

VeriSeq™ NIPT Solution v2

Un saggio di
sequenziamento
dell'intero genoma
completo e accessibile

- Panoramica esaustiva 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 risultati rapidi e altamente accurati 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 la tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (NGC, 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 l'efficace tecnologia NGS Illumina per utilizzare il sequenziamento dell'intero genoma (WGS, Whole-Genome Sequencing) con il test NIPT ampliando le opzioni di analisi per includere le aneuploidie comuni (trisomie 21, 18 e 13), le aneuploidie autosomiche rare (RAA, Rare Autosomal Aneuploidy), determinate aneuploidie dei cromosomi sessuali (SCA, Sex Chromosome Aneuploidy) e le delezioni e duplicazioni parziali, chiamate anche variazioni del numero di copie (CNV, Copy Number Variation), con dimensioni di almeno 7 Mb.

Grazie a un'ampia gamma di test, risultati accurati e bassi tassi di fallimento, VeriSeq NIPT Solution v2 offre lo screening esaustivo dei cromosomi fetali e consente di prendere decisioni informate e tempestive nella gestione della gravidanza.¹ Con reagenti, strumenti, software, installazione e formazione, VeriSeq NIPT Solution v2 è una soluzione affidabile e automatizzata per l'esecuzione del test NIPT in sede (Figura 1 e Tabella 1).

Panoramica esaustiva 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 rilevano le CNV di almeno 7 Mb che possono essere associate ad anomalie fetali e ritardi dello sviluppo e presentano un tasso di screening positivo dello 0,12% con NIPT.⁴ Questi test non rilevano inoltre le gravidanze positive allo screening per le RAA, che possono essere associate a esiti avversi, fra cui aborto spontaneo, restrizione di crescita intrauterina (IUGR, Intrauterine Growth Restriction), disomia uniparentale (UPD, Uniparental Disomy), travaglio pretermine spontaneo e anomalie fetali.⁵ La percentuale combinata dei risultati positivi alle RAA è pari allo 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
Tempistiche di recupero del report	Circa 26 ore
N. di operatori	1
Campione	7-10 ml di una singola provetta contenente sangue materno
Analisi offerta	Stato delle aneuploidie per tutti gli autosomi e i cromosomi sessuali; CNV di almeno 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 garantire 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 oltre 2.300 campioni materni con esiti noti per trisomia 21, trisomia 18, trisomia 13, RAA, CNV di almeno 7 Mb e SCA. I risultati ottenuti con VeriSeq NIPT Solution v2 sono stati confrontati con la verità clinica di riferimento. VeriSeq NIPT Solution v2 ha dimostrato sensibilità e specificità elevate per le trisomie comuni,



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 Workflow Manager Software, un server onsite per l'archiviazione dei dati e l'analisi sicure e un software per l'analisi dei dati in grado di generare dei report con risultati qualitativi.

Tabella 2: prestazioni cliniche di VeriSeq NIPT Solution v2¹

	Trisomia 21 ^c	Trisomia 18	Trisomia 13	RAA ^d	CNV ≥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 bilaterale al 95% ^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% (2.000/2004)	99,34% (1.954/1.967)
IC bilaterale al 95% ^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. 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: concordanza dei risultati ottenuti da VeriSeq NIPT Solution v2 per la classificazione sessuale fetale rispetto all'esito dei riferimenti clinici¹

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

le RAA, le CNV di almeno 7 Mb, elevata concordanza della classificazione del sesso fetale con esiti clinici e un basso tasso di fallimenti del campione first-pass dell'1,2% (Tabella 2 e Tabella 3).¹

Risultati rapidi

VeriSeq NIPT Solution v2 offre un flusso di lavoro basato su tre fasi che genera risultati accurati in poco più di un giorno (Tabella 4). Attenendosi al flusso di lavoro semplice e automatizzato, un operatore 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 minuti	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 possono variare in modo significativo in base al test utilizzato. I test che utilizzano un approccio mirato o un metodo basato su polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) dimostrano tassi più elevati di fallimenti primari del test rispetto alla tecnologia NGS.⁸ VeriSeq NIPT Solution v2 utilizza la tecnologia WGS per fornire un elevato numero di dati su tutti i cromosomi senza ridurre l'accuratezza o 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 di laboratorio, il prelievo di sangue iniziale fornirà plasma sufficiente per ripetere il flusso di lavoro VeriSeq NIPT, se necessario.⁹ Test ripetuti hanno dimostrato una riduzione del tasso di fallimento primario 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 ampliato per analizzare 24, 48 o 96 campioni per corsa e consentire la gestione efficace e flessibile dei volumi di campione. Per ciascun campione è possibile selezionare lo screening di base o dell'intero genoma.

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. Il protocollo richiede 7-10 ml di sangue intero periferico materno inserito nella provetta di raccolta sangue (BCT, Blood Collect Tube) Streck raccomandata. I kit VeriSeq NIPT per la preparazione dei campioni sono ottimizzati e contengono i reagenti e le etichette necessari per la preparazione delle librerie di sequenziamento a partire da DNA libero da cellule (cfDNA, cell-free DNA). 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 frammenti di cfDNA di diverse lunghezze; i valori più lunghi tendono a essere quelli materni, mentre i valori più brevi tendono a derivare dal feto (Figura 2).¹⁰ VeriSeq NIPT Solution v2 identifica in modo veloce ed efficiente le lunghezze di tutti i frammenti di cfDNA in un singolo campione e concentra l'analisi sul cfDNA più breve utilizzando il sequenziamento paired-end eseguito sul sistema Illumina NextSeq™ 550Dx, che fornisce l'efficacia della tecnologia NGS a elevata processività¹¹ con un sistema da banco economico (Tabella 5).

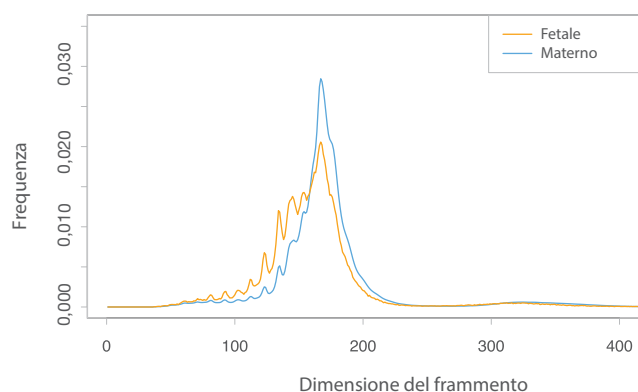


Figura 2: confronto della dimensione dei frammenti di cfDNA materno e fetale. Il sequenziamento paired-end è in grado di distinguere i frammenti di cfDNA in base alla dimensione. I frammenti più lunghi tendono ad essere di origine materna, mentre i frammenti più brevi di origine fetale.

Tabella 5: requisiti delle prestazioni dello strumento NGS

Parametro	Specifica
Lunghezza lettura	2 × 36 bp
Tipo di file di sequenziamento	File .BCL
Output del 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 VeriSeq v2 Onsite Server dedicato con l'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 rispetto a 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 CNV. 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 garantire 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). L'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 basse frazioni fetali, il che consente di ottenere ridotti 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 CNV, vengono visualizzate nel report le coordinate esatte nel genoma. I dati sono forniti come file ".CSV" che può essere integrato con un sistema di gestione delle informazioni di laboratorio (LIMS, Laboratory Information Management System) esistente, consentendo la creazione di 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 di Illumina competente e la formazione pratica. Gli scienziati di 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 tutti i sistemi sono operativi, il personale dell'assistenza tecnica di 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 di 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

[Illumina VeriSeq NIPT Solution v2](#)

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	20047000 20101927
Streck cell-free DNA BCT (CE)	15073345
NextSeq 550Dx Instrument	20005715
NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 cycles	20028870

Dichiarazione d'uso previsto

VeriSeq NIPT Solution v2 è un test diagnostico *in vitro* progettato per essere utilizzato 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 con età gestazionale di almeno 10 settimane. VeriSeq NIPT Solution v2 utilizza il sequenziamento WGS per rilevare le duplicazioni e le delezioni parziali per lo stato di tutti gli autosomi e le aneuploidie per tutti i cromosomi. Il test offre un'opzione per richiedere il report sulla SCA. Questo prodotto non può essere utilizzato come sola base per la diagnosi o altre decisioni sulla gestione della gravidanza.

VeriSeq NIPT Solution v2 include: VeriSeq NIPT Workflow Manager v2 per VeriSeq NIPT Microlab STAR, VeriSeq NIPT Sample Prep Kit e VeriSeq Onsite Server v2 con VeriSeq NIPT Assay Software v2. VeriSeq NIPT Solution v2 è destinato all'uso con un sequenziatore di nuova generazione.

Bibliografia

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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).
- van der Meij KRM, Siermans 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.
- 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.
- Yaron Y. [The implications of non-invasive prenatal testing failures: a review of an under-discussed phenomenon](#). *Prenat Diagn*. 2016;36:391-396.
- 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.
- 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.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. [Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry](#). *Nature*. 2008;456(7218):53-59.
- 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.



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

© 2024 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, visitare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.
M-APJ-00036 ITA v3.0