

VeriSeq™ NIPT Solution v2

Un saggio di sequenziamento
dell'intero genoma completo
e accessibile

- Panoramica completa dei cromosomi fetali con un'ampia gamma di test validati in uno studio di accuratezza clinica con più di 2.300 campioni
- Prestazioni del test affidabili¹ con elevata accuratezza, risultati rapidi e bassi tassi di fallimento
- Una soluzione per IVD semplice e scalabile in grado di analizzare 24, 48 o 96 campioni per corsa

illumina®

Introduzione

Il test prenatale non invasivo (NIPT, Noninvasive Prenatal Testing) eseguito con il sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) 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 la potente tecnologia NGS Illumina per sequenziare l'intero genoma (WGS, Whole-Genome Sequencing) con il test NIPT ampliando le opzioni di analisi per includere: le aneuploidie comuni (cromosomi 21, 18 e 13), le aneuploidie autosomiche rare (RAA, Rare Autosomal Aneuploidy), determinate aneuploidie dei cromosomi sessuali (SCA, Sex Chromosome Aneuploidy) e duplicazioni e delezioni parziali con dimensioni ≥ 7 Mb.

Unendo l'ampia scelta di analisi, i risultati accurati e i bassi tassi di fallimento, VeriSeq NIPT Solution v2 offre lo screening completo dei cromosomi fetali, per consentire decisioni informate e tempestive sulla gestione della gravidanza.¹ Grazie a reagenti, strumenti, software, installazione e formazione, VeriSeq NIPT Solution v2 è una soluzione affidabile e automatizzata per i test NIPT eseguiti in laboratorio (Figura 1 e Tabella 1).

Panoramica completa dei cromosomi fetali

Molte soluzioni NIPT eseguite in laboratorio si concentrano sullo screening delle trisomie nei cromosomi 21, 18 e 13; tuttavia queste condizioni rappresentano solo una parte delle anomalie che possono verificarsi. Questi test non rileveranno le duplicazioni e le delezioni parziali ≥ 7 Mb che possono essere associate ad anomalie fetali e a ritardo nello sviluppo e che invece hanno un tasso di screening positivo dello 0,12% con il NIPT.⁴ Questi test non individueranno nemmeno le gravidanze positive allo screening per RAA, che potrebbero essere associate a esiti avversi inclusi tra gli altri aborto spontaneo, restrizione della crescita intrauterina (IUGR, Intrauterine Growth Restriction), disomia uniparentale (UPD, Uniparental Disomy), travaglio pretermine spontaneo e anomalie fetali.⁵ Con RAA che si verificano con tassi positivi allo screening dello 0,34%,⁵ rispetto allo 0,30% per la trisomia 21.^{6,7}

Tabella 1: VeriSeq NIPT Solution v2 in sintesi

| 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; duplicazioni e delezioni parziali ≥ 7 Mb |

Prestazioni del test affidabili

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

Elevata accuratezza

VeriSeq NIPT Solution v2 è validato per determinare accuratezza e affidabilità cliniche. Per l'analisi sono stati inclusi campioni appartenenti a gravidanze affette se gli esiti clinici erano disponibili e soddisfacevano i criteri di inclusione del campione. La coorte comprendeva età gestazionale di almeno 10 settimane, 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, le RAA, le duplicazioni e delezioni parziali ≥ 7 Mb e le SCA utilizzando VeriSeq NIPT Solution v2 e confrontando i risultati con la verità clinica di riferimento. I risultati hanno dimostrato sensibilità e specificità elevate per le trisomie comuni, le RAA e le duplicazioni e delezioni parziali ≥ 7 Mb, elevata concordanza della classificazione del sesso fetale con esiti clinici e un basso tasso



Figura 1: Flusso di lavoro 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 il software di gestione del flusso di lavoro; un server onsite sicuro per l'archiviazione dei dati e l'analisi; un software per l'analisi dei dati in grado di generare un report con risultati qualitativi.

Tabella 2: Prestazioni cliniche di VeriSeq NIPT Solution v2¹

| | Trisomia 21 ^c | Trisomia 18 | Trisomia 13 | RAA ^d | Duplicazioni e delezioni parziali ≥ 7 Mb | Qualsiasi anomalia ^e |
|--------------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--|---------------------------------|
| Sensibilità ^a | > 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 ^b | 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 ^b | 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. Le prestazioni dello screening di base sono riportate per T21, T18 e T13 ed escludono 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 duplicazioni e delezioni parziali.
- b. IC basato sul metodo del punteggio di Wilson.
- c. Nella tabella non sono mostrate sette gravidanze gemellari riportate correttamente come T21.
- d. RAA esclude i cromosomi 21, 18 e 13.
- e. Qualsiasi anomalia include i campioni ottenuti dallo screening di base e dallo screening dell'intero genoma per SCA.

Tabella 3: La concordanza dei risultati ottenuti da VeriSeq NIPT Solution v2 per la classificazione sessuale fetale rispetto all'esito dei riferimenti clinici standard¹

| Risultati di VeriSeq NIPT Solution v2 | Esito dell'esame fisico del neonato | | Risultati citogenetici | | | | | |
|---------------------------------------|-------------------------------------|---------|------------------------|------|-------|------|------|-------|
| | Femmina | Maschio | XX | XY | XO | XXX | XXY | YYY |
| Concordanza espressa in percentuale | 100% | 100% | 100% | 100% | 90,5% | 100% | 100% | 91,7% |

di fallimenti del campione first-pass, pari all'1,2% (Tabella 2 e Tabella 3).¹

Risultati rapidi

VeriSeq NIPT Solution v2 offre un flusso di lavoro basato su tre fasi per i test NIPT e genera risultati accurati 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 poco più di un giorno

| Fase | Durata interventi manuali | Durata totale |
|---|---------------------------|---------------|
| Preparazione del campione e preparazione delle librerie | Circa 2 ore | Circa 8 ore |
| Sequenziamento | Circa 15 min | Circa 14 ore |
| Analisi dei dati e generazione di report | N/A | Circa 4 ore |
| Durata totale | Circa 2,25 ore | Circa 26 ore |

La durata effettiva dipende dalle pratiche dei singoli laboratori; N/A, non applicabile

Bassi 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. Le percentuali di fallimento del test NIPT variano in modo significativo in base al test utilizzato. I test che utilizzano un approccio mirato o un metodo per singolo polimorfismo hanno mostrato tassi di fallimento più elevati rispetto alla tecnologia NGS.⁸ VeriSeq NIPT Solution v2 utilizza il sequenziamento WGS per fornire un'ampia quantità di dati su tutti i cromosomi senza incidere sull'accuratezza o senza aumentare i tassi di fallimento o di falsi positivi. Nello studio di convalida clinica, il tasso di fallimento first-pass era dell'1,2%.¹ Nella pratica clinica, il plasma ottenuto dal prelievo di sangue iniziale è sufficiente e disponibile per ripetere il flusso di lavoro VeriSeq NIPT, se necessario.⁹ È stato dimostrato che alla ripetizione del test, il tasso di fallimento del test primario era sceso dal 2% all'1,3% per lo stesso campione.⁹

Soluzione per IVD semplice e scalabile

VeriSeq NIPT Solution v2 è integrato 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. Il laboratorio può scegliere di eseguire lo screening di base o lo screening dell'intero genoma, campione per campione.

Flusso di lavoro automatizzato

Il saggio VeriSeq NIPT è completamente automatizzato e fornisce un semplice flusso di lavoro che riduce al minimo gli interventi manuali e i potenziali errori del tecnico. Il protocollo richiede 7-10 ml di sangue intero periferico materno raccolto nella provetta Streck Blood Collect Tube (BCT) raccomandata. I kit VeriSeq NIPT sono ottimizzati per la preparazione delle librerie e contengono i reagenti e le etichette 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 della piastra di quantificazione, la quantificazione delle librerie e il raggruppamento in pool delle librerie sono automatizzati su VeriSeq NIPT Microlab STAR, un sistema Hamilton Microlab STAR configurato e ottimizzato specificatamente per l'uso 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

Un campione di sangue materno contiene diverse lunghezze di frammenti di cfDNA; le lunghezze più lunghe tendono ad essere materne mentre le lunghezze più brevi tendono ad originarsi dal feto (Figura 2).¹⁰ VeriSeq NIPT Solution v2 può identificare in modo efficace e veloce le lunghezze di tutti i frammenti di cfDNA contenuti in un singolo campione e concentrare l'analisi sui frammenti di cfDNA più brevi mediante il sequenziamento paired-end eseguito sul sistema NextSeq™ 550Dx Illumina, che offre l'efficacia della tecnologia NGS¹¹ a elevata processività con un sistema da banco economico (Tabella 5).

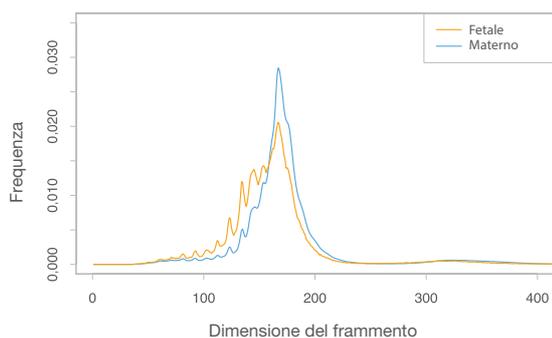


Figura 2: Confronto della dimensione di frammenti di cfDNA materno e fetale: il sequenziamento paired-end è in grado di distinguere i frammenti di cfDNA in base alla dimensione. I frammenti più lunghi tendono ad essere di origine materna mentre i frammenti più brevi di origine fetale.

Tabella 5: Requisiti delle prestazioni dello strumento NGS

| Parametro | Specifica |
|--------------------------------|----------------------------|
| Lunghezza lettura | 2 × 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 VeriSeq v2 Onsite Server dedicato con IVD VeriSeq NIPT Assay Software v2. Il server elabora automaticamente i dati del sequenziamento. Su un singolo server, possono essere messi in coda per l'analisi 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 v2

VeriSeq NIPT Assay Software v2 filtra e allinea le letture su un genoma di riferimento. Un algoritmo avanzato determina la densità della lettura per cromosoma (segmento) e contribuisce al rilevamento e alla differenziazione delle aneuploidie e delle duplicazioni e delezioni parziali. Inoltre, il software genera e riporta una stima della frazione fetale per ogni campione. I dati della frazione fetale sono utilizzati assieme alla copertura e ad 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 v2 include la metrica del punteggio qualitativo del campione mediante il test di sicurezza fetale delle aneuploidie individuale (iFACT, Individualized Fetal Aneuploidy Confidence Test). iFACT indica se il saggio, partendo dalla frazione fetale stimata per ogni campione, ha generato una copertura di sequenziamento sufficiente per consentire una identificazione di aneuploidia o duplicazione e delezione parziale, anche in campioni con bassa frazione fetale.¹² Questo cutoff dinamico consente a VeriSeq NIPT Assay Software v2 di riportare campioni con bassa frazione fetale con bassi tassi di fallimento del test.¹

Generazione di report

Al termine dell'analisi dei dati, VeriSeq NIPT Assay Software genera un risultato "Aneuploidy Detected" (Aneuploidia rilevata) o "No Aneuploidy Detected" (Nessuna aneuploidia rilevata) per i cromosomi analizzati in ogni campione. Se viene rilevata una duplicazione e delezione parziale, vengono visualizzate nel report le coordinate esatte nel genoma. 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.

Implementazione completamente supportata

Per una implementazione ottimale nel laboratorio, VeriSeq NIPT Solution v2 include l'installazione completa del sistema da parte di un tecnico dell'assistenza Illumina competente 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 aggiuntiva • 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 rivoluziona la disponibilità, l'affidabilità e l'efficacia della tecnologia NIPT. Ora i laboratori possono sfruttare la tecnologia NGS per ottenere risultati NIPT veloci, affidabili e altamente accurati con bassi tassi di fallimento.

Maggiori informazioni

VeriSeq NIPT Solution v2, www.illumina.com/VeriSeqNIPT.

Informazioni per gli ordini

| Prodotto | N. di catalogo |
|---|----------------------|
| VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 samples) | 20025895 |
| VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 samples) | 15066801 |
| VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 samples) | 15066802 |
| VeriSeq NIPT Assay Software v2 | 20047024 |
| VeriSeq Onsite Server v2 | 20028403 20047000 |
| Streck cell-free DNA BCT (CE) | 15073345 |
| Strumento NextSeq 550Dx | 20005715 |
| NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 cycles | 20028870 |

Dichiarazione per l'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 10 settimane di gestazione. VeriSeq NIPT Solution v2 utilizza il sequenziamento dell'intero genoma per rilevare le duplicazioni e le delezioni parziali per tutti gli autosomi e per lo stato di aneuploidia per tutti i cromosomi. Il test offre un'opzione per richiedere il report sull'aneuploidia del cromosoma sessuale (SCA). Questo prodotto non può essere utilizzato come sola base per la diagnosi o altre decisioni sulla gestione della gravidanza.

Bibliografia

1. Pertile MD, Flowers N, Vavrek D, et al. [Performance of a Paired-End Sequencing-Based Noninvasive Prenatal Screening Test in the Detection of Genome-Wide Fetal Chromosomal Anomalies](#). *Clin Chem*. 2021;doi: 10.1093/clinchem/hvab067.
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. Pertile MD. [Genome-wide cell-free DBA-based prenatal testing for rare autosomal trisomies and subchromosomal abnormalities](#). Page-Christiaens L, Klein HG. *Noninvasive Prenatal Testing (NIPT): Applied Genomics in Prenatal Screening and Diagnosis*. London, United Kingdom: Academic Press Elsevier; 2018:97-123.
5. 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).
6. van der Meij KRM, Sistermans EA, Macville MVE, et al. [TRIDENT-2: National Implementation of Genome-wide Non-invasive Prenatal Testing as a First-Tier Screening Test in the Netherlands](#). *Am J Hum Genet*. 2019;105(6):1091-1101.
7. Van Den Bogaert, K, Lannoo, L, Brison, N. et al. [Outcome of publicly funded nationwide first-tier noninvasive prenatal screening](#). *Genet Med*. 2021;23:1137-1142.
8. Yaron Y. [The implications of non-invasive prenatal testing failures: a review of an under-discussed phenomenon](#). *Prenat Diagn*. 2016;36:391-396.
9. Eiben B, Borth H, Kutur N, et al. [Clinical experience with noninvasive prenatal testing in Germany: analysis of over 500 high-risk cases for trisomy 21, 18, 13, and monosomy X](#). *Obstet Gynecol Rep*. 2021;5:1-7.
10. 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.
11. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. [Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry](#). *Nature*. 2008;456(7218):53-59.
12. Cirigliano V, Ordoñez E, Rueda L, Syngelaki A, Nicolaides 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.

illumina®

Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2021 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari.

Per specifiche informazioni sui marchi, può consultare
www.illumina.com/company/legal.html.

M-APJ-00036 ITA v2.0