

VeriSeq™ NIPT Solution v2

Rivoluzionando il test NIPT, VeriSeq NIPT Solution v2 è un saggio di sequenziamento dell'intero genoma end-to-end e accessibile che genera risultati accurati per un massimo di 96 campioni circa 26 ore.

Punti principali

- La panoramica più completa del genoma fetale**
 La soluzione NIPT per IVD in laboratorio offre il più ampio menu di test convalidato in uno studio di accuratezza clinica in più di 2.000 campioni
- Test dalle prestazioni superiori¹**
 Accuratezza, risultati più veloci e basse percentuali di fallimento senza rivali
- Soluzione IVD semplice e scalabile**
 Una soluzione semplice da implementare che è in grado di analizzare 24, 48 o 96 campioni per corsa

Introduzione

Il test prenatale non invasivo (Noninvasive prenatal testing, NIPT) eseguito con la tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (Next-Generation Sequencing, NGS) fornisce risultati di screening affidabili per le aneuploidie cromosomiche fetali a partire da appena 10 settimane di gestazione con una singola provetta di sangue materno.^{2,3} VeriSeq NIPT Solution v2 sfrutta l'efficace tecnologia NGS Illumina per utilizzare il sequenziamento dell'intero genoma (Whole-Genome Sequencing, WGS) con il test NIPT ampliando le opzioni di analisi e includere le aneuploidie comuni (cromosomi 21, 18 e 13), tutte le aneuploidie autosomiche rare (Rare Autosomal Aneuploidy, RAA), le aneuploidie dei cromosomi sessuali (Sex Chromosome Aneuploidy, SCA) e le delezioni e duplicazioni parziali, chiamate anche varianti del numero di copie (Copy Number Variation, CNV), con dimensioni di ≥ 7 . Unendo l'ampio menu di analisi, risultati accurati e basse percentuali di fallimento, VeriSeq NIPT Solution offre lo screening più completo del genoma fetale, per consentire decisioni informate e tempestive sulla gestione della gravidanza.^{4,5}

Le innovazioni apportate ai flussi di lavoro, agli strumenti e ai software rendono VeriSeq NIPT Solution v2 la soluzione NIPT basata su NGS accessibile a qualsiasi laboratorio che esegue screening clinico sulle aneuploidie prenatali. Fornendo reagenti, strumenti, software, installazione e formazione, VeriSeq NIPT è una soluzione affidabile e automatizzata per i test NIPT eseguiti nel proprio laboratorio (Figura 1 e Tabella 1).

Tabella 1: Introduzione a VeriSeq NIPT Solution v2

Parametro	Descrizione
Metodo	Sequenziamento dell'intero genoma
Preparazione delle librerie	Senza PCR
Chimica	Sequenziamento paired-end
N. di campioni	24, 48 o 96 per batch
Tempo per ottenere il report	Circa 26 ore
N. di tecnici	1
Campione	7-10 ml di una singola provetta contenente sangue materno
Analisi offerta	Stato delle aneuploidie per tutti gli autosomi e cromosomi sessuali Determinate variazioni del numero di copie sottocromosomiche ≥ 7 Mb



Figura 1: Flusso NIPT completo per IVD: VeriSeq NIPT Solution v2 fornisce tutto il necessario per il test NIPT utilizzando la tecnologia NGS, inclusi i reagenti per l'estrazione del DNA, la preparazione delle librerie e il sequenziamento; strumentazione per la preparazione delle librerie e il sequenziamento automatizzati mediante un software per la gestione del flusso di lavoro; un server on-site sicuro per l'archiviazione e l'analisi dei dati; e software per l'analisi dei dati in grado di generare risultati clinici.

Tabella 2: Prestazioni cliniche di VeriSeq NIPT Solution v2^a

	Trisomia 21	Trisomia 18	Trisomia 13	RAA ^d	CNV ≥ 7 Mb	Qualsiasi anomali ^e
Sensibilità^b	> 99,9% (130/130)	> 99,9% (41/41)	> 99,9% (26/26)	96,4% (27/28)	74,1% (20/27)	95,5% (318/333)
IC 95% bilaterale^c	97,1%, 100%	91,4%, 100%	87,1%, 100%	82,3%, 99,4%	55,3%, 86,8%	92,7%, 97,3%
Specificità	99,90% (1.982/1.984)	99,90% (1.995/1.997)	99,90 (2.000/2.002)	99,80% (2.001/2.005)	99,80% (2.000/2.004)	99,34% (1.954/1.967)
IC 95% bilaterale^c	99,63%, 99,97%	99,64%, 99,97%	99,64%, 99,97%	99,49%, 99,92%	99,49%, 99,92%	98,87%, 99,61%

a. Nella tabella non sono mostrate sette gravidanze gemellari riportate correttamente come T21

b. Le prestazioni dello screening di base sono riportate per T21, T18 e T13 ed esclude 16 campioni con mosaicismo noto e ulteriori 49 campioni affetti da anomalie solo per lo screening dell'intero genoma; le prestazioni dello screening dell'intero genoma sono riportate per RAA e CNV

c. IC basato sul metodo del punteggio di Wilson

d. RAA esclude i cromosomi 21, 18 e 13

e. Qualsiasi anomalia include i campioni ottenuti dallo screening di base per SCA e lo screening dell'intero genoma

Tabella 3: Concordanza dei risultati ottenuti da VeriSeq NIPT Solution v2 per la classificazione sessuale fetale rispetto all'esito dei riferimenti clinici standard

Risultati di VeriSeq NIPT Solution v2	Esito dell'esame fisico del neonato ^a		Risultati citogenetici					
	Femmina	Maschio	XX	XY	XO	XXX	XXY	XXY
Percentuale concordante	100%	100%	100%	100%	90,5%	100%	100%	91,7%

a. Nessun risultato citogenetico

Panoramica completa del genoma fetale

Molte soluzioni NIPT eseguite in laboratorio si concentrano sui cromosomi 21, 18 e 13, ma questi cromosomi rappresentano solo una porzione del genoma. Questi test non individueranno le CNV con ≥ 7 Mb che si verificano con una percentuale di incidenza dello 0,10% e che sono state associate ad anomalie fetali e ritardi dello sviluppo. Questi test non individueranno nemmeno le gravidanze positive allo screening per RAA, che potrebbero essere associate a esiti avversi inclusi tra gli altri aborto, restrizione della crescita intrauterina (Intrauterine Growth Restriction, IUGR), disomia uniparentale (Uniparental Disomy, UPD), travaglio pretermine e anomalie fetali.⁶ Con RAA che si verificano a percentuali combinate dello 0,34%,⁶ rispetto allo 0,30% per la trisomia 21,⁷ il solo screening NIPT di base potrebbe non individuare anomalie significative.

Test dalle prestazioni superiori

In base all'accuratezza dei risultati, alla tempestività nella risposta e alle percentuali di fallimento, VeriSeq NIPT Solution v2 dimostra prestazioni eccellenti.

Accuratezza senza rivali

VeriSeq NIPT Solution v2 è stata sottoposta a test approfonditi per determinare l'accuratezza e l'affidabilità. Sono stati inclusi i campioni appartenenti a gravidanze affette se gli esiti clinici non erano disponibili e soddisfacevano i criteri di inclusione del campione. La coorte comprendeva età gestazionale intorno alla undicesima settimana, campioni con basse frazioni fetali e gravidanze gemellari. Lo studio ha sottoposto a screening più di 2.300 campioni materni con esiti noti per la trisomia 21, la trisomia 18, la trisomia 13, tutte le trisomie autosomiche rare, le CNV con ≥ 7 Mb e

le SCA utilizzando VeriSeq NIPT Solution v2 e confrontando i risultati con i dati clinici di riferimento. I risultati hanno dimostrato una sensibilità e una specificità estremamente elevate per le aneuploidie oggetto dello screening e le CNV con ≥ 7 Mb (Tabella 2 e Tabella 3) e un basso tasso di fallimento complessivo del campione di 1,2%.⁸

Risultati più veloci

VeriSeq NIPT Solution v2 offre un flusso di lavoro basato su tre fasi per i test NIPT che genera risultati in poco più di un giorno (Tabella 4). Attenendosi al flusso di lavoro semplice e automatizzato, un tecnico può analizzare 24-96 campioni in meno di otto ore con interventi manuali minimi. Il sequenziamento mirato e i metodi basati su array tendono ad avere protocolli di laboratorio più lunghi e richiedono maggiori interventi manuali.

Tabella 4: VeriSeq NIPT può essere completato in circa un giorno

Fase	Interventi manuali	Durata totale
Preparazione dei campioni (isolamento del plasma, estrazione del DNA, preparazione delle librerie)	Circa 2 ore	Circa 8 ore
Sequenziamento (caricamento delle librerie e impostazione della corsa)	Circa 15 min	Circa 14 ore
Analisi dei dati e generazione di report^a	N/A	Circa 4 ore
Durata totale	Circa 2,25 ore	Circa 26 ore

a. La durata effettiva dipende dai processi del laboratorio in questione e potrebbe variare da sito a sito. N/A: non applicabile.

Ridotti tassi di fallimento del test

I fallimenti del test, ossia quando non è possibile identificare una disomia o un'aneuploidia, rappresentano un fattore importante per valutare affidabilità e utilità clinica del test NIPT. I tassi di fallimento del test NIPT variano in modo significativo in base al test utilizzato. I test che utilizzano un approccio mirato dimostrano tassi più elevati di fallimento del test rispetto ai test che sequenziano l'intero genoma sia negli studi di convalida che negli studi basati sull'esperienza clinica.⁹ VeriSeq NIPT Solution v2 utilizza la tecnologia WGS per fornire un'ampia quantità di dati sull'intero genoma diploide, senza incidere sull'accuratezza o senza aumentare i tassi di falsi positivi o di fallimento. Nello studio sulle prestazioni cliniche, circa il 99% dei campioni hanno fornito un risultato durante la prima corsa.⁸ Nella pratica di laboratorio, se necessario, potrebbe essere disponibile materiale sufficiente dal primo prelievo di sangue per ripetere il flusso di lavoro VeriSeq NIPT.

Soluzione IVD semplice e scalabile

VeriSeq NIPT Solution v2 è una soluzione integrata e fornisce tutto il necessario per l'esecuzione del saggio. Il flusso di lavoro automatizzato può facilmente essere scalato per analizzare 24, 48 o 96 campioni per corsa e consentire la gestione efficace e flessibile dei volumi di campione.

Preparazione delle librerie automatizzata

Il processo di VeriSeq NIPT è completamente automatizzato e fornisce un semplice flusso di lavoro che riduce al minimo il tempo e potenziali errori del tecnico. Il protocollo parte da 7-10 ml di sangue intero periferico materno raccolto nella provetta Streck Blood Collect Tube (BCT) fornita. I kit VeriSeq NIPT sono ottimizzati per la preparazione delle librerie e contengono i reagenti e i materiali di consumo necessari per la preparazione delle librerie di sequenziamento a partire da cfDNA. L'isolamento del plasma, l'estrazione di cfDNA e la preparazione delle librerie senza PCR, inclusi la creazione di piastre di quantificazione, quantificazione delle librerie e il raggruppamento in pool delle librerie sono automatizzati su VeriSeq NIPT Microlab STAR, un sistema Hamilton Microlab STAR personalizzato e configurato specificatamente per l'utilizzo nel flusso di lavoro VeriSeq NIPT. VeriSeq NIPT Workflow Manager è di facile utilizzo e controlla tutti gli aspetti della preparazione dei campioni, incluso il monitoraggio dei campioni.

Sequenziamento

VeriSeq NIPT Solution v2 si basa sulla comprovata chimica di sequenziamento (Sequencing By Synthesis, SBS) Illumina, la chimica che genera più del 90% dei dati di sequenziamento al mondo.¹⁰

Maggiore efficienza mediante il sequenziamento paired-end

Un campione di sangue materno contiene diverse lunghezze di cfDNA; lunghezze più lunghe tendono ad essere materne mentre

lunghezze più corte tendono ad avere una maggiore correlazione fetale (Figura 2).¹¹ Grazie al sequenziamento paired-end, che genera il doppio della quantità di dati con la stessa quantità di tempo e sforzi del sequenziamento unidirezionale, VeriSeq NIPT Solution v2 può identificare in modo rapido ed efficace le lunghezze di tutti i frammenti di cfDNA in un singolo campione. L'algoritmo contenuto in VeriSeq NIPT Assay Software utilizza questi dati per concentrare l'analisi sui frammenti più corti e aumentare il segnale ottenuto dal cfDNA fetale.

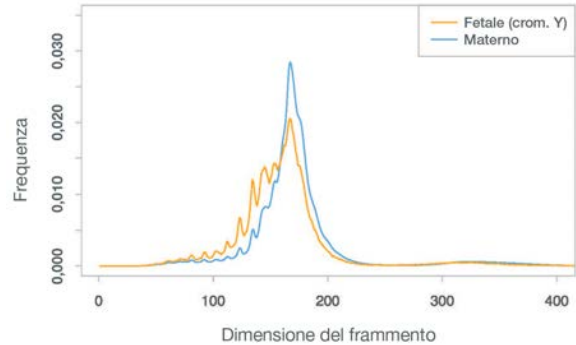


Figura 2: Confronto della dimensione di frammenti di cfDNA fetale: il sequenziamento paired-end è in grado di distinguere i frammenti di cfDNA in base alla dimensione. I frammenti più lunghi tendono ad essere di origine materna mentre i frammenti più brevi di origine fetale.

Efficacia diagnostica in un sequenziatore da banco

In VeriSeq NIPT Solution v2 il sequenziamento viene eseguito sul sistema NextSeq™ 550Dx Illumina, una piattaforma regolamentata dall'FDA e dotata di marcatura CE-IVD, che offre l'efficacia della tecnologia NGS ad elevata processività assieme all'accessibilità di un sistema da banco (Tabella 5). Il sistema NextSeq 550Dx dispone di un flusso di lavoro "carica e vai" che richiede solo 30 minuti di interventi manuali. L'interfaccia utente intuitiva consente agli utenti di eseguire le applicazioni di sequenziamento con formazione o tempo di impostazione dello strumento minimi.

Tabella 5: Requisiti delle prestazioni dello strumento NGS

Parametro	Specifica
Lunghezza lettura	2 x 36 bp
Tipo di file di sequenziamento	File .BCL
Output di sequenziamento	400 milioni di letture
Durata della corsa	Circa 14 ore
Multiplex	24 o 48 campioni per corsa

Analisi in laboratorio

L'analisi dei dati viene eseguita su un server dedicato VeriSeq Onsite Server v2 mediante VeriSeq NIPT Assay Software v2 dotato di marcatura IVD. Il server elabora automaticamente i dati del sequenziamento. Su un singolo server, possono essere messi in coda diversi batch di campioni. Non è necessario far analizzare i dati al di fuori del laboratorio, in questo modo si risparmia tempo e si protegge l'identità del campione.

VeriSeq NIPT Assay Software

VeriSeq NIPT Assay Software filtra e allinea le letture su un genoma di riferimento. Un algoritmo avanzato conta le letture per cromosoma. I punteggi riflettono la copertura normalizzata del cromosoma analizzato, o regioni subcromosomiche, e contribuiscono al rilevamento e alla differenziazione delle aneuploidie e delle CNV. Inoltre, il software genera e riporta una stima della frazione fetale per ogni campione. I dati della frazione fetale vengono combinati con la copertura e altri input statistici generati durante il sequenziamento per valutare lo stato di aneuploidia.

Per assicurare bassi tassi di fallimento del test, VeriSeq NIPT Assay Software include la metrica del punteggio qualitativo del campione mediante il test di sicurezza fetale delle aneuploidie individuale (Individualized Fetal Aneuploidy Confidence Test, iFACT). iFACT indica se lo strumento ha generato una copertura di sequenziamento e una qualità dei dati sufficienti, data la frazione fetale stimata per ciascun campione, per consentire una identificazione di aneuploidia o CNV, anche in campioni con bassa frazione fetale.¹²⁻¹⁴ Questo cutoff dinamico consente a VeriSeq NIPT Assay Software di riportare i campioni con bassa frazione fetale e di conseguenza bassi fallimenti del test.¹⁴⁻¹⁶

Creazione di report

Al termine dell'analisi dei dati, VeriSeq NIPT Assay Software genera identificazioni "Aneuploidy Detected" (Aneuploidia rilevata) e "No Aneuploidy Detected" (Nessuna aneuploidia rilevata) per i cromosomi analizzati in ogni campione. Se viene rilevata una CNV, nel report di output vengono visualizzate le esatte coordinate nel genoma per quel campione. Le informazioni vengono inviate a un file .CSV che può essere integrato con un sistema LIMS esistente. I dati possono essere utilizzati per creare un report clinico personalizzato in base alle esigenze del laboratorio.

Implementazione completamente supportata

Per una implementazione ottimale nel laboratorio, VeriSeq NIPT Solution v2 include l'installazione completa del sistema da parte di un tecnico specializzato dell'assistenza Illumina e la formazione pratica. Gli affidabili scienziati Illumina eseguono tutta la procedura con il personale del laboratorio dall'estrazione dei campioni, alla preparazione delle librerie e al sequenziamento fino all'analisi (Tabella 6). Quando i laboratori sono operativi, il personale dell'Assistenza Tecnica Illumina continua a fornire supporto.

Tabella 6: Formazione per VeriSeq NIPT Solution v2

Argomento	Dettagli
Introduzione a VeriSeq NIPT Solution v2	Seminario relativo a una panoramica sul flusso di lavoro e sull'analisi <ul style="list-style-type: none"> • Guida alla strumentazione aggiuntiva • Guida ai materiali di consumo • Protocollo per il prelievo del sangue • Protocollo per l'isolamento del plasma
Formazione sul funzionamento dello strumento	Formazione in laboratorio <ul style="list-style-type: none"> • Richiede lo strumento installato
Ispezione della sede	Conferma in laboratorio <ul style="list-style-type: none"> • Installazione della strumentazione accessoria • Reagenti necessari • Connessione dei componenti del sistema
Formazione in laboratorio	Saggi eseguiti dallo scienziato Illumina <ul style="list-style-type: none"> • Campioni di plasma pretestati con caratteristiche delle prestazioni note (forniti da Illumina) • Esecuzione passo-passo del flusso di lavoro del saggio dall'isolamento del plasma al funzionamento dello strumento fino all'analisi dei dati • Formazione sull'analisi dei dati
Verifica delle competenze in laboratorio	Saggio eseguito dal cliente <ul style="list-style-type: none"> • Campioni di plasma pretestati con caratteristiche delle prestazioni note (forniti da Illumina)

Riepilogo

VeriSeq NIPT Solution v2 sta rivoluzionando l'accessibilità, l'affidabilità e l'efficacia della tecnologia NIPT. Ora i laboratori possono sfruttare la tecnologia NGS per ottenere risultati NIPT altamente accurati, affidabili e veloci con bassi tassi di fallimento.

Maggiori informazioni

Per maggiori informazioni su VeriSeq NIPT Solution v2, visitate la pagina Web www.illumina.com/VeriSeqNIPT.

Informazioni sugli ordini

Prodotto	N. di catalogo
VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 campioni)	20025895
VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 campioni)	15066801
VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 campioni)	15066802
VeriSeq Onsite Server v2	20028403
VeriSeq NIPT Solution Enablement	15076162
Streck cell-free DNA BCT (CE)	15073345
Strumento NextSeq 550Dx	20005715

Dichiarazioni di uso previsto

VeriSeq NIPT Solution v2 è un test diagnostico *in vitro* il cui uso è previsto come test di screening per il rilevamento di anomalie genetiche fetali sull'intero genoma da campioni di sangue intero periferico materno in donne in gravidanza ad almeno dieci settimane di gestazione. VeriSeq NIPT utilizza il sequenziamento dell'intero genoma per rilevare le CNV per tutti gli stati degli autosomi e delle aneuploidie per tutti i cromosomi. Il test offre l'opzione per richiedere il report dell'aneuploidia cromosomica sessuale (SCA). Questo prodotto non deve essere utilizzato come sola base per la diagnosi o per altre decisioni sulla gestione della gravidanza.

Bibliografia

1. Dati in archivio. Illumina, Inc 2019.
2. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Sehnert AJ, Rava RP. [Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing](#). *Obstet Gynecol.* 2012;119(5):890-901.
3. Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, et al. [CARE Study Group: DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening](#). *N Engl J Med.* 2014;370:799-808.
4. Calcoli dei dati in archivio. Illumina, Inc 2019.
5. ACOG Committee on Practice Bulletins—Obstetrics, Committee on Genetics, and the Society for Maternal-Fetal Medicine. [Practice Bulletin No. 163: Screening for Fetal Aneuploidy](#). *Obstet Gynecol.* 2016;127(5):e123-37. doi: 10.1097/AOG.0000000000001406.
6. Pertile MD, Halks-Miller M, Flowers N, et al. [Rare autosomal trisomies, revealed by maternal plasma DNA sequencing, suggest increased risk of fetoplacental disease](#). *Sci Transl Med.* 2017;9(405).
7. Galjaard RJ, Henneman L, Macville M, et al. Implementing NIPT as part of a national prenatal screening program: The Dutch TRIDENT studies. Oral abstract: International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy; July 2018; Antwerp, Belgium.
8. Illumina. Insetto della confezione di VeriSeq NIPT Solution v2. 2019.
9. Illumina. Don't settle for failure. [mkt.illumina.com/rs/600-XEX-927/images/dont-settle-for-failure.pdf](#). Consultato il 15 marzo 2017.
10. Calcoli dei dati in archivio. Illumina, Inc 2017.
11. Lo YM, Chan KC, Sun H, et al. [Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus](#). *Sci Transl Med.* 2010;2(61):61ra91.
12. Duenwald S, Chen G, Barbacioru C, et al. Development of a Novel Paired-End Sequencing-Based Noninvasive Prenatal Test. Poster presented at the Society for Maternal-Fetal Medicine 36th Annual Pregnancy Meeting; February 1-6, 2016; Atlanta, Georgia.
13. Cirigliano V, Ordoñez E, Rueda L, Syngelaki A, Nicolaidis KH. [Performance evaluation of the NeoBona test, a new paired-end massive parallel shotgun sequencing approach for cfDNA based aneuploidy screening](#). *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016; doi: 10.1002/uog.17386. [Pubblicazione in formato elettronico prima della pubblicazione].
14. Cirigliano V, Ordonez E, Rueda L, et al. Performance evaluation and clinical application of a new paired end MPSS approach for cfDNA based prenatal aneuploidy screening. Poster presented at the International Society for Prenatal Diagnosis. July 10-13 2016; Berlin, Germany.
15. Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. [Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma](#). *Prenat Diagn.* 2013; 33:662-666.
16. Pergament E, Cuckle H, Zimmermann B, et al. [Single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal screening in a high-risk and low-risk cohort](#). *Obstet Gynecol.* 2014; 124(2 Pt 1):210-218.

Illumina, Inc. • Numero verde 1.800.809.4566 toll-free (U.S.A.) • Tel. +1.858.202.4566 • techsupport@illumina.com • www.illumina.com

© 2019 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitate la pagina Web www.illumina.com/company/legal.html. Documenton.100000033861 v01 ITAQB7743

illumina[®]

Per uso diagnostico *in vitro*. Per la disponibilità nella vostra regione, contattate un rappresentante Illumina.

100000033861 v01 ITA | 5
English Source: 100000032015 v03