os nomes podem divergir pela adição de PSS antes do nome, dependendo do lote do kit.



¹ Proteja as placas da exposição à luz. Após a primeira utilização, armazene a Index Primer Plate a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C.

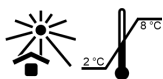
² Index Primer Plate IND34, também denominada Placa A no fluxo de trabalho e no Plasma-SeqSensei™ IVD Software

No caso de serem analisadas mais de 16 amostras na mesma série de sequenciação, deve ser encomendado um Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit.

Tabela 3: Material fornecido com o Plasma-SeqSense™ Extension IVD Kit (ZR150548)

Caixa	Nome* (cor da tampa)	N.º cat.	Tubos	Ciclos de congelamento- descongelamento	Temperatura de armazenamento
Saco de pós-PCR	Index Primer Plate IND35 ^{1,2}	ZR852005	1	N/A	-15 °C a -30 °C

*Os nomes podem divergir pela adição de PSS antes do nome, dependendo do lote do kit.



¹ Proteja as placas da exposição à luz. Após a primeira utilização, armazene a Index Primer Plate a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C.

² Index Primer Plate IND35, também denominada Placa B no fluxo de trabalho e no Plasma-SeqSense™ IVD Software

Tabela 4: Composição do material fornecido

Nome	Composição
Breast Cancer Mpx A	Primers Tris EDTA Buffer
Breast Cancer Mpx B	Primers Tris EDTA Buffer
Breast Cancer Positive Control	ADN sintético de cadeia dupla de tipo selvagem/mutante Tris EDTA Buffer ARN portador
No Template Control	Tris EDTA Buffer
Quantispike	ADN sintético de cadeia dupla Tris EDTA Buffer ARN portador
Index Primer Plate	Index primers (específicos para poço) Azul de bromofenol
PCR Master Mix v2, 2x	Polimerase de arranque a quente PCR Buffer dNTPs
Água, sem nuclease	Água sem nuclease, grau de biologia molecular



Todos os componentes líquidos e secos do kit são de utilização única. Cada poço da Index Primer Plate é de utilização única.

Os tubos que contêm reagentes são reagentes de utilização múltipla, uma vez que podem ser descongelados e congelados de acordo com a Tabela 2 para extrair líquido para as etapas indicadas do fluxo de trabalho.

7.2 Material não fornecido

Os produtos, cujos dados relativos ao fabricante/fornecedor e número de encomenda são indicados na Tabela 5, Tabela 6 e Tabela 7, são essenciais para o ensaio e não podem ser substituídos por produtos com qualidade e/ou propriedades comparáveis.

Tabela 5: Material não fornecido com o Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit

Material	Produto
Reagentes e kits	Etanol (EtOH) ≥ 99,8 %, p.a.
	Água destilada isenta de RNase e DNase
	* Agencourt® AMPure® XP, Beckman Coulter, #A63881
	* Buffer EB (Elution Buffer), QIAGEN, #19086
	* QIAquick® PCR Purification Kit, QIAGEN, #28104 ou #28106
	* Buffer PB, QIAGEN, #19066
	* DNA 1000 Kit, Agilent, #5067-1504 <ul style="list-style-type: none"> ■ Chips microfluídicos ■ Reagentes
	* Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher, #Q33230 (100 rxns) ou #Q33231 (500 rxns)
	Hidróxido de sódio (NaOH), 1 M
	Solução de hidróxido de Trizma® pH 7,0, 1 M
	* NextSeq™ 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 ciclos), Illumina, #20024904 Peças do kit: <ul style="list-style-type: none"> ■ Mid Output Reagent cartridge (150 ciclos), #15057940 ■ Mid Output Flow Cell cartridge, #20022409 ■ Buffer cartridge, #15057941 ■ Hybridization Buffer (HT1), #15058251
	* NextSeq™ 500/550 High Output Kit v2.5 (150 ciclos), Illumina, #20024907 Peças do kit: <ul style="list-style-type: none"> ■ High Output Reagent cartridge (150 ciclos), #15057931 ■ High Output Flow Cell cartridge, #20022408 ■ Buffer cartridge, #15057941 ■ Hybridization Buffer (HT1), #15058251

*Componentes essenciais; não podem ser substituídos por produtos com qualidade e/ou propriedades comparáveis.

7.3 Consumíveis

Tabela 6: Consumíveis necessários para o Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit

Equipamento de laboratório	Produto
Pontas de pipeta/pipetas serológicas	Pontas de pipeta estéreis resistentes a aerossóis com filtros de 2, 10, 20, 200 e 1000 µl
Tubos de reação	Tubos de 15, 5, 2 e 1,5 ml
	* Tubos de ADN LoBind® de 1,5 ml, Eppendorf, #0030108051
	* Tubos de ensaio Qubit™, Thermo Fisher, #Q32856
	Tiras de tubo e tampas (1,3 ml)
Placas de 96 poços	* Placa PCR, 96 poços, segmentada, com aba semicircular, Thermo Scientific, #AB0900 ou #AB2400 (necessária para PCR)
	Placa PCR de 96 poços Multiply® sem aba lateral, Sarstedt (opcional, apenas para diluições)
Película de vedação para placas de 96 poços	Folha de alumínio
	Película adesiva transparente
Equipamento de segurança	Batas de proteção, mangas, óculos, proteções descartáveis para calçado, luvas
Materiais diversos	Reservatórios de reagentes descartáveis (25 ml)
	* Tubos de extensão de 3 ml para coletores de vácuo QIAvac, QIAGEN, #19587
	* VacConnectors (500) para coletores de vácuo QIAvac, QIAGEN, #19407

*Componentes essenciais; não podem ser substituídos por produtos com qualidade e/ou propriedades comparáveis.

7.4 Equipamento

Tabela 7: Equipamento necessário para o Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit

Equipamento de laboratório	Produto
Instrumentos eletrônicos	Centrífuga para tubos de 1,5/2 ml, com capacidade de 20 000 × g, rotor de ângulo fixo
	Centrífuga para tubos de 15/50 ml, com capacidade de 7197 × g, rotor de ângulo fixo

7 Reagentes, consumíveis e equipamento

Equipamento de laboratório	Produto
	Centrífuga para placas de 96 poços, com capacidade de 1000 × g, rotor de ângulo fixo
	Minicentrífuga com capacidade de ≤ 2000 × g
	Vortexer com encaixes para tubos e placas de 96 poços
	Vortexer com encaixe para chips de ADN Agilent, com capacidade de 2400 rpm
	Congelador, -15 °C a -30 °C
	Refrigerador, 2 °C a 8 °C
	Estação de trabalho de ADN/câmara de PCR
	Exaustor (fortemente recomendado)
	Câmaras de segurança biológica de classe II (fortemente recomendado)
	QIAGEN Connecting System
	QIAvac 24 Plus System
	Bomba de vácuo (230 V, 50 Hz)
	Termociclador Veriti Dx de 96 poços ou equivalente [■]
	Agilent 2100 Bioanalyzer System
	Chip Priming Station, Agilent, #5065-4401
	Illumina NextSeq™ 500/550
2100 Expert Software, Agilent Technologies	
Pipetas	Pipeta de 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl, 2 µl
	Pipeta multicanal de 8 ou 12 canais de 200 µl, 20 µl
	Pipetador de 5 a 100 ml
Racks	Rack de tubos de 50 ml, 15 ml, 5 ml, 1,5/2 ml
	Rack de tubos em cadeia
	Rack de 96 poços
	96S Super Magnet Plate, Alpaqua® SKU: A001322
	DynaMag™-2 Magnet, Thermo Fisher, #12321D
	Caixas de armazenamento para congelador
Materiais diversos	Aplicador de película
	Cronómetro

■ A equivalência deve ser determinada pelo utilizador e a utilização de outros termocicladores é da responsabilidade do próprio utilizador.

8 Armazenamento e manuseamento

8.1 Condições de transporte

O produto será transportado em gelo seco. À chegada, verifique se ainda existe gelo seco na caixa e se os reagentes estão congelados.

8.2 Precauções gerais de manuseamento



Certifique-se de que mantém uma temperatura e umidade nos laboratórios entre 15 °C e 25 °C e entre 20 % e 85 %, respectivamente (reduza o risco de condensação/evaporação).

Não coma, beba ou fume nas áreas do laboratório. Efetue a manutenção do equipamento de acordo com as instruções do fabricante.

Descontamine e elimine todos os reagentes, amostras e materiais associados de acordo com os regulamentos governamentais aplicáveis na sua localização. Para obter resultados exatos e reprodutíveis, é essencial evitar a contaminação com ADN estranho, especialmente produtos de PCR de placas de séries anteriores. Os produtos amplificados de experiências anteriores constituem a fonte mais comum de contaminação por ADN.

Os reagentes fornecidos são visualmente transparentes e incolores, exceto a Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate, que contém azul de bromofenol em todos os poços (cor azul). Se ocorrerem alterações no aspeto do material ou degradação suspeita devido a armazenamento incorreto que possa afetar o desempenho do ensaio, consulte a assistência técnica (► capítulo 10 *Assistência técnica*, página 49/58).

8.3 Avisos e precauções

Este produto não contém materiais perigosos.



Estão disponíveis fichas de dados de segurança de materiais (FDSM) em <https://sysmex-inostics.com/pqs-kit-technical-information/>.

8 Armazenamento e manuseamento

No caso de ocorrer algum incidente grave relacionado com o PlasmaSeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, este deve ser imediatamente comunicado ao fabricante e à autoridade competente do Estado-Membro onde se encontra o utilizador e/ou o doente.

8.3.1 Medidas específicas

Primeiros socorros

- **Conselhos gerais:** Em caso de persistência dos efeitos, consulte um médico. Tire imediatamente o vestuário e o calçado contaminados e lave-os cuidadosamente antes de os voltar a usar.
- **Em caso de inalação:** Retire a pessoa afetada da área circundante. Certifique-se de que recebe ar fresco.
- **Em caso de contacto com a pele:** Lave a área afetada com sabão e muita água.
- **Em caso de contacto com os olhos:** Retire as lentes de contacto. Lave bem os olhos com água corrente, mantendo as pálpebras abertas durante, pelo menos, 10 a 15 minutos. Proteja o olho não afetado.
- **Em caso de ingestão:** Contacte um médico imediatamente. Não induza o vômito. Nunca administre nada por via oral a uma pessoa inconsciente.

8.3.2 Manuseamento e armazenamento

Medidas gerais de proteção e higiene

Não coma, beba ou fume no laboratório e adote uma boa técnica de lavagem das mãos antes de sair. Não inale vapores. Evite o contacto com os olhos e a pele. Tire imediatamente o vestuário sujo ou molhado.

Precauções para um manuseamento seguro

Os riscos de manuseamento do produto devem ser minimizados através da adoção de medidas de proteção e de ações preventivas adequadas. O processo de trabalho deve ser concebido de modo a excluir, na medida do possível, a libertação de substâncias perigosas ou o contacto com a pele.

Recomendações sobre proteção contra incêndios e explosões

Não são necessárias medidas especiais.

Condições para um armazenamento seguro, incluindo incompatibilidades



Mantenha o recipiente bem fechado num local seco e bem ventilado. Os recipientes abertos devem ser cuidadosamente fechados e mantidos na vertical para evitar fugas.

8.3.3 Precauções de manuseamento de reagentes



Para garantir a utilização e eliminação corretas dos reagentes e evitar a contaminação dos mesmos, siga as precauções indicadas abaixo:

- Não utilize reagentes fora de prazo ou armazenados incorretamente.
- Prepare os reagentes de acordo com as instruções fornecidas.
- Os reagentes devem ser utilizados apenas com outros reagentes do mesmo kit.
- Os reagentes de kits ou lotes diferentes nunca devem ser misturados ou trocados entre si.
- Registe a data de abertura e marque os tubos após cada utilização para se certificar de que os reagentes não estão fora de prazo ou não são utilizados para além do número recomendado de ciclos de congelação-descongelação.
- Evite a contaminação dos reagentes mudando frequentemente de luvas. Mude sempre de luvas entre o manuseamento de reagentes e amostras.
- Elimine os reagentes não utilizados e os resíduos de acordo com os regulamentos ambientais nacionais, federais, estatais e locais.

8.3.4 Precauções relativas a segurança e contaminação



Siga as precauções indicadas abaixo para manter um ambiente laboratorial isento de contaminação de ADN e garantir a segurança de todas as pessoas:

- Separe os espaços de trabalho utilizados para pré-PCR e pós-PCR e adote um fluxo de trabalho unidirecional, das áreas «limpas» (pré-amplificação) para as «sujas» (pós-amplificação).
- Garanta a presença de equipamento dedicado (incluindo pipetas), suprimentos, reagentes, recipientes de resíduos que apresentam risco biológico e manuais laboratoriais em cada área de trabalho. Nunca troque estes materiais entre as áreas de trabalho pré e pós-PCR. Recomenda-se a colocação de códigos de cor ou rótulos no equipamento, suprimentos e reagentes para identificar a área a que pertencem.
- Use equipamento de proteção individual adequado ao longo de todo o procedimento.
 - Use sempre uma bata de laboratório (de preferência descartável) e luvas sem pó descartáveis quando estiver a trabalhar nas áreas de pré e pós-PCR.
 - Para evitar contaminação, troque de luvas frequentemente entre o manuseamento de amostras e reagentes e após o contacto do exterior das luvas com a pele.
 - Use óculos de proteção, pelo menos, durante a preparação de plasma, a extração de ADN e a purificação do produto de PCR com QIAquick®.
 - Use proteções de calçado descartáveis ou troque de calçado entre os laboratórios de pré e pós-PCR e use mangas de proteção descartáveis (obrigatório no laboratório de pré-PCR e recomendado no laboratório de pós-PCR, especialmente para a purificação de UID PCR e Index PCR).
- Quando sair das áreas do laboratório de pré e pós-PCR, tire o equipamento de proteção individual e descarte-o.
- Manuseie todas as amostras como material potencialmente infeccioso. Se ocorrer um derrame, recomenda-se a limpeza da área afetada, primeiro com detergente/desinfetante e água e, depois,

com ~0,5 % de solução de hipoclorito de sódio (lixívia) preparada com água desionizada.

Nota: *A lixívia líquida doméstica comercial (p. ex. da marca Clorox), normalmente, contém hipoclorito de sódio a uma concentração de 5,25 %. Lixívia doméstica diluída a 1:10 produz uma solução de hipoclorito de sódio com uma concentração de 0,5 %.*

- Utilize câmaras de PCR dedicadas para os passos de pipetagem.
- Após a utilização, limpe as câmaras de PCR com desinfetante à base de compostos de amónio quaternário (como RHEOSEPT-WD plus ou equivalente), seguido de um produto próprio para remoção de ácidos nucleicos e nucleases (como Roti® Nucleic Acid-Free ou equivalente).
- Após a utilização, limpe os espaços de trabalho de PCR com um produto próprio para remoção de ácidos nucleicos e nucleases (como Roti® Nucleic Acid-Free ou equivalente).
- Descontamine a câmara de segurança, os espaços de trabalho de PCR e o material de laboratório (pipetas, racks de tubos ou outro equipamento) com luz ultravioleta (UV) após a utilização. Para garantir a eficácia da radiação UV, limpe regularmente as lâmpadas UV para remover os resíduos acumulados.
- Utilize apenas pontas de pipeta estéreis, resistentes a aerossóis, com filtros (certificadas para o lote, isentas de RNase, DNase e pirogénios).
- Utilize apenas tubos e reagentes adequados para PCR.
- Mantenha apenas um tubo de amostra ou um tubo de reagente aberto de cada vez.
- Para evitar a contaminação de soluções de reagente de utilização múltipla, prepare alíquotas de trabalho de acordo com as instruções e evite a pipetagem direta.

9 Fluxo de trabalho

O Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit utiliza cfDNA quantificado a partir de plasma para detecção de ctDNA. Antes de iniciar o fluxo de trabalho de preparação de biblioteca (Figura 4), conforme descrito nestas IDU, certifique-se de que o fluxo de trabalho de preparação da amostra está concluído, conforme descrito no guia de preparação de amostras da Sysmex Inostics.

Além disso, é necessário concluir a primeira parte das IDU do Plasma-SeqSensei™ IVD Software, ou seja, o planeamento da série. Se for necessário diluir as amostras devido ao seu elevado teor de ADN, consulte o ► capítulo 9.1 *UID PCR (Multiplex PCR)*, página 22/58, destas IDU.

A Figura 4 descreve o processo, incluindo passos individuais do fluxo de trabalho, bem como a indicação das IDU e dos manuais a seguir ao longo de todo o processo Plasma-SeqSensei™.

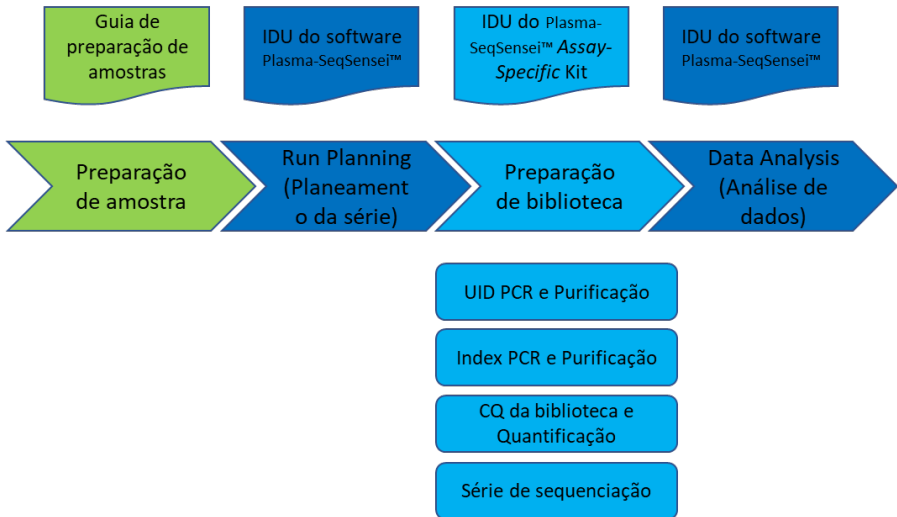


Figura 4: Processo Plasma-SeqSensei™, incluindo passos do fluxo de trabalho e documentos necessários.



Cada Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit foi concebido para analisar até 16 amostras numa placa.

Se for necessário analisar mais de 16 amostras na mesma série de sequenciação, deve adquirir um segundo Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, bem como um Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit.

Para as amostras na segunda placa (amostras 17 a 32), utilize a Index Primer Plate **IND35 (Placa B)** do Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit, em vez da Index Primer Plate IND34 (Placa A) do Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit original.



Aviso: Se a mesma Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate (p. ex. IND34) for utilizada duas vezes na mesma série, os resultados não serão analisáveis.

Se for necessário utilizar duas placas, prepare sempre uma placa de cada vez em cada passo do fluxo de trabalho. Cada placa contém um controlo positivo (PC) e um No Template Control (NTC).

Nota: Utilize sempre o kit de sequenciação mais pequeno possível. O NextSeq™ High Output kit v2.5 apenas pode ser utilizado com 5 ou mais amostras.

9.1 UID PCR (Multiplex PCR)

Na UID PCR multiplex, todas as regiões alvo são co-amplificadas, ao mesmo tempo que são introduzidas sequências de códigos de barras moleculares únicas. Os UIDs permitem uma redução significativa dos antecedentes, o que resulta numa sensibilidade ultraelevada da tecnologia Plasma-SeqSensei™.

Para o Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, podem ser analisadas amostras com uma entrada de ADN entre 4,3 e 86 ng/116 µl. As amostras com um teor de ADN superior têm de ser diluídas. As amostras com menos de 4,3 ng/116 µl não foram validadas e produzirão resultados inválidos.

Nota: A medição Qubit de amostras representa apenas uma estimativa aproximada do ADN de entrada para determinar a carga da amostra. A quantificação final e, possivelmente, diferente das amostras ocorrerá

9 Fluxo de trabalho

durante a sequenciação da biblioteca com o quantificador interno (Quantispike).

Recomendação: *Para obter resultados ótimos, recomendamos uma entrada de ADN de 43 ng/116 µl por amostra, sempre que possível, mesmo para amostras iguais ou inferiores a 86 ng/116 µl.*

Kits e reagentes necessários:

- **Breast Cancer Mpx A** (tampa azul), Sysmex Inostics, #ZR851013
- **Breast Cancer Mpx B** (tampa amarela), Sysmex Inostics, #ZR851014
- **Breast Cancer Positive Control** (tampa vermelha), Sysmex Inostics, #ZR855006
- **No Template Control** (tampa transparente), Sysmex Inostics, #ZR854002
- **Quantispike** (tampa verde), Sysmex Inostics, #ZR856001
- **PCR Master Mix, 2x** (tampa preto), Sysmex Inostics, #ZR850001

Os passos que se seguem são executados na área de preparação de amostras do laboratório de pré-PCR.

Preparação:

- Todos os reagentes, amostras de ADN e controlos congelados:
 - Descongele
 - Agite em vórtex durante 5 s
 - Centrifugue durante 2 s
- Verifique as amostras quanto ao teor de ADN total.
Se o teor de ADN total for demasiado elevado (p. ex. > 86 ng/116 µl), dilua a amostra de acordo com os cálculos abaixo.
- Rotule os tubos LoBind® de 1,5 ml para todas as amostras que precisem de ser diluídas.
- Rotule claramente as tiras de tubos de amostras de acordo com o esquema da placa.

Diluição de ADN:

Se a concentração de ADN exceder a entrada máxima de 86 ng/116 µl ou estiver próxima do limite superior, recomendamos a preparação de um novo

tubo com uma amostra diluída a **43 ng/116 µl** de acordo com os seguintes cálculos:

$$\text{Fator de diluição} = \frac{\text{concentração medida em ng/116 } \mu\text{l}}{43 \text{ ng/116 } \mu\text{l}}$$

$$\text{Volume de eluato necessário } [\mu\text{l}] = \frac{135 \mu\text{l}}{\text{fator de diluição}}$$

Com um volume total de 135 µl (para obter detalhes, consulte o ► capítulo 4.2 Purificação do ADN circulante a partir de plasma do guia de preparação de amostras)

$$\text{Volume de tampão AVE } [\mu\text{l}] = 135 \mu\text{l} - \text{volume de eluato necessário}$$

$$\begin{aligned} \text{Amostra diluída } [135 \mu\text{l}] \\ = \text{volume de eluato necessário} + \text{volume de tampão AVE} \end{aligned}$$

Nota: O tampão AVE para a diluição da amostra faz parte do QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN) (para obter detalhes, consulte o ► capítulo 4.2 Purificação do ADN circulante a partir de plasma do guia de preparação de amostras).

Requantificação de amostras diluídas

*Para as amostras diluídas, requantifique as diluições com o Qubit™ conforme descrito no ► capítulo 4.3 Quantificação de amostras (Qubit™) do guia de preparação de amostras.

Configuração UID PCR:

Nota: O ADN isolado da amostra de plasma é sujeito a uma Multiplex PCR em 5 réplicas/poços. Os controlos positivo e negativo são analisados em réplicas individuais (colunas 1 e 12).

Nota: As amostras são adicionadas à placa UID PCR coluna a coluna, utilizando uma pipeta multicanal, como indicado na Figura 5 (para evitar a contaminação). As tiras de tubos de amostra devem ser dispostas paralelamente à placa UID PCR.

Nota: Evite misturar amostras durante o fluxo de trabalho.

Nota: Se processar mais de 16 amostras, efetue sempre a configuração UID PCR apenas para uma placa de cada vez.

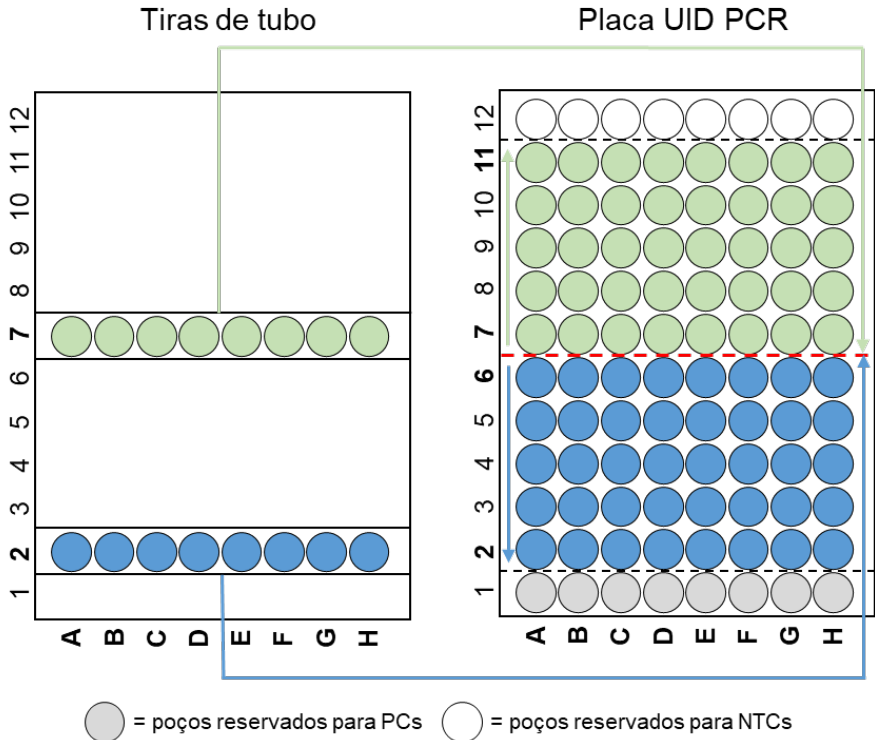


Figura 5: Esquema de pipetagem utilizado ao pipetar das tiras de tubos para uma placa UID PCR

1. Prepare a mistura de trabalho UID PCR por placa, de acordo com a Tabela 8: «Mistura de trabalho UID PCR». Homogeneíze pipetando 10 vezes para cima e para baixo com uma pipeta de canal único. O volume de mistura de trabalho UID PCR necessário para PC e NTC é considerado nos cálculos (consulte a Tabela 8).

Tabela 8: Esquema de pipetagem da mistura de trabalho UID PCR por placa

Número de amostras (1 amostra = 5 réplicas), com excedente de 15 %	2	3	4	5	6	7	8	9
PCR Master Mix v2, 2x [µl]	400	567	734	900	1067	1234	1401	1567
Breast Cancer Mpx A [µl]	39	55	71	87	103	119	135	151
Breast Cancer Mpx B [µl]	39	55	71	87	103	119	135	151
Quantispike [µl]	3,0	4,3	5,6	6,8	8,1	9,4	10,6	11,9
Volume final (soma)	481,0	681,3	881,6	1080,8	1281,1	1481,4	1681,6	1880,9

Número de amostras (1 amostra = 5 réplicas), com excedente de 15 %	10	11	12	13	14	15	16
PCR Master Mix v2, 2x [µl]	1734	1901	2068	2234	2401	2568	2735
Breast Cancer Mpx A [µl]	167	183	199	215	231	247	263
Breast Cancer Mpx B [µl]	167	183	199	215	231	247	263
Quantispike [µl]	13,2	14,4	15,7	17,0	18,2	19,5	20,7
Volume final (soma)	2081,2	2281,4	2481,7	2681,0	2881,2	3081,5	3281,7

Nota: Volume para um PC e um NTC já incluído.

- Adicione 34,8 µl de mistura de trabalho UID PCR aos poços das colunas 1 e 12, de acordo com o esquema da placa.
- Adicione 23,2 µl de controlo positivo (PC) ao poço da coluna 1, de acordo com o esquema da placa, e misture o PC pipetando 10 vezes para cima e para baixo.
Adicione 23,2 µl de controlo negativo (NTC) ao poço da coluna 12, de acordo com o esquema da placa, e misture o NTC pipetando 10 vezes para cima e para baixo.
- Aliquote 187,5 µl de mistura de trabalho UID PCR para cada amostra numa tira de tubo.
- Adicione 125 µl de amostra ao tubo correspondente da tira de tubo e homogeneíze pipetando 10 vezes para cima e para baixo.
- Utilizando a pipeta multicanal de 200 µl, aliquote 58 µl de Amostra + Mistura de trabalho em 5 poços, de acordo com o esquema da placa.

7. Sele a placa com película adesiva PCR e centrifugue a 1000 x g durante 5 s.
8. Coloque a placa no ciclador de PCR. Ligue o ciclador, inicie sessão e inicie o programa de ciclagem «UID BC_v1» (Tabela 9) dentro de 15 min.

Tabela 9: Perfil Tt do UID BC_v1

Ciclador PCR: Veriti

Definição do volume: 50 µl

Tampa de aquecimento Temperatura da tampa 96 °C

#	T [°C]	Tempo [mm:ss]	Ir para #	N.º de ciclos
1	98	02:00	N/A	1
2	98	00:20	N/A	13
3	63	01:30	N/A	13
4	72	00:10	2	13
5	72	02:10	N/A	1
6	4	∞	N/A	1

9. Se forem processadas mais de 16 amostras, repita o procedimento UID PCR utilizando uma segunda placa UID PCR, a partir do passo 1.
10. Armazene a placa UID PCR no laboratório de pós-PCR a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C durante um máximo de 14 dias, entre -15 °C e -30 °C durante um máximo de 2 meses ou siga diretamente para a purificação de UID PCR (► capítulo *Purificação de UID PCR*, página 28/58).

9.2 Purificação de UID PCR

O Agencourt AMPure® XP Kit é utilizado para remover primers excedentes, que poderiam interferir na Index PCR subsequente.

Kits e reagentes necessários:

- **Agencourt AMPure® XP**, Beckman Coulter, #A63881
- **Buffer EB** (Elution Buffer), QIAGEN, #19086
- **Etanol** (EtOH) ≥ 99,8 %, p.a.
- **Água destilada isenta de RNase e DNase**

Os passos seguintes são executados no laboratório de pós-PCR.

Preparação:

- Se a placa tiver sido armazenada a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C, execute o programa PCR «Remove Condensate_v1» (Tabela 10).

Tabela 10: Perfil Tt do Remove Condensate_v1

Ciclador PCR: Veriti

Definição do volume: 50 µl

Tampa de aquecimento Temperatura da tampa 105 °C

#	T [°C]	Tempo [mm:ss]	Ir para #	N.º de ciclos
1	4	02:00	N/A	1

- Antes de retirar o selo, centrifugue a placa a 1000 x g durante 5 s.
- Providencie um recipiente para resíduos líquidos.
- Prepare EtOH a 70 % fresco (Tabela 11). Inverta o tubo 10 vezes.

Recomendação: *Prepare EtOH a 70 % durante a incubação no passo 3 do procedimento de purificação.*

Tabela 11: Preparação de EtOH a 70 %

	Meia placa (8 amostras)	Placa completa (16 amostras)
EtOH ($\geq 99,8$ %, p.a.)	9,1 ml	17,5 ml
Água destilada	3,9 ml	7,5 ml
Total	13 ml	25 ml

- Equilibre as esferas a uma temperatura entre 15 °C e 25 °C (~30 min) e volte a suspendê-las fazendo rolar o frasco horizontalmente na superfície de trabalho. Faça rolar lentamente, faça uma pausa após cada rotação de 180 graus e aguarde até que o líquido escorra. Repetir até as esferas estarem homogeneamente ressuspensas e já não serem visíveis estrias. De vez em quando, inverta o frasco. Não agite em vórtex o frasco de pérolas.
- Adicione solução de esferas AMPure® (Tabela 12) num reservatório utilizando uma pipeta de 1 ml.

Tabela 12: Volume de esferas AMPure® necessárias

Meia placa (8 amostras)	Placa completa (16 amostras)
4,4 ml	8,3 ml

- Se forem utilizadas duas placas UID PCR, execute sempre o fluxo de trabalho de purificação de UID PCR apenas para uma placa de cada vez.

Procedimento de purificação:

1. Utilize uma pipeta multicanal para os passos seguintes. A placa UID PCR e a placa de eluato UID têm de ser dispostas paralelamente uma à outra e a pipetagem é efetuada por coluna (não por linhas, Figura 6).

Nota: *Execute todos os passos pipetando da esquerda para a direita.*

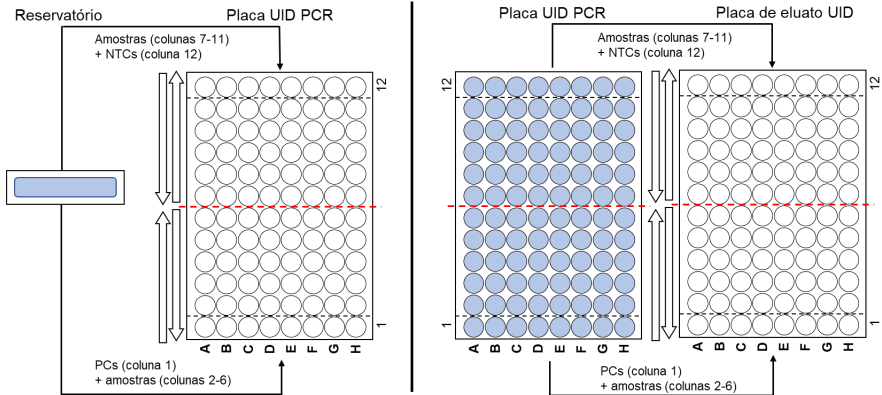


Figura 6: Esquema de pipetagem utilizado ao pipetar do reservatório para a placa UID PCR (esquerda) ou da placa UID PCR (direita) para uma placa de eluato UID.

- Adicione 81 µl de esferas AMPure® a cada poço da placa UID PCR, homogeneíze pipetando lentamente para cima e para baixo 10 vezes.

Nota: *Ressuspenda as esferas AMPure® 3 vezes no reservatório antes de cada aspiração.*

Nota: *Certifique-se de que as esferas nunca secam.*

- Incube a placa UID PCR a uma temperatura entre 15 °C e 25 °C durante 10 min.
- Coloque a placa UID PCR na placa magnética (Alpaqua) e incube durante 5 min.
- Certifique-se de que todas as esferas estão ligadas ao ímã. Retire cuidadosamente o sobrenadante pipetando 134 µl.

Nota: *Não perturbe o anel de esferas magnéticas separadas. Desloque a ponta da pipeta para o fundo do poço sem tocar na parede.*

- Transfira EtOH a 70 % para um reservatório (Tabela 13).

Tabela 13: Volume de EtOH a 70 % necessário

Meia placa (8 amostras)	Placa completa (16 amostras)
13 ml	25 ml

7. Adicione 100 µl de EtOH a 70 % a cada poço sem ressuspensão. Incube durante 30 s.
8. Mantenha a placa no íman. Retire cuidadosamente 110 µl de EtOH e descarte.
9. Adicione 100 µl de EtOH a 70 % a cada poço sem ressuspensão. Incube durante 30 s.
10. Mantenha a placa no íman. Retire cuidadosamente 100 µl de EtOH e descarte.
11. Retire o EtOH residual com uma pipeta multicanal de 20 µl.
12. Retire a placa UID PCR do íman e deixe secar durante 2 min.
13. Adicione o volume de Buffer EB necessário num reservatório (Tabela 14).

Tabela 14: Volume de Buffer EB necessário

Meia placa (8 amostras)	Placa completa (16 amostras)
7 ml	13 ml

14. Adicione 120 µl de Buffer EB a cada poço para eluição do ADN e homogeneíze cuidadosamente, pelo menos, 10 vezes para cima e para baixo.
15. Confirme visualmente que todas as esferas se encontram na solução.
16. Incube a placa UID PCR durante 2 min. entre 15 °C e 25 °C.
17. Coloque a placa UID PCR no íman e incube durante 1 min.
18. Transfira cuidadosamente 110 µl de eluato de cada poço para uma nova placa de eluato UID e descarte a placa UID PCR.

19. Siga diretamente para a Index PCR ou sele a placa de eluato UID. Armazene-a a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C durante um máximo de 7 dias ou entre -15 °C e -30 °C durante um máximo de 2 meses.
20. Se forem processadas mais de 16 amostras, repita o procedimento de purificação de UID PCR utilizando a segunda placa UID PCR, a partir do passo 2.

9.3 Index PCR

A Index PCR é efetuada para amplificar produtos UID PCR purificados, introduzindo simultaneamente etiquetas de indexação (códigos de barras de poços) e adaptadores de sequenciação Illumina.

Cada Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit contém uma Index Primer Plate IND34 (Placa A) para um máximo de 16 amostras. Se forem analisadas mais de 16 amostras numa série de sequenciação, deve ser utilizada uma segunda Index Primer Plate IND35 (Placa B) do Plasma-SeqSensei™ Extension IVD Kit.

Nota: ***Não** utilize a mesma Index Primer Plate duas vezes na mesma série de sequenciação. Utilize sempre duas Index Primer Plates (IND34 + IND35 / Placa A + Placa B).*

Os poços das Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plates são de utilização única.

As posições das Index Primer Plates secas devem corresponder às da placa PCR final, bem como ao esquema das placas na ferramenta de planeamento de séries do Plasma-SeqSensei™ IVD Software (Figura 7). Registe os poços já utilizados. Ao planear a próxima série, utilize as posições/poços de Index restantes e transfira as informações para o software.

9 Fluxo de trabalho

Layout	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	Sample1				Sample2				NTC		
B		Sample3				Sample4						
C		Sample5				Sample6						
D		Sample7				Sample8						
E												
F												
G												
H												

Figura 7: Exemplo de esquema da placa para Index PCR

Kits e reagentes necessários:

- **Index Primer Plate IND34** (Placa A), Sysmex Inostics, #ZR852004
- *opcional*: **Index Primer Plate IND35** (Placa B), Sysmex Inostics, #ZR852005
- **PCR Master Mix v2, 2x** (tampa preto), Sysmex Inostics, #ZR850001
- **Água, sem nuclease** (tampa transparente/branca), Sysmex Inostics, #ZR224006
- **Buffer EB** (Elution Buffer), QIAGEN, #19086

Os passos seguintes são executados no laboratório de pós-PCR.

Preparação:

- Providencie todos os reagentes:
 - Descongele
 - Agite em vórtex durante 5 s
 - Centrifugue durante 2 s
- Rotule todos os plásticos necessários (tubo da mistura de trabalho Index PCR, reservatório descartável, placa DIL, placa Index PCR).
- Coloque o Buffer EB necessário (Tabela 15) num reservatório e tape até utilizar.

Tabela 15: Volume de Buffer EB necessário

Meia placa (8 amostras)	Placa completa (16 amostras)
5,5 ml	10 ml

- Se a placa tiver sido armazenada a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C, execute o programa PCR «Remove Condensate_v1».
- Se a placa de eluato UID tiver sido armazenada, centrifugue-a a 1000 x g durante 5 s.
- Se processar duas placas de eluato UID, execute sempre o fluxo de trabalho Index PCR apenas para uma placa de cada vez.

Preparação da placa de diluição (DIL):

Nota: *Utilize uma pipeta multicanal para todos os passos da preparação da placa DIL.*

Nota: *Se a placa tiver sido armazenada, homogeneíze cada poço da placa de eluato UID pipetando para cima e para baixo 5 vezes.*

1. Coloque a placa de eluato UID no ímã e incube durante 1 min.
2. Adicione 99 µl de Buffer EB por poço à placa DIL, de acordo com o esquema da placa.
3. Transfira 5 µl por poço da placa de eluato UID para a placa DIL e lave a ponta da pipeta, pipetando para cima e para baixo 3 vezes.
4. Homogeneíze bem, pipetando 70 µl para cima e para baixo 10 vezes.
5. Sele a placa de eluato UID. Armazene a placa com volume residual a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C durante um máximo de 7 dias ou entre -15 °C e -30 °C durante um máximo de 2 meses.

Preparação da Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate:

6. Centrifugue a Index Primer Plate a 1000 x g durante 5 s.
7. Prepare a quantidade de poços necessária da Index Primer Plate perfurando a folha de alumínio com 200 µl pontas.

Nota: *Verifique se foi utilizada a Index Primer Plate (IND34 ou IND35 / A ou B) correta na orientação correta.*

Preparação da Index PCR:

8. Prepare a mistura de trabalho Index PCR, de acordo com a Tabela 16. Agite a mistura em vórtex durante 5 s e centrifugue-a durante 2 s.

Tabela 16: Esquema de pipetagem da mistura de trabalho Index PCR por placa

Número de amostras, com 10 % de excedente	2	3	4	5	6	7	8	9
PCR Master Mix v2, 2x [µl]	165	234	303	371	440	509	578	646
Água, sem nuclease [µl]	99	140	181	223	264	305	347	388
Volume final (soma)	264	374	484	594	704	814	925	1034

Número de amostras, com 10 % de excedente	10	11	12	13	14	15	16
PCR Master Mix v2, 2x [µl]	715	784	853	921	990	1059	1128
Água, sem nuclease [µl]	429	470	512	553	594	635	677
Volume final (soma)	1144	1254	1365	1474	1584	1694	1805

Nota: Volume para um PC e um NTC já incluído.

- Adicione 20 µl da mistura de trabalho Index PCR por poço à Index Primer Plate.

Recomendação: *Transfira a mistura de trabalho para tiras de tubos com pipetas multicanal para transferência para a placa. Certifique-se de que utiliza pontas de pipeta novas de cada vez.*

- Adicione 5 µl de modelo da placa DIL à Index Primer Plate e homogeneíze bem pipetando para cima e para baixo 10 vezes até os reagentes estarem ressuspensos. Utilize uma pipeta multicanal. Após a utilização, descarte a placa DIL.

Nota: *Verifique visualmente a orientação correta da placa DIL e da Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate para evitar a mistura de amostras.*

Nota: *Verifique se existem pontos azuis visíveis no fundo dos poços após a ressuspensão. Um ponto azul é uma indicação uma ressuspensão incorreta dos reagentes. Se os pontos azuis ainda forem visíveis, repita a ressuspensão, pipetando para cima e para baixo 10 vezes até não serem visíveis pontos azuis e o líquido ficar azul.*

- Sele a Index Primer Plate com película adesiva PCR e centrifugue a 1000 x g durante 5 s.

12. No caso de utilizar apenas parte da Index Primer Plate, transfira o volume total da Index Primer Plate para uma nova placa PCR.

Nota: Verifique a orientação correta da Plasma-SeqSensei™ Index Primer Plate e da nova placa PCR para evitar a mistura de amostras.

Recomendação: Utilize 2x a pipeta multicanal de 20 µl em vez de 1x a pipeta multicanal de 200 µl.

13. Sele a nova placa PCR com película adesiva PCR e centrifugue a 1000 x g durante 5 s.
14. Sele os poços usados da Index Primer Plate (apenas aplicável se a Index Primer Plate não for descartada) e armazene-a a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C no escuro.
15. Inicie a PCR com o programa «IDX BC_v1» (Tabela 17) no espaço de 15 min.

Tabela 17: Perfil Tt do IDX BC_v1

Ciclador PCR: Veriti

Definição do volume: 25 µl

Tampa de aquecimento Temperatura da tampa: 96 °C

#	T [°C]	Tempo [mm:ss]	Ir para #	N.º de ciclos
1	98	00:30	N/A	1
2	98	00:10	N/A	20
3	65	00:10	N/A	20
4	72	00:10	2	20
5	72	05:00	N/A	1
6	4	∞	N/A	1

16. Se forem processadas mais de 16 amostras, repita o procedimento Index PCR utilizando a segunda placa de eluato UID, a partir do passo 1.
17. Após a PCR, centrifugue as placas Index PCR a 1000 x g durante 5 s. Armazene as placas a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C durante um máximo de 7 dias, entre -15 °C e -30 °C durante um máximo de 2 meses ou siga diretamente para a purificação de Index PCR.

9.4 Purificação de Index PCR

Importante: Este passo combina **todas as amostras e poços de controle de uma placa numa biblioteca**. Se tiverem sido preparadas duas placas (IND34 e IND35/Placa A e Placa B), combine apenas as amostras e os controles de **uma placa**, para obter duas bibliotecas de sequenciação. Além disso, a purificação remove dNTPs, primers, dímeros de primers e sais que poderiam dificultar a sequenciação subsequente.

Kits e reagentes necessários:

- **Agencourt AMPure® XP**, Beckman Coulter, A63881
- **QIAquick® PCR Purification Kit**, QIAGEN, #28104 ou #28106
- **Buffer PB**, QIAGEN, #19066
- **Etanol (EtOH) ≥ 99,8 %**, p.a.
- **Água destilada isenta de RNase e DNase**

Os passos seguintes são executados no laboratório de pós-PCR.

Preparação:

- Se a placa tiver sido armazenada a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C, execute o programa PCR «Remove Condensate_v1».
- Rotule todos os plásticos necessários (tubo de diluição EtOH, tubo(s) de diluição PB, coluna(s) de centrifugação, tubos(s) de eluato QIAquick®, tubo(s) de eluato Index).
- Prepare um recipiente para resíduos líquidos.
- Prepare EtOH a 70 % fresco de acordo com a Tabela 18. Inverta 10 vezes.

Tabela 18: Preparação de EtOH a 70 %

Reagente	Volume
EtOH ≥ 99,8 %, p.a. [ml]	2,8
Água destilada [ml]	1,2
Volume necessário [ml]	4,0

- Antes de retirar o selo, centrifugue a placa Index PCR a 1000 x g durante 5 s.

- Recolha todo o líquido de **todos os poços (amostras e controlos) de uma placa** pipetando 2 x 15 µl num recipiente adequado utilizando uma pipeta de 20 µl.

Nota: *Se utilizar uma pipeta multicanal, comece por juntar todos os poços por coluna numa fila de uma nova tira de placa PCR. Em seguida, transfira o conteúdo de cada poço para um recipiente adequado com uma pipeta de canal único.*

- Se forem utilizadas duas placas Index PCR, execute sempre a purificação de Index PCR apenas para uma placa de cada vez.

Nota: *Utilize uma pipeta de canal único para os passos seguintes deste protocolo.*

1ª purificação com QIAquick®:

1. Para a purificação com o QIAquick® PCR Purification Kit, consulte o protocolo «QIAquick PCR Purification using a Vacuum Manifold» no manual do fabricante. Os desvios no manuseamento são descritos abaixo.
2. Em primeiro lugar, adicione o volume calculado (consulte a Tabela 19) de Buffer PB ao respetivo tubo, agite-o em vórtex durante 3 s e centrifugue a 500 x g durante 2 s.

Tabela 19: Cálculo do volume de Buffer PB necessário

Reagente	Por poço	___ x poços
Volume de amostra [µl]	25	
Buffer PB [µl]	125	
Volume total [µl]	150	

3. Execute os seguintes passos de purificação de PCR de acordo com as instruções descritas no manual da QIAGEN.

Nota: *O volume de carga máximo da coluna é de 800 µl. Para volumes de amostras agregadas superiores a 800 µl, utilize um tubo de extensão ou carregue novamente.*

Nota: *Verifique visualmente em cada passo se o volume correto é aplicado à coluna e se o líquido completo passa através do filtro.*

Nota: *No caso de colunas obstruídas, consulte o guia de resolução de problemas no manual da QIAGEN.*

4. Para a eluição de ADN, coloque uma coluna QIAquick® num tubo LoBind® de 1,5 ml limpo.
5. Adicione 50 µl de Buffer EB ao centro da membrana QIAquick® e incube durante 1 min a uma temperatura entre 15 °C e 25 °C antes do último passo de centrifugação.

Nota: *Não efetue a eluição duas vezes.*

2ª purificação com esferas AMPure®:

6. Transfira 45 µl de eluato para um novo tubo LoBind®. Descarte o anterior.
7. A) Quando utilizar o frasco AMPure® original, equilibre as esferas a uma temperatura entre 15 °C e 25 °C (~30 min) e volte a suspendê-las fazendo rolar o frasco horizontalmente na superfície de trabalho. Faça rolar lentamente, faça uma pausa após uma rotação de 180 graus e aguarde até que o líquido escorra. Repita até que obter uma ressuspensão homogênea das esferas. Não agite em vórtex o frasco de pérolas.

B) Quando utilizar alíquotas de esferas AMPure®, equilibre-as a uma temperatura entre 15 °C e 25 °C e homogeneíze as esferas invertendo, pelo menos, 10 vezes. Certifique-se de que as esferas estão completamente ressuspensas.
8. Adicione 40 µl de esferas AMPure® ao eluato, agite em vórtex durante 10 s e centrifugue durante 3 s.
9. Incube a uma temperatura entre 15 °C e 25 °C durante 5 min.
10. Abra o tubo, coloque-o no DynaMag-2 e incube durante 2 min a uma temperatura entre 15 °C e 25 °C.

Os passos seguintes (11 a 15) são executados enquanto os tubos estão no rack magnético:

11. Com uma pipeta de 200 µl, preparada para 100 µl, retire o sobrenadante e descarte-o.

Nota: Levante o tubo ~1 cm e pressione o fundo completamente contra o íman para garantir que todas as esferas estão fixas.

12. Adicione 500 µl de EtOH a 70 % e incube durante 30 s a uma temperatura entre 15 °C e 25 °C.
13. Retire o sobrenadante e descarte-o.
14. Adicione 500 µl de EtOH a 70 % e incube durante 30 s a uma temperatura entre 15 °C e 25 °C. Durante a incubação, rode o tubo em torno do eixo vertical a 180 graus para assegurar uma mistura eficiente. Rode-o no sentido contrário nunca antes de passados 5 s.
15. Retire todo o sobrenadante e descarte-o. Retire o EtOH residual com uma pipeta de 20 µl.
16. Retire o tubo do DynaMag-2 e deixe-o secar durante 2 min. a uma temperatura entre 15 °C e 25 °C com a tampa aberta.
17. Adicione 15 µl de Buffer EB e ressuspenda completamente a mistura de esferas, agitando em vórtex durante 10 s. Centrifugue durante 3 s e incube durante 1 min. a uma temperatura entre 15 °C e 25 °C.
18. Abra o tubo, coloque-o no DynaMag-2 e incube durante 1 min. a uma temperatura entre 15 °C e 25 °C.
19. Utilize uma pipeta de 20 µl, preparada para 20 µl, para transferir todos os sobrenadantes para o tubo «Index eluate».

Nota: Levante o tubo ~1 cm e pressione o fundo completamente contra o íman para garantir que todas as esferas estão fixas.

20. Descarte o tubo rotulado com eluato QIAquick®.
21. Armazene o tubo «Index eluate» a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C durante um máximo de 7 dias, entre -15 °C e -30 °C durante um máximo de 2 meses ou siga diretamente para a quantificação do bioanalizador.
22. Se forem processadas mais de 16 amostras, repita o procedimento de purificação de Index PCR utilizando a segunda placa Index PCR, a partir do passo 2.

9.5 CQ da biblioteca (Bioanalisador)

O CQ da biblioteca é efetuado utilizando um Bioanalisador para verificar se existem produtos secundários em cada biblioteca e para determinar o tamanho médio. Para cada biblioteca, as quantificações devem ser efetuadas em três réplicas.

O Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit foi desenvolvido utilizando o Bioanalyzer DNA 1000 Kit da Agilent.

Kits e reagentes necessários:

- **DNA 1000 Kit**, Agilent, #5067-1504
- **Buffer EB** (Elution Buffer), QIAGEN, #19086
- **Água destilada isenta de RNase e DNase**

Os passos seguintes são executados no laboratório de pós-PCR.

Preparar o bioanalisador:

Deixe os reagentes equilibrar a uma temperatura entre 15 °C e 25 °C durante 30 min. no escuro.

Para todos os passos, consulte o manual do bioanalisador da Agilent.

Nota: A medição da amostra deve ser efetuada em três réplicas técnicas.

Preparar a diluição do bioanalisador (BA_DIL):

1. Calcule os **volumes necessários para o BA_DIL:**

$$\text{Fator de diluição} = \frac{\text{Entrada de ADN total}}{43}$$

com entrada de ADN total de todas as amostras analisadas em ng/116 µl + 4,3 ng para cada controlo positivo (PC).

(medição com Qubit™, consulte o ► capítulo 4.3 Quantificação de amostras (Qubit™) do guia de preparação de amostras)

Nota: Se o fator de diluição for < 1, não dilua o eluato Index e utilize-o diretamente para medição CQ, quantificação e diluição 2 nM.

Buffer EB [μL] = (3 * fator de diluição) – 3 μL

BA_DIL [μL] = 3 μL de eluato Index + X μL de Buffer EB

- Dilua o eluato Index num tubo novo, de acordo com os cálculos. Agite em vórtex brevemente e centrifugue durante 3 s. Armazene o eluato Index restante a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C durante um máximo de 7 dias ou entre -15 °C e -30 °C durante um máximo de 2 meses.

Nota: Certifique-se de que, pelo menos, 10 μL do volume total de BA_DIL está disponível.

Análise de dados:

- Certifique-se de que o perfil do gráfico Ladder é semelhante ao da Figura 8 abaixo e contém 13 picos, com o mais baixo a 15 bp e o mais alto a 1500 bp (estes são os marcadores que estarão presentes em todas as leituras de amostras) e uma linha de referência plana (consulte a Figura 8).

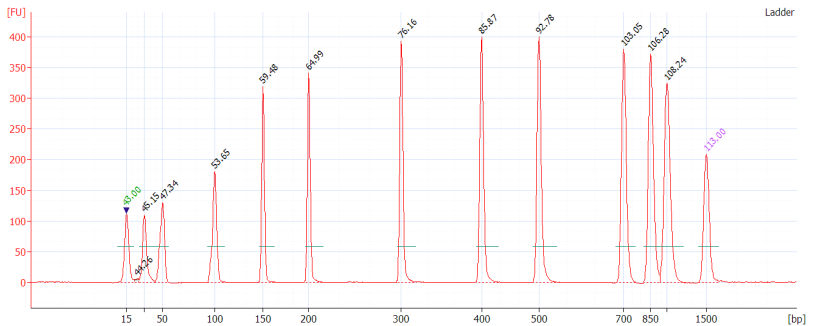


Figura 8: Eletroferograma Ladder (bioanalisador)

- Faça duplo clique no eletroferograma relativo ao poço 1 e selecione o separador Peak Table (Tabela de picos) (consulte a Figura 9).

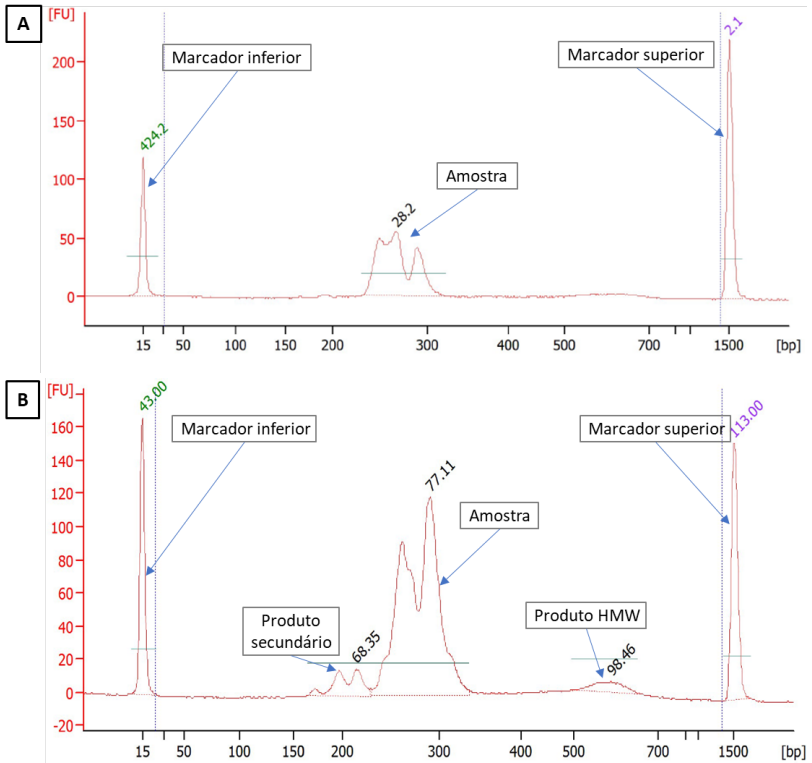



Figura 9: Electroferogramas de amostra num bioanalisador. (A) Um eletroferograma ótimo sem produtos secundários, (B) exemplo de eletroferograma com produtos secundários (p. ex. dímero de primer e ADNg (produto HMW)).

5. Selecione [Manual Integration] (Integração manual), clicando com o botão direito do rato no eletroferograma.
6. Utilize as linhas azuis para delinear **todos os picos visuais**, nomeadamente, o produto da amostra, o dímero de primer (produto secundário) e o produto de elevado peso molecular (HMW), **ao longo da linha zero** (apresentada na Figura 9B).

Nota: Utilize a tecla «Ctrl» para separar as extremidades das linhas azuis da linha vermelha. Se uma linha estiver selecionada, remova-a clicando com o botão direito do rato em [Remove Peak] (Remover pico). Insira linhas azuis adicionais em qualquer posição clicando com o botão direito do rato em [Add Peak] (Adicionar pico).

7. Utilizando a [Peak Description] (Descrição de pico) () , seleccione [Mol Peak Molarity] (Molaridade de pico Mol) para apresentar a respetiva molaridade para cada pico.
8. Guarde o ficheiro.
9. Repita os passos 4 a 8 para os restantes poços de cada réplica.
10. Calcule a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) da soma das molaridades de todos os produtos com base numa medição em triplicado.

Critérios de aceitação e rejeição:

- Verificação da qualidade do ADN: se a soma do produto, do dímero do primer e do HMW for < 2,0 nmol/l, a concentração de ADN é demasiado baixa para a sequenciação.
- Critério de aceitação do rácio sinal-ruído (SNR): ≥ 90 %

$$SNR [\%] = \frac{\text{molaridade de produto específico}}{\text{soma de produto específico, produto secundário e HMW}} * 100$$

- Critério de aceitação da verificação de precisão: CV da soma de molaridade de todos os produtos ≤ 10 %

$$\text{Coeficiente de variação} [\%] = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média}} * 100$$

Nota: Faça uma estimativa do desvio padrão com base numa amostra.

Nota: Se o rácio sinal-ruído falhar devido a um pico não especificado, este valor pode ser excluído dos cálculos.

Nota: Se o CV dos triplicados for > 10 %, o valor mais baixo pode ser removido dos cálculos da amostra, desde que os outros dois valores estejam dentro dos critérios de aceitação.

Nota: Se um ou mais critérios falharem, prepare um novo BA_DIL e repita a série do bioanalisador.

9.6 Sequenciação no Illumina NextSeq™ 500/550

A sequenciação das bibliotecas é efetuada com um Illumina NextSeq™ 500 ou 550, conforme descrito nas Instruções de utilização fornecidas pela Illumina.

Kits e reagentes necessários:

- **NextSeq™ 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 ciclos)**, Illumina, #20024904
Entrada de ADN total ≤ 377 ng (com base na medição Qubit™ ► capítulo 4.3 *Quantificação de amostras (Qubit™)* do Guia de preparação de amostras) OU
- **NextSeq™ 500/550 High Output Kit v2.5 (150 ciclos)**, Illumina, #20024907
Entrada de ADN total ≤ 1304 ng (com base na medição Qubit™ ► capítulo 4.3 *Quantificação de amostras (Qubit™)* do Guia de preparação de amostras)
- **Hidróxido de sódio (NaOH)**, 1 M
- **Solução de hidrocloreto Trizma®** pH 7,0, 1 M
- **Buffer EB** (Elution Buffer), QIAGEN, #19086
- **Água destilada isenta de RNase e DNase**

Os passos seguintes são executados no laboratório de pós-PCR.

Preparar as amostras (concentração inicial da biblioteca 2 nM) para sequenciação:

1. Calcule o volume total necessário de cada biblioteca 2 nM:

$$\text{Total Volume } [\mu\text{L}] = \frac{3 \mu\text{L BA_DIL} * \text{Concentração}_{\text{Biblioteca}} \text{ em nM}}{2 \text{ nM}}$$

2. Calcule o **volume de Buffer EB** necessário:

$$\text{Volume}_{\text{Buffer EB}} [\mu\text{L}] = \text{Total volume} - 3 \mu\text{L BA_DIL}$$

3. Prepare a diluição da biblioteca 2 nM para cada biblioteca, de acordo com os seguintes cálculos:

2 nM Biblioteca Diluição = $3 \mu\text{l } BA_DIL + \text{Volume}_{\text{Buffer } EB}$

Nota: Não pipetar < 3 μl .

Nota: Se o volume de diluição 2 nM for < 10 μl , ajuste o volume total.

4. *Opcional:* Se tiverem sido processadas duas placas com o Plasma-SeqSense™ Extension IVD Kit, agregue as duas diluições de biblioteca 2 nM separadas numa mistura agregada de bibliotecas (Library Pool Mix) de 10 μl , de acordo com as seguintes equações:

$$\text{Entrada de } ADN_{\text{total}} = \sum \text{Entrada de } ADN_{\text{placaA}} + \sum \text{Entrada de } ADN_{\text{placaB}}$$

$$\text{Volume}_{\text{placaA}} = \frac{10 \mu\text{l}}{\text{Entrada de } ADN_{\text{total}}} * \text{Entrada de } ADN_{\text{placaA}}$$

$$\text{Volume}_{\text{placaB}} = \frac{10 \mu\text{l}}{\text{Entrada de } ADN_{\text{total}}} * \text{Entrada de } ADN_{\text{placaB}}$$

Nota: Pipete apenas volumes dentro dos intervalos aceites das pipetas disponíveis. Se for necessário pipetar volumes inferiores, aumente o volume total da mistura agregada de bibliotecas final.

5. Efetue a desnaturação da biblioteca (agregada) com NaOH 0,2 M fresco (consulte a Tabela 20). Agite em vórtex durante 5 s e centrifugue durante 3 s.

Tabela 20: Volumes necessários para desnaturação e diluição de bibliotecas.

Biblioteca	NaOH 0,2 M	Tris-HCl 0,2 M	HT1 buffer
10 μl	10 μl	10 μl	970 μl

6. Incube a biblioteca (agregada) durante 5 min. a uma temperatura entre 15 °C e 25 °C.

7. Adicione 10 µl de Tris-HCl 0,2 M, pH 7,0 à biblioteca (agregada) desnaturada (consulte a Tabela 20). Agite em vórtex durante 5 s e centrifugue durante 3 s.
8. Dilua a biblioteca (agregada) desnaturada a 20 pM adicionando 970 µl de HT1 Buffer previamente arrefecido (fornecido com o kit de sequenciação Illumina, consulte a Tabela 20). Agite em vórtex durante 5 s e centrifugue durante 3 s.
9. Dilua a biblioteca (agregada) desnaturada a 20 pM com HT1 Buffer num tubo novo até obter uma concentração de carga final ótima, dependendo do kit de sequenciação escolhido e do dispositivo de sequenciação (consulte a Tabela 21). Agite em vórtex durante 5 s e centrifugue durante 3 s.

Importante: *Cada dispositivo de sequenciação pode ter uma concentração de carga final ótima diferente, que tem de ser determinada pelo utilizador. Comece por utilizar a nossa concentração de carga final recomendada, conforme indicado na Tabela 21. Aumente a concentração de carga se a densidade de clusters for baixa, diminua a concentração de carga se as séries tiverem excesso de clusters.*

Tabela 21: Volumes necessários para a concentração de carga final recomendada para sequenciação

	Mid Output Kit	High Output Kit
Concentração final recomendada	1,0 pM	1,1 pM
Entrada da biblioteca	65 µl	71 µl
HT1 buffer	1235 µl	1229 µl

10. Inicie a série de sequenciação utilizando o NextSeq Control se estiver implementada um pipeline de desmultiplexagem separado no local de sequenciação (p. ex. bcl2fastq da Illumina). Caso contrário, utilize o Local Run Manager do dispositivo NextSeq para iniciar a série de sequenciação.
11. Execute o início da série de sequenciação de acordo com o protocolo da Illumina (Guia do sistema NextSeq™ 550, documento

n.º 15069765v06) utilizando as seguintes definições de parâmetros de série da Tabela 22:

Tabela 22: Parâmetros de sequenciação

Tipo de leitura	Leitura única		
	Leitura 1	Index 1	Index 2*
Comprimento de leitura	148	10	10

*O comprimento de leitura do Index 2 só será incluído com a utilização de duas placas na mesma série de sequenciação.

- Quando utilizar o Local Run Manager, inclua as seguintes definições de adaptador da Tabela 23 (podem ser copiadas da ficha de amostras) nas «Advanced Module Settings» (Definições de módulo avançadas):

Tabela 23: Definições de adaptador para o Local Run Manager

Nome	Sequência
Adaptador	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA

Importante: A densidade de clusters não pode ultrapassar o valor de 220 K/mm². Se a densidade de clusters for > 220 K/mm², repita a série de sequenciação com uma concentração de carga reduzida. O intervalo recomendado para a densidade de clusters é de 150–220 K/mm².

Passos seguintes

Consulte as IDU do Plasma-SeqSensei™ IVD Software (módulo Data Analysis (Análise de dados)) para continuar com a análise de dados de sequenciação.

10 Assistência técnica

Se surgirem problemas durante o fluxo de trabalho do Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit, contacte a assistência técnica local da Sysmex para obter assistência.



Nota: O *Guia de preparação de amostras, as Instruções de utilização do Plasma-SeqSensei™ IVD assay e do Plasma-SeqSensei™ IVD Software* estão disponíveis em diferentes idiomas online em <https://sysmex-inostics.com/pqs-kit-technical-information/>.

11 Características de desempenho

11.1 Sensibilidade analítica

A avaliação do limite de detecção (LoD) foi efetuada de acordo com as especificações constantes da diretriz *CLSI EP17-A2*.

A análise incluiu inserções, deleções, substituições e deleções-inserções.

O limiar derivado do LoD é de 6 moléculas mutantes (MM).

Analito (MM)	Taxa de acertos em % (n=108)	LoD95
20	100	3,81 MM (CI95 3,25 MM – 4,65 MM)
10	100	
5	99,0	
2.5	87,0	
1.25	62,5	
0.625	41,7	

11.2 Especificidade analítica

A conceção foi verificada in silico utilizando a análise BLAST contra uma possível reatividade cruzada e foi confirmada como altamente específica. As sequências fora do alvo incluíam o genoma humano, bem como sequências de ADN publicamente disponíveis de microrganismos/vírus típicos transmitidos pelo sangue, tais como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, citomegalovírus, vírus Epstein-Barr-Vírus, VIH e vírus da hepatite C.

11.3 Precisão/repetibilidade

A avaliação da precisão foi efetuada de acordo com as especificações constantes da diretriz *CLSI EP05-A3*.

11 Características de desempenho

A precisão qualitativa é > 99 %.

A repetibilidade quantitativa é < 10 % (CV máx.) e a precisão intermédia é < 15 % a ≥ 20 MM.

MM alvo	Repetibilidade (CV máx. em %)	Precisão intermédia
500	2,54	13,84
100	5,99	13,10
50	7,76	14,15
20	5,65	14,02

11.4 Intervalo de medição/linearidade

A determinação do intervalo linear na entrada de ADN foi efetuada de acordo com as especificações constantes da diretriz *CLSI EP06-A*.

O fluxo de trabalho do Plasma-SeqSensei™ revela linearidade no intervalo de entrada de ADN do ensaio (4,3 a 86 ng por amostra).

11.5 Substâncias interferentes

A determinação de substâncias interferentes foi efetuada de acordo com as especificações constantes da diretriz *CLSI EP07-A2*.

O fluxo de trabalho do Plasma-SeqSensei™ foi confirmado como robusto face às substâncias interferentes comuns. A presença de hemoglobina (≤ 2 g/l), bilirrubina (≤ 200 mg/l), triglicéridos (≤ 15 g/l), melanina ($\leq 0,2$ µg/l) e etanol ($\leq 86,8$ mmol/l) não tem impacto na validade e nos resultados de teste.

11.6 Características e desempenho clínico

O desempenho clínico do Plasma-SeqSensei™ Breast Cancer IVD kit foi determinado testando 76 amostras positivas e 78 negativas para todos os

genes alvo. A sensibilidade é de 97 % (IC de 95 %: 90,9 % a 99,3 %) e a especificidade é de 95 % (IC de 95 %: 87,5 % a 98 %).

		Método de referência: BC_P2 teste		
		positivo	negativo	total
Plasma- SeqSensei™ Breast Cancer IVD Kit	positivo	74	4	78
	negativo	2	74	76
	total	76	78	154

A percentagem global de concordância é de 96,1 %.

11.7 Limitações

Os dados de desempenho de amostras no limite do intervalo de entrada de ADN permitido podem desviar-se dos valores indicados, o que pode resultar numa menor precisão e repetibilidade de amostras pouco concentradas, bem como em valores de LoD inferiores para amostras muito concentradas.

12 Glossário e terminologia

Termo	Definição
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	ADN genómico
ARN	Ácido ribonucleico
BA_DILil	Diluição do bioanalisador
BLAST	Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local
bp	Par de base
cfDNA	ADN sem células
CI	Intervalo de confiança
CLSI	Instituto de normas clínicas e laboratoriais
COSMIC	Catálogo de mutações somáticas no cancro
ctDNA	ADN tumoral circulante
CV	Coefficiente de variação
dbSNP	Base de dados de polimorfismo de nucleótido único
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
EB	Tampão de eluição
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Recetor do fator de crescimento epidérmico
EtOH	Etanol
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMW	Elevado peso molecular
IDU	Instruções de utilização
IDX	Index

Termo	Definição
LoD	Limite de detecção
MAF	Fração de alelos mutantes
MM	Moléculas mutantes
Mpx	Mistura de primers multiplex
NaOH	Hidróxido de sódio
NGS	Sequenciação de nova geração
NTC	No template control
PC	Controlo positivo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
QC	Controlo de qualidade
SNV	Variante de nucleótido único
UID	Identificador único

13 Referências

- 1) Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492. Epub 2018 Sep 12. Erratum in: *CA Cancer J Clin.* 2020 Jul;70(4):313. PMID: 30207593.
- 2) Moo TA, Sanford R, Dang C, Morrow M. Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clin.* 2018 Jul;13(3):339-354. doi: 10.1016/j.cpet.2018.02.006. PMID: 30100074; PMCID: PMC6092031.
- 3) Stewart CM, Kothari PD, Mouliere F, Mair R, Somnay S, Benayed R, Zehir A, Weigelt B, Dawson SJ, Arcila ME, Berger MF, Tsui DW. The value of cell-free DNA for molecular pathology. *J Pathol.* 2018 Apr;244(5):616-627. doi: 10.1002/path.5048. Epub 2018 Mar 12. PMID: 29380875; PMCID: PMC6656375.
- 4) Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jun 7;108(23):9530-5. doi: 10.1073/pnas.1105422108. Epub 2011 May 17. PMID: 21586637; PMCID: PMC3111315.
- 5) Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif.* 2019 Mar 18;17:100087. doi: 10.1016/j.bdq.2019.100087. PMID: 30923679; PMCID: PMC6425120.
- 6) Fiste O, Lontos M, Koutsoukos K, Terpos E, Dimopoulos MA, Zagouri F. Circulating tumor DNA-based predictive biomarkers in breast cancer clinical trials: a narrative review. *Ann Transl Med.* 2020 Dec;8(23):1603. doi: 10.21037/atm-20-1175. PMID: 33437802; PMCID: PMC7791253.
- 7) [Online] <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.
- 8) Keup C, Benyaa K, Hauch S, Sprenger-Haussels M, Tewes M, Mach P, Bittner AK, Kimmig R, Hahn P, Kasimir-Bauer S. Targeted deep sequencing revealed variants in cell-free DNA of hormone receptor-positive metastatic breast cancer patients. *Cell Mol Life Sci.* 2020 Feb;77(3):497-509. doi: 10.1007/s00018-019-03189-z. Epub 2019 Jun 28. PMID: 31254045; PMCID: PMC7010653.
- 9) Fribbens C, Garcia Murillas I, Beaney M, Hrebien S, O'Leary B, Kilburn L, Howarth K, Epstein M, Green E, Rosenfeld N, Ring A, Johnston S, Turner N. Tracking evolution of aromatase inhibitor resistance with circulating tumour DNA analysis in metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2018 Jan 1;29(1):145-153. doi: 10.1093/annonc/mdx483. PMID: 29045530; PMCID: PMC6264798.

14 Direitos reservados e marcas comerciais

É proibida a reprodução não autorizada do conteúdo deste manual, total ou parcialmente, sem autorização prévia por escrito da Sysmex Corporation, Japão.

Plasma-SeqSensei™ é uma marca comercial da Sysmex Corporation, Japão.

Todas as outras marcas comerciais, nomes e produtos são, mesmo quando não expressamente assinalados como tal, marcas comerciais ou marcas registadas dos respetivos titulares.

15 Histórico de revisões

Versão do documento	Data	Descrição da alteração	Secção
R3	Dezembro de 2023	Atualização de notas sobre SNR e CV durante a utilização do bioanalisador	9.5
R2	Novembro de 2023	Atualização dos limites de deteção de mutações da linha germinal	6
		Informações sobre a comunicação de cobertura incompleta de tripletos de nucleótidos codificadores de aminoácidos	6
		Redução do limite superior de temperatura laboratorial e especificação da temperatura ambiente (15 °C a 25 °C)	8.2 9
		Atualização do link de transferência de IDU, MSDS	8.3 e 10
		Número mínimo de amostras por High Output kit incluído	9
		Atualização da recomendação de diluição e quantificação de amostras com Qubit™	9.1
		Informações sobre o manuseamento de esferas magnéticas AMPure	9.2 9.2 passo 15 9.4 passo 7
		Adição de nota sobre desvio padrão	9.5 passo 10
		Inclusão de informações alargadas sobre a desnaturação de amostras, diluição e início da sequenciação	9.6 passos 5 - 12
		Atualização de informações sobre a caracterização do desempenho	11.1 11.6 11.7
		Adição da tabela de histórico de revisões	15
		Correções ligeiras, ortografia, formatação e alterações de ordem	
R1	Junho de 2022	N/A	





Dezembro de 2023
ZR150547.R3

Sysmex Inostics GmbH
Falkenried 88
20251 Hamburgo, Alemanha
www.sysmex-inostics.com



© 2023 Sysmex Inostics
Todos os direitos reservados.