

# 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 affidabili<sup>1</sup> con risultati rapidi e 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**<sup>®</sup>

## 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.<sup>2,3</sup> Il VeriSeq NIPT Solution v2 sfrutta l'efficace tecnologia NGS di Illumina per utilizzare il sequenziamento dell'intero genoma (WGS, Whole-Genome Sequencing) con il test NIPT ampliando le opzioni di analisi per includere: aneuploidie comuni (cromosomi 21, 18 e 13), aneuploidie autosomiche rare (RAA, Rare Autosomal Aneuploidy), determinate aneuploidie dei cromosomi sessuali (SCA, Sex Chromosome Aneuploidy) e duplicazioni e delezioni parziali con dimensioni  $\geq 7$  Mb per tutti gli autosomi.

Grazie a un'ampia gamma di test, risultati accurati e bassi tassi di fallimento, il VeriSeq NIPT Solution v2 offre lo screening esaustivo dei cromosomi fetali e consente di prendere decisioni informate e tempestive nella gestione della gravidanza.<sup>1</sup> Con reagenti, strumenti, software, installazione e formazione, il 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 duplicazioni e le delezioni parziali  $\geq 7$  Mb che possono essere associate ad anomalie fetali e ritardi dello sviluppo e presentano un tasso di screening positivo dello 0,12% con NIPT.<sup>4</sup> Questi test non rilevano inoltre le gravidanze positive allo screening per le RAA, che possono

essere associate a esiti avversi inclusi tra gli altri aborto spontaneo, restrizione di crescita intrauterina (IUGR, Intrauterine Growth Restriction), disomia uniparentale (UPD, Uniparental Disomy), travaglio pretermine spontaneo e anomalie fetali.<sup>5</sup>

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 di tutti gli autosomi e cromosomi sessuali; duplicazioni e delezioni parziali $\geq 7$ Mb

## Prestazioni del test affidabili

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

## Risultati accurati

Il VeriSeq NIPT Solution v2 è validato per determinare accuratezza e affidabilità cliniche. È stato eseguito uno studio di validazione clinica con i campioni ottenuti da gravidanze affette eleggibili per l'analisi se gli esiti clinici



Figura 1: Flusso di lavoro NIPT completo per IVD: il 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 Workflow Manager Software; 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 del VeriSeq NIPT Solution v2<sup>1</sup>

	Trisomia 21 <sup>c</sup>	Trisomia 18	Trisomia 13	RAA <sup>d</sup>	Duplicazioni e delezioni parziali ≥ 7 Mb	Qualsiasi anomalia <sup>e</sup>
Sensibilità <sup>a</sup>	> 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% <sup>b</sup>	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 bilaterale al 95% <sup>b</sup>	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: Concordanza dei risultati ottenuti dal VeriSeq NIPT Solution v2 per la classificazione sessuale fetale rispetto all'esito dei riferimenti clinici<sup>1</sup>

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

erano disponibili e se 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 il VeriSeq NIPT Solution v2 e confrontando i risultati con l'attendibilità 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 per tutti gli autosomi, elevata concordanza della classificazione del sesso fetale con esiti clinici e un basso tasso di fallimenti del campione first-pass, pari all'1,2% (Tabella 2 e Tabella 3).<sup>1</sup>

### Risultati rapidi

Il 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 8 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 1 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 basato sull'analisi di siti polimorfici a singolo nucleotide dimostrano

tassi più elevati di fallimenti primari del test rispetto alla tecnologia NGS.<sup>6</sup> Il VeriSeq NIPT Solution v2 utilizza la tecnologia WGS per fornire un elevato numero di dati su tutti i cromosomi senza influire su accuratezza o aumentare fallimenti o tassi di falsi positivi. Nello studio di validazione clinica, il tasso di fallimento first-pass era pari all'1,2%.<sup>1</sup> Nella pratica di laboratorio, nel caso fosse necessario ripetere il flusso di lavoro VeriSeq NIPT, sarà sufficiente il plasma ottenuto dal prelievo iniziale di sangue.<sup>7</sup> Mediante uno studio di validazione clinica è stato osservato un tasso di fallimento finale, al secondo prelievo di sangue, pari allo 0,4%.<sup>7</sup>

## Soluzione per IVD semplice e scalabile

Il 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 per la preparazione delle librerie sono ottimizzati 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 sul VeriSeq NIPT Microlab STAR, un sistema Hamilton Microlab STAR configurato e ottimizzato specificatamente per l'uso nel flusso di lavoro VeriSeq NIPT. Il 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 dimensioni; le letture più lunghe sono arricchite per il DNA materno mentre le letture più brevi sono arricchite per il DNA fetale (Figura 2).<sup>8</sup>

Il VeriSeq NIPT Solution v2 identifica in modo veloce ed efficiente le lunghezze di tutti i frammenti di cfDNA in un singolo campione e, nell'algoritmo di analisi, applica una maggiore ponderazione sulle letture più brevi di cfDNA utilizzando il sequenziamento paired-end eseguito sul NextSeq™ 550Dx System di Illumina, che fornisce l'efficacia della tecnologia NGS a elevata processività<sup>9</sup> con un sistema da banco economico (Tabella 5).

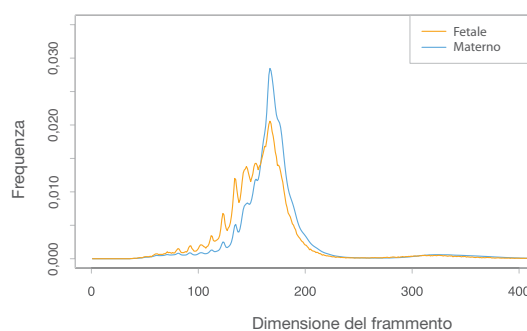


Figura 2: Confronto della dimensione dei frammenti di cfDNA materno e fetale: il sequenziamento paired-end è in grado di distinguere i frammenti di cfDNA in base alla dimensione. I frammenti più lunghi sono arricchiti per il DNA materno mentre i frammenti più brevi sono arricchiti per il DNA fetale.

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	Circa 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

Il VeriSeq NIPT Assay Software v2 filtra e allinea le letture rispetto a un genoma di riferimento. Un algoritmo avanzato determina la densità di lettura per cromosoma (raggruppamento) 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 ottenere bassi tassi di fallimento del test, il 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.<sup>10</sup> Questo cutoff dinamico consente al VeriSeq NIPT Assay Software v2 di riportare campioni con basse frazioni fetali, il che consente di ottenere bassi fallimenti del test.<sup>1</sup>

## Generazione di report

Al termine dell'analisi dei dati, il 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 delezione o una duplicazione parziale, vengono visualizzate nel report le coordinate esatte nel genoma. Le informazioni vengono inviate a un file ".tab" 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, il 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 affidabili 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 i laboratori 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"> <li>• Guida alla strumentazione aggiuntiva</li> <li>• Guida ai materiali di consumo</li> <li>• Protocollo per il prelievo del sangue</li> <li>• Protocollo per l'isolamento del plasma</li> </ul>
Formazione sul funzionamento dello strumento	Formazione in laboratorio <ul style="list-style-type: none"> <li>• Richiede lo strumento installato</li> </ul>
Ispezione della sede	Conferma in laboratorio <ul style="list-style-type: none"> <li>• Installazione della strumentazione aggiuntiva</li> <li>• Reagenti necessari</li> <li>• Connessione dei componenti del sistema</li> </ul>
Formazione in laboratorio	Saggi eseguiti dallo scienziato di Illumina <ul style="list-style-type: none"> <li>• Campioni di plasma artificiali pretestati con caratteristiche delle prestazioni note (forniti da Illumina)</li> <li>• Esecuzione passo-passo del flusso di lavoro del saggio dall'isolamento del plasma al funzionamento dello strumento fino all'analisi dei dati</li> <li>• Formazione sull'analisi dei dati</li> </ul>
Verifica delle competenze in laboratorio	Saggio eseguito dal cliente <ul style="list-style-type: none"> <li>• Campioni di plasma artificiali pretestati con caratteristiche delle prestazioni note (forniti da Illumina)</li> </ul>

## Riepilogo

Il 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 accurati con bassi tassi di fallimento.

## Maggiori informazioni

VeriSeq NIPT Solution v2, [www.illumina.com/VeriSeqNIPT](http://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 cicli	20028870

## Dichiarazione d'uso previsto

Il 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. Il 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.



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

© 2022 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](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-01319 ITA v1.0

## 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).
- 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. doi: 10.15761/OGR.1000157.
- 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.