

VeriSeq™ NIPT Solution v2

Ao revolucionar o NIPT, o VeriSeq NIPT Solution v2 é um ensaio de sequenciação de genoma completo e acessível que gera resultados precisos para até 96 amostras em ~ 26 horas.

Destaques

- **Visualização mais abrangente do genoma fetal**
Solução de NIPT no laboratório IVD que oferece o menu de testes mais amplo validado num estudo de exatidão clínica de > 2000 amostras
- **Desempenho superior do teste¹**
Exatidão inigualável, resultados mais rápidos, taxas de falha reduzidas
- **Solução IVD simples e ajustável**
Solução fácil de implementar que analisa 24, 48 ou 96 amostras por ensaio

Introdução

Os testes pré-natais não invasivos (NIPT) realizados com a sequenciação de nova geração (NGS, next-generation sequencing) fornecem resultados de rastreio fiáveis para aneuploidias cromossómicas fetais logo às 10 semanas de gestação — a partir de um único tubo de sangue materno.^{2,3} O VeriSeq NIPT Solution v2 aproveita a tecnologia NGS potente da Illumina para implementar uma abordagem de sequenciação de genoma completo (WGS, Whole-genome sequencing) no NIPT, expandindo as opções do menu de testes para incluir aneuploidias comuns (cromossomas 21, 18 e 13), todas as aneuploidias autossómicas raras (RAA, rare autosomal aneuploidies), aneuploidias dos cromossomas sexuais (SCA, sex chromosome aneuploidies) e deleções parciais e duplicações, designadas de variações no número de cópias (CNV, copy number variation), com um tamanho ≥ 7 Mb. Ao combinar um menu de testes amplo, resultados precisos e taxas de falha reduzidas, o VeriSeq NIPT Solution permite o rastreio mais abrangente do genoma fetal, permitindo a tomada de decisões de gestão da gravidez de forma informada e atempada.^{4,5}

O VeriSeq NIPT Solution v2 incorpora inovações no fluxo de trabalho, instrumento e software que tornam o NIPT à base de NGS acessível a qualquer laboratório que realiza o rastreio de aneuploidia pré-natal clínica. Ao fornecer os reagentes, os instrumentos, o software, a instalação e a formação, o VeriSeq NIPT é uma solução automatizada e fiável para a realização de NIPT a nível interno (Figura 1 e Tabela 1).

Tabela 1: VeriSeq NIPT Solution v2, em resumo

Parâmetro	Descrição
Método	Sequenciação de genoma completo
Preparação de bibliotecas	Sem PCR
Química	Sequenciação por extremidade emparelhada
N.º de amostras	24, 48 ou 96 por lote
Tempo até ao relatório	~ 26 horas
N.º de técnicos	1
Amostra	7-10 ml de um único tubo de sangue materno
Análises oferecidas	Estado da aneuploidia de todos os autossomas e cromossomas sexuais Certas variações no número de cópias subcromossómicas ≥ 7 Mb



Figura 1: Fluxo de trabalho completo de NIPT IVD — O VeriSeq NIPT Solution v2 fornece tudo o que é necessário para realizar o NIPT com NGS, incluindo os reagentes para a extração de ADN, a preparação de bibliotecas e sequenciação; os instrumentos para a preparação de bibliotecas automatizadas e a sequenciação com software de gestão de fluxo de trabalho (Workflow Manager); um servidor no local para o armazenamento e análise de dados seguros; e o software de análise de dados com capacidade para gerar resultados clínicos.

Tabela 2: Desempenho clínico do VeriSeq NIPT Solution v2^a

	Trissomia 21	Trissomia 18	Trissomia 13	RAA ^d	CNV ≥ 7 Mb	Qualquer anomalia ^e
Sensibilidade ^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 de 95% bilateral ^c	97,1%, 100%	91,4%, 100%	87,1%, 100%	82,3%, 99,4%	55,3%, 86,8%	92,7%, 97,3%
Especificidade	99,90% (1982/1984)	99,90% (1995/1997)	99,90 (2000/2002)	99,80% (2001/2005)	99,80% (2000/2004)	99,34% (1954/1967)
IC de 95% bilateral ^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. Sete gravidezes de gémeos corretamente reportadas como T21 não apresentadas na tabela
- b. O desempenho de rastreio básico é reportado para T21, T18 e T13, e exclui 16 amostras com mosaicos conhecidos e outras 49 amostras afetadas com anomalias apenas para o rastreio abrangente do genoma; o desempenho do rastreio abrangente do genoma é reportado para RAA e CNV
- c. IC com base no método de pontuação de Wilson
- d. As RAA excluem os cromossomas 21, 18 e 13
- e. Qualquer anomalia inclui amostras de rastreios básicos SCA e rastreios abrangentes do genoma

Tabela 3: Concordância dos resultados do VeriSeq NIPT Solution v2 para classificação do sexo fetal com resultado padrão de referência clínica

Resultados do VeriSeq NIPT Solution v2	Resultado do exame físico do recém-nascido ^a		Resultados citogenéticos					
	Feminino	Masculino	XX	XY	XO	XXX	XXY	XXYY
Concordância da percentagem	100%	100%	100%	100%	90,5%	100%	100%	91,7%

- a. Nenhum resultado citogenético

Visualização abrangente do genoma fetal

Várias soluções de NIPT no laboratório concentram-se nas trissomias nos cromossomas 21, 18 e 13, mas estes cromossomas representam apenas uma porção do genoma. Estes testes ignoram CNV ≥ 7 Mb que podem ocorrer a uma taxa de incidência de 0,10% e foram associados a anomalias fetais e atraso no desenvolvimento. Estes testes também ignoram gravidezes com um rastreio positivo para RAA, que poderão estar associadas a resultados adversos, incluindo aborto, restrição de crescimento intrauterino (RCIU), dissomia uniparental (DUP), parto pré-termo e anomalias fetais, entre outros.⁶ Com as RAA a ocorrerem a uma taxa combinada de 0,34%,⁶ em comparação com 0,30% para trissomia 21,⁷ é possível que o rastreio de NIPT básico por si só possa ignorar anomalias significativas.

Desempenho superior do teste

Com base na exatidão dos resultados, no tempo até à resposta e nas taxas de falha, o VeriSeq NIPT Solution v2 demonstra um excelente desempenho.

Exatidão inigualável

O VeriSeq NIPT Solution v2 foi submetido a testes exaustivos para determinar a exatidão clínica e a fiabilidade. As amostras de gravidezes afetadas estavam qualificadas para a realização de testes se tivessem resultados clínicos disponíveis e se cumprissem os critérios de inclusão das amostras. A coorte englobou idades gestacionais distribuídas entre 11 semanas, amostras com frações fetais reduzidas e gravidezes de gémeos. O estudo rastreou mais de 2300 amostras maternas com resultados conhecidos para trissomia 21, trissomia 18, trissomia 13, todas as

trissomias autossómicas raras, CNV ≥ 7 Mb e SCA utilizando o VeriSeq NIPT Solution v2 e comparou os resultados com os dados de referência clínica. Os resultados demonstraram uma sensibilidade e uma especificidade excepcionalmente elevadas para as aneuploidias alvo e CNV ≥ 7 Mb (Tabela 2 e Tabela 3) e uma taxa de falha global reduzida das amostras de 1,2%.⁸

Resultados mais rápidos

O VeriSeq NIPT Solution v2 oferece um fluxo de trabalho rápido composto por três passos para NIPT que gera resultados precisos em menos de 1 dia (Tabela 4). Ao seguir o fluxo de trabalho automatizado simples, um técnico consegue analisar 24-96 amostras em menos de 8 horas com um tempo de intervenção mínimo. Os métodos de sequenciação alvo e com base em matriz tendem a apresentar protocolos laboratoriais mais longos, exigindo um maior tempo de intervenção.

Tabela 4: VeriSeq NIPT completo em ~ 1 dia

Passo	Tempo de intervenção	Tempo total
Preparação da amostra (isolamento do plasma, extração do ADN, preparação da biblioteca)	~ 2 horas	~ 8 horas
Sequenciação (carregamento da biblioteca e preparação do ensaio)	~ 15 min	~ 14 horas
Análise de dados e geração de relatório ^a	N/D	~ 4 horas
Tempo total	~ 2,25 horas	~ 26 horas

- a. O tempo real depende dos processos do laboratório individual e pode variar entre locais. N/A: não aplicável

Taxas de falha reduzidas dos testes

As falhas dos testes, quando não é possível efetuar qualquer identificação de dissomia ou aneuploidia, são um fator importante na fiabilidade e na utilidade clínica do NIPT. As taxas de falha dos testes NIPT variam significativamente com base no teste utilizado. Os testes que utilizam uma abordagem direcionada demonstram taxas mais elevadas de falha dos testes do que os testes que sequenciam o genoma completo nos estudos de validação e de experiência clínica.⁹ O VeriSeq NIPT Solution v2 utiliza a WGS para fornecer dados abrangentes em todo o genoma diploide, sem afetar a exatidão nem aumentar as taxas de falha e de falsos positivos. No estudo do desempenho clínico, ~99% das amostras apresentaram um resultado no primeiro ensaio.⁸ Na prática laboratorial, poderá estar disponível material suficiente a partir da colheita de sangue inicial para repetir o fluxo de trabalho do VeriSeq NIPT, se necessário.

Solução IVD simples e ajustável

O VeriSeq NIPT Solution v2 integrado fornece tudo o que é necessário para realizar o ensaio. O fluxo de trabalho automatizado ajusta-se facilmente para analisar 24, 48 ou 96 amostras por ensaio de modo a permitir a eficiência e a flexibilidade na gestão dos volumes de amostras.

Preparação automatizada de bibliotecas

O processo totalmente automatizado do VeriSeq NIPT permite um fluxo de trabalho simples que minimiza o tempo de intervenção do técnico e a possibilidade de erro. O protocolo começa com 7-10 ml de sangue total periférico materno colhido no tubo de colheita de sangue (BCT, Blood Collect Tube) Streck. Os kits de preparação de amostras otimizados do VeriSeq NIPT contêm os reagentes e os consumíveis para preparar bibliotecas de sequenciação a partir do cfDNA. O isolamento do plasma, a extração de cfDNA e a preparação de bibliotecas sem PCR, incluindo a criação de placa de quantificação, a quantificação de bibliotecas e o pooling de bibliotecas, são processos automatizados no VeriSeq NIPT Microlab STAR, um sistema Hamilton Microlab STAR configurado à medida, especificamente para utilizar no fluxo de trabalho do VeriSeq NIPT. O VeriSeq NIPT Workflow Manager (Gestor do fluxo de trabalho) fácil de utilizar controla todos os aspetos da preparação de amostras, incluindo o controlo das amostras.

Sequenciação

O VeriSeq NIPT Solution v2 utiliza a química de sequenciação por síntese (SBS, sequencing by synthesis) da Illumina, a química que gera mais de 90% dos dados de sequenciação no mundo.¹⁰

Melhor eficiência com a sequenciação por extremidade emparelhada

Uma amostra de sangue materno contém diferentes tamanhos de cfDNA; os tamanhos mais longos tendem a ser maternos,

enquanto os tamanhos mais curtos têm uma maior correlação fetal (Figura 2).¹¹ Ao utilizar a sequenciação por extremidade emparelhada, que produz o dobro da quantidade de dados no mesmo tempo e com o mesmo esforço que a sequenciação de leitura única, o VeriSeq NIPT Solution v2 identifica de forma rápida e eficiente os tamanhos de todos os fragmentos de cfDNA numa amostra individual. O algoritmo no VeriSeq NIPT Assay Software (Software de ensaios) utiliza estes dados para concentrar a análise nos fragmentos mais curtos de modo a aumentar o sinal do cfDNA fetal.

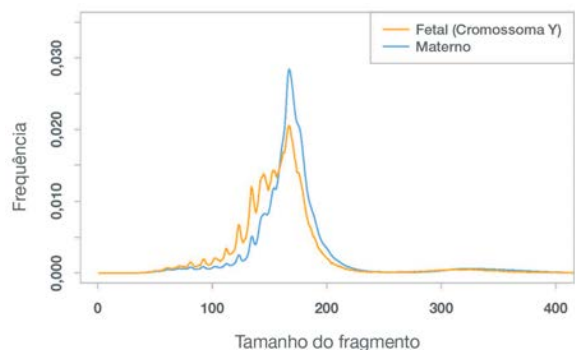


Figura 2: Comparação do tamanho de fragmentos de cfDNA maternos e fetais — A sequenciação por extremidade emparelhada diferencia os fragmentos de cfDNA com base no tamanho. Os fragmentos mais longos tendem a apresentar uma origem materna, enquanto os mais curtos são fetais.

Poder de diagnóstico num sequenciador com base em ambiente de trabalho

A sequenciação no VeriSeq NIPT Solution v2 é realizada no Sistema NextSeq™ 550Dx da Illumina, uma plataforma regulada pela FDA e com a marca CE-IVD que oferece o poder de NGS de elevada produtividade com a acessibilidade de um sistema de bancada (Tabela 5). O Sistema NextSeq 550Dx inclui um fluxo de trabalho de carregar e prosseguir que requer apenas um tempo de intervenção de cerca de 30 minutos. Uma interface de utilizador intuitiva permite que os utilizadores realizem aplicações de sequenciação com formação mínima ou pouco tempo de preparação do instrumento.

Tabela 5: Requisitos do desempenho do instrumento de NGS

Parâmetro	Especificação
Comprimento de leitura	2 × 36 bp
Tipo de ficheiro de sequenciação	Ficheiro .BCL
Saída de sequenciação	400M leituras
Tempo do ensaio	~ 14 horas
Multiplexagem	24 ou 48 amostras por ensaio

Análise no local

A análise de dados é realizada num VeriSeq Onsite Server v2 com o VeriSeq NIPT Assay Software v2 (Software de ensaios) com a marca IVD. O servidor processa automaticamente os dados de sequenciação. É possível colocar vários lotes de amostras em fila de espera para fins de análise num único servidor. Não é

necessário enviar os dados para análise, poupando tempo e protegendo a identidade da amostra.

VeriSeq NIPT Assay Software

O VeriSeq NIPT Assay Software (Software de ensaios) filtra e alinha as leituras com um genoma de referência. Um algoritmo avançado conta as leituras por cromossoma. As pontuações refletem a cobertura normalizada do cromossoma em teste ou da região subcromossômica, e ajudam na detecção e na distinção de aneuploidia e CNV. Além disso, o software gera e comunica a estimativa de fração fetal para cada amostra. Os dados da fração fetal são combinados com a cobertura e outros dados estatísticos gerados durante a sequenciação para avaliar o estado de aneuploidia.

Para garantir taxas de falha reduzidas dos testes, o VeriSeq NIPT Assay Software (Software de ensaios) inclui a métrica de pontuação de qualidade da amostra da análise de confiança de aneuploidia fetal individualizada (iFACT, individualized fetal aneuploidy confidence test). O iFACT indica se o instrumento gerou a cobertura de sequenciação e a qualidade de dados suficientes, tendo em conta a estimativa da fração fetal para cada amostra, de modo a permitir a identificação de uma aneuploidia ou CNV, mesmo para amostras com uma baixa fração fetal.¹²⁻¹⁴ Este limite dinâmico permite ao VeriSeq NIPT Assay Software (Software de ensaios) comunicar amostras com fração fetal baixa, resultando em falhas reduzidas dos testes.¹⁴⁻¹⁶

Geração de relatórios

Após a análise dos dados, o VeriSeq NIPT Assay Software (Software de ensaios) gera uma identificação “Aneuploidy Detected” (Aneuploidia detetada) ou “No Aneuploidy Detected” (Nenhuma aneuploidia detetada) para o cromossoma testado em cada amostra. Se for detetado um CNV, são apresentadas as coordenadas exatas no genoma no relatório de saída para essa amostra. As informações são inseridas num ficheiro .CSV que pode ser integrado com um LIMS existente. Os dados podem ser utilizados para criar um relatório clínico personalizado de acordo com as necessidades do laboratório.

Implementação com um apoio total

Para uma simples integração no laboratório, o VeriSeq NIPT Solution v2 inclui a instalação completa do sistema por um técnico de assistência em campo competente da Illumina e formação prática. Os cientistas habilitados da Illumina orientam o pessoal do laboratório passo a passo ao longo do processo de extração da amostra, preparação de bibliotecas, sequenciação e análise (Tabela 6). Quando os laboratórios estiverem prontos e em funcionamento, a assistência continua é fornecida pela equipa de assistência técnica da Illumina.

Tabela 6: Formação no VeriSeq NIPT Solution v2

Tópico	Detalhes
Introdução ao VeriSeq NIPT Solution v2	Seminário de descrição geral do fluxo de trabalho e análise <ul style="list-style-type: none"> • Guia do equipamento auxiliar • Guia de consumíveis • Protocolo de colheita de sangue • Protocolo de isolamento do plasma
Formação na operação do instrumento	Formação no local <ul style="list-style-type: none"> • Requer que o instrumento esteja instalado
Inspeção no local	Confirmação no local <ul style="list-style-type: none"> • Instalação do equipamento auxiliar • Reagentes necessários • Conectividade dos componentes do sistema
Formação no local	Ensaio realizado pelo cientista da Illumina <ul style="list-style-type: none"> • Amostras de plasma pré-testadas com características de desempenho conhecidas (fornecidas pela Illumina) • Instruções sobre o fluxo de trabalho do ensaio, desde o isolamento do plasma à operação do instrumento e análise dos dados • Formação na análise dos dados
Testes de competências no local	Ensaio realizado pelo cliente <ul style="list-style-type: none"> • Amostras de plasma pré-testadas com características de desempenho conhecidas (fornecidas pela Illumina)

Resumo

O VeriSeq NIPT Solution v2 revoluciona a acessibilidade, a fiabilidade e o poder no NIPT. Agora, qualquer laboratório pode aproveitar a NGS para resultados de NIPT rápidos, fráveis e altamente precisos com taxas de falha reduzidas.

Saiba mais

Para mais informações sobre o VeriSeq NIPT Solution v2, visite www.illumina.com/VeriSeqNIPT.

Informações para encomenda

Produto	Catálogo n.º
VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 samples) (Kit de preparação de amostras, 24 amostras)	20025895
VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 samples) (Kit de preparação de amostras, 48 amostras)	15066801
VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 samples) (Kit de preparação de amostras, 96 amostras)	15066802
VeriSeq Onsite Server v2	20028403
VeriSeq NIPT Solution Enablement	15076162
Streck cell-free DNA BCT (CE)	15073345
Instrumento NextSeq 550Dx	20005715

Declaração de utilização prevista

O VeriSeq NIPT Solution v2 é um teste de diagnóstico *in vitro* para ser utilizado como teste de rastreio para a detecção de anomalias genéticas fetais abrangentes do genoma a partir de amostras maternas de sangue periférico total em mulheres grávidas com pelo menos 10 semanas de gestação. O VeriSeq NIPT utiliza a sequenciação de genoma completo para detetar CNV para todos

os autossomas e o estado de aneuploidia para todos os cromossomas. O teste oferece uma opção para solicitar a comunicação de aneuploidias dos cromossomas sexuais (SCA). Este produto não pode ser utilizado como a única base de diagnóstico ou de outras decisões de gestão da gravidez.

Referências

1. Dados em arquivo. 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. Cálculos de dados em arquivo. 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 feto-placental 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; Julho de 2018; Antuérpia, Bélgica.
8. Illumina. Folheto informativo do 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](#). Acesso a 15 de março de 2017.
10. Cálculos de dados em arquivo. 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; Fevereiro 1-6, 2016; Atlanta, Geórgia.
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. [Epub antes da impressão].
14. Cirigliano V, Ordoñez 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. Julho 10-13 2016; Berlin, Alemanha.
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. • 1.800.809.4566 número gratuito (EUA) • +1.858.202.4566 tel • techsupport@illumina.com • www.illumina.com

© 2019 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados. Todas as marcas comerciais são propriedade da Illumina, Inc. ou dos respetivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte [www.illumina.com/company/legal.html](#). Documenton.º 100000119418 v00 POR QB7743

