

VeriSeq™ NIPT Solution v2

Um ensaio de sequenciação
de genoma completo acessível
e total

- Vista abrangente de cromossomas fetais com um menu de teste amplo validado num estudo de precisão clínica de > 2300 amostras
- Desempenho de teste fiável¹ com elevada precisão, resultados rápidos e baixas taxas de falha
- Solução de IVD (In Vitro Diagnostic, diagnóstico in vitro) simples e escalável que consegue analisar 24, 48 ou 96 amostras por ensaio

illumina®

Introdução

O teste pré-natal não invasivo (NIPT, Noninvasive Prenatal Testing) realizado com a sequenciação de nova geração (NGS, Next-Generation Sequencing) fornece resultados de rastreio fiáveis para aneuploidias cromossómicas fetais logo a partir das 10 semanas de gestação — a partir de um único tubo de sangue materno.^{2,3} O VeriSeq NIPT Solution v2 aproveita a potente tecnologia NGS da Illumina para implementar uma abordagem de sequenciação de genoma completo (WGS, Whole-Genome Sequencing) no NIPT, aumentando as opções do menu de teste para incluir aneuploidias comuns (cromossomas 21, 18 e 13), aneuploidias autossómicas raras (RAA, Rare Autosomal Aneuploidies), aneuploidias do cromossoma sexual (SCA, Sex Chromosome Aneuploidies) selecionadas e duplicações e eliminações parciais ≥ 7 Mb.

Ao combinar um menu de teste amplo, resultados precisos e baixas taxas de falha, o VeriSeq NIPT Solution v2 oferece o rastreio abrangente dos cromossomas fetais, permitindo decisões de gestão da gravidez de forma informada e atempada.¹ Ao disponibilizar os reagentes, os instrumentos, o software, a instalação e a formação, o VeriSeq NIPT Solution v2 é uma solução automatizada fiável para o NIPT interno (Figura 1 e Tabela 1).

Vista completa dos cromossomas fetais

Muitas soluções de NIPT nos laboratórios focam-se no rastreio de trissomias nos cromossomas 21, 18 e 13, mas estas condições representam apenas uma porção das anomalias que podem ocorrer. Estes testes não apresentam as duplicações e eliminações parciais ≥ 7 Mb que podem estar associadas a anomalias fetais e ao atraso no desenvolvimento e que apresentam uma taxa positiva de rastreio de 0,12% com o NIPT.⁴ Estes testes também irão ignorar gravidezes que apresentem um teste de rastreio positivo para RAA, que poderão estar associadas a resultados adversos, incluindo aborto, restrição do crescimento intrauterino (RCIU, Intrauterine Growth Restriction), dissomia uniparental (DUP, Uniparental Disomy), parto pré-termo espontâneo e anomalias fetais, entre outros.⁵ A taxa positiva de rastreio combinada para RAA é de 0,34%,⁵ em comparação com 0,30% para trissomia 21.^{6,7}

Table 1: o VeriSeq NIPT Solution v2 em revista

Parâmetro	Descrição
Método	Sequenciação de genoma completo
Preparação da biblioteca	Sem PCR (Polymerase Chain Reaction, reação em cadeia da polimerase)
Química	Sequenciação de extremidades emparelhadas
N.º de amostras	24, 48 ou 96 por ensaio
Tempo até ao relatório	~ 26 horas
N.º de técnicos	1
Espécime	7-10 ml de um tubo único de sangue materno
Análises oferecidas	Estado de aneuploidia de todos os autossomas e cromossomas sexuais; duplicações e eliminações parciais ≥ 7 Mb

Desempenho de teste fiável

Com base na precisão dos resultados, tempo até à obtenção de resposta e taxas de falha, o VeriSeq NIPT Solution v2 demonstra um excelente desempenho.

Precisão elevada

O VeriSeq NIPT Solution v2 foi validado para determinar a precisão e a fiabilidade clínica. As amostras de gravidezes afetadas foram elegíveis para teste se os resultados clínicos estivessem disponíveis e cumprissem os critérios de inclusão de amostras. A coorte incluiu idades gestacionais de pelo menos 10 semanas, amostras com fração fetal baixa e gravidezes de gémeos. O estudo rastreou > 2300 amostras maternas com resultados conhecidos para trissomia 21, trissomia 18, trissomia 13, RAA, duplicações e eliminações parciais ≥ 7 Mb e SCA utilizando o VeriSeq NIPT Solution v2, e comparou os resultados com a verdade de referência clínica. Os resultados demonstraram uma elevada sensibilidade e especificidade para as trissomias comuns, RAA, duplicações e eliminações parciais ≥ 7 Mb, elevada concordância de classificação sexual fetal com resultado clínico, e uma taxa de falha baixa das amostras na primeira passagem de 1,2% (Tabela 2 e Tabela 3).¹



Figura 1: fluxo de trabalho completo do IVD NIPT — o VeriSeq NIPT Solution v2 oferece tudo o que é necessário para o NIPT utilizando NGS, incluindo reagentes para a extração de ADN, preparação da biblioteca e sequenciação; instrumentação para a preparação automatizada da biblioteca e sequenciação com o software de gestão do fluxo de trabalho; um servidor no local para o armazenamento e a análise de dados seguros; e software de análise de dados capaz de gerar um relatório que fornece resultados qualitativos.

Tabela 2: desempenho clínico do VeriSeq NIPT Solution v2¹

	Trissomia 21 ^c	Trissomia 18	Trissomia 13	RAA ^d	Duplicações e eliminações parciais ≥ 7 Mb	Qualquer anomalia ^e
Sensibilidade ^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% bilateral ^b	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 95% bilateral ^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. É comunicado o desempenho de rastreio básico para T21, T18 e T13 e exclui 16 amostras com mosaicos conhecidos e 49 amostras afetadas com anomalias apenas para o rastreio genômico; o desempenho do rastreio genômico é comunicado para RAA e duplicações e eliminações parciais

b. IC com base no método de pontuação de Wilson

c. Sete gravidezes de gêmeos identificadas corretamente como T21 não apresentadas na tabela

d. A RAA exclui os cromossomas 21, 18 e 13

e. Qualquer anomalia inclui amostras de rastreios básicos e genômicos de SCA

Tabela 3: concordância dos resultados de classificação sexual fetal do VeriSeq NIPT Solution v2 com a referência clínica¹

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

Resultados rápidos

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

Tabela 4: VeriSeq NIPT completo em apenas um dia

Passo	Tempo de intervenção	Tempo total
Preparação da amostra e preparação da biblioteca	~ 2 horas	~ 8 horas
Sequenciação	~ 15 min	~ 14 horas
Análise de dados e geração do relatório	N/A	~ 4 horas
Tempo total	~ 2,25 horas	~ 26 horas

O tempo real depende das práticas laboratoriais individuais e pode variar;

N/A, não aplicável

Taxas baixas de falha do teste

As falhas do teste, quando não é possível efetuar qualquer identificação para dissomia ou aneuploidia, são um fator importante na fiabilidade e utilidade clínica do NIPT.

As taxas de falha do teste NIPT variam significativamente com base no teste utilizado. Os testes que utilizam um método de abordagem alvo ou um método polimórfico único demonstram taxas de falha mais elevadas no teste primário do que a NGS.⁸ O VeriSeq NIPT Solution v2 utiliza a WGS para fornecer dados abundantes sobre todos os cromossomas, sem afetar a precisão ou aumentar as taxas de falha ou de falsos positivos. No estudo de validação clínica, a taxa de falha na primeira passagem foi de 1,2%.¹ Na prática laboratorial, existirá plasma suficiente da colheita de sangue inicial para repetir o fluxo de trabalho do VeriSeq NIPT, se necessário.⁹ Demonstrou-se que, na repetição, a taxa de falha primária diminuiu de 2% para 1,3% na mesma amostra.⁹

Solução de IVD simples e escalável

O VeriSeq NIPT Solution v2 integrado fornece tudo o que é necessário para executar o ensaio. O fluxo de trabalho automatizado é aumentado facilmente para analisar 24, 48 ou 96 amostras por ensaio para obter eficiência e flexibilidade na gestão de volumes de amostras. O laboratório pode escolher executar um rastreio básico ou um rastreio da totalidade do genoma, por amostra.

Fluxo de trabalho automatizado

O ensaio VeriSeq NIPT totalmente automatizado fornece um fluxo de trabalho simples que minimiza o tempo de intervenção por parte do técnico e o potencial de erro. O protocolo necessita de 7-10 ml de sangue total periférico materno colhido no tubo de colheita de sangue (BCT, Blood Collect Tube) Streck recomendado. Os VeriSeq NIPT sample prep kits otimizados contêm reagentes e etiquetas para preparar as bibliotecas de sequenciação a partir de ADN livre circulante. O isolamento do plasma, a extração de ADN livre circulante e a preparação de bibliotecas sem PCR, incluindo a criação de placa de quantificação, quantificação da biblioteca e pooling da biblioteca, são automatizados no VeriSeq NIPT Microlab STAR, um sistema Hamilton Microlab STAR configurado de forma personalizada para ser utilizado especificamente no fluxo de trabalho do VeriSeq NIPT. O fácil de utilizar VeriSeq NIPT Workflow Manager controla todos os aspetos da preparação de amostras, incluindo o controlo das amostras.

Sequenciação

Uma amostra de sangue materno contém fragmentos de ADN livre circulante de diferentes tamanhos; os comprimentos mais longos tendem a ser maternos, enquanto os comprimentos mais curtos tendem a ser originários do feto (Figura 2).¹⁰ O VeriSeq NIPT Solution v2 identifica de forma rápida e eficiente os comprimentos de todos os fragmentos de ADN livre circulante numa única amostra e foca a análise no ADN livre circulante mais curto utilizando a sequenciação de extremidades emparelhadas realizada no Illumina NextSeq™ 550Dx System, que revela o poder da NGS de elevada produtividade¹¹ com a acessibilidade de um sistema de bancada (Tabela 5).

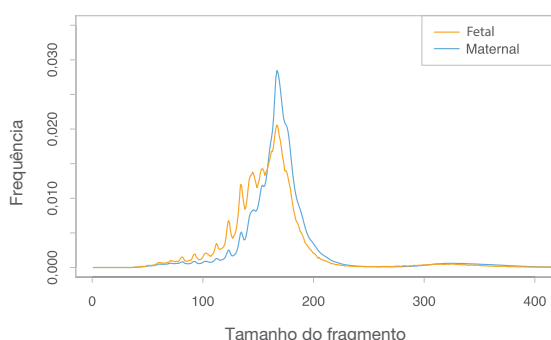


Figura 2: comparação dos tamanhos de fragmentos de ADN livre circulante maternos e fetais — a sequenciação de extremidades emparelhadas distingue os fragmentos de ADN livre circulante com base no tamanho. Os fragmentos mais longos tendem a ser de origem materna, enquanto os fragmentos mais curtos tendem a ser do feto.

Tabela 5: requisitos de desempenho do instrumento de NGS

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

Análise no local

A análise de dados é realizada num VeriSeq v2 Onsite Server dedicado com o IVD VeriSeq NIPT Assay Software v2. O servidor processa automaticamente os dados de sequenciação. É possível colocar vários lotes de amostras em espera para análise num único servidor. Não é necessário enviar os dados para análise, poupando tempo e protegendo a identidade das amostras.

VeriSeq NIPT Assay Software v2

O VeriSeq NIPT Assay Software v2 filtra e alinha as leituras com um genoma de referência. Um algoritmo avançado determina a densidade da leitura por cromossoma (segmento) e auxilia na deteção e diferenciação de aneuploidia e duplicações e eliminações parciais. O software também gera e comunica a estimativa de fração fetal para cada amostra. Os dados de fração fetal são combinados com os dados de cobertura e outros dados estatísticos gerados durante a sequenciação para avaliar o estado de aneuploidia.

Para garantir baixas taxas de falha dos testes, o VeriSeq NIPT Assay Software v2 inclui a métrica de classificação de qualidade de amostras da análise de confiança de aneuploidia fetal individualizada (iFACT, individualized Fetal Aneuploidy Confidence Test). A iFACT indica, tendo em conta a estimativa de fração fetal para cada amostra, se o ensaio gerou uma cobertura de sequenciação suficiente, para permitir uma identificação de aneuploidia ou duplicação e eliminação parcial, mesmo para as amostras com baixa fração fetal.¹² Este limite dinâmico permite ao VeriSeq NIPT Assay Software v2 apresentar dados sobre amostras com baixa fração fetal, resultando em baixas falhas do teste.¹

Geração de relatórios

Após a análise dos dados, o VeriSeq NIPT Assay Software gera um resultado "Aneuploidy Detected" (Aneuploidia detetada) ou "No Aneuploidy Detected" (Nenhuma aneuploidia detetada) para os cromossomas testados em cada amostra.

Se for detetada uma duplicação e eliminação parcial, as coordenadas exatas no genoma são apresentadas no relatório. O resultado das informações é um ficheiro ".CSV" que pode ser integrado com um LIMS (Laboratory Information Management System, sistema de gestão de informação do laboratório) existente. Os dados podem ser utilizados para criar um relatório clínico personalizado.

Implementação totalmente suportada

Para uma integração laboratorial sem percalços, o VeriSeq NIPT Solution v2 inclui a instalação completa do sistema por um Técnico de assistência da Illumina competente e formação prática. Os cientistas experientes da Illumina conduzem o pessoal laboratorial passo a passo na extração da amostra, preparação da biblioteca, sequenciação e análise (Tabela 6). Quando os laboratórios estiverem preparados, é disponibilizado um apoio contínuo por parte da equipa de Suporte Técnico da Illumina.

Tabela 6: formação no VeriSeq NIPT Solution v2

Tópico	Detalhes
Introdução ao VeriSeq NIPT Solution v2	Vista geral tipo seminário 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 utilização de instrumentos	Formação no local <ul style="list-style-type: none"> • Exige o instrumento instalado
Inspeção do local	Confirmação no local <ul style="list-style-type: none"> • Instalação de equipamento auxiliar • Reagentes necessários • Conetividade dos componentes do sistema
Formação no local	Ensaio realizado por cientista da Illumina <ul style="list-style-type: none"> • Amostras de plasma pré-testadas com características de desempenho conhecidas (disponibilizadas pela Illumina) • Acompanhamento do fluxo de trabalho do ensaio desde o isolamento do plasma até à operação do instrumento e análise dos dados • Formação na análise de dados
Teste de competências no local	Ensaio realizado pelo cliente <ul style="list-style-type: none"> • Amostras de plasma pré-testadas com características de desempenho conhecidas (disponibilizadas pela Illumina)

Resumo

O VeriSeq NIPT Solution v2 revoluciona a acessibilidade, a fiabilidade e o poder do NIPT. Agora, os laboratórios podem explorar a NGS para obter resultados de NIPT fiáveis e altamente precisos com baixas taxas de falha.

Saber mais

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

Informações para encomendas

Produto	N.º de catálogo
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
NextSeq 550Dx Instrument	20005715
NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 cycles	20028870

Declaração da utilização prevista

O VeriSeq NIPT Solution v2 é um teste de diagnóstico *in vitro* concebido para realizar o rastreio de deteção de anomalias genómicas fetais genéticas em amostras maternas de sangue periférico total em grávidas com pelo menos 10 semanas de gestação. O VeriSeq NIPT Solution v2 utiliza a sequenciação de genoma completo para detetar duplicações e eliminações parciais em todos os autossomas e estado de aneuploidia em todos os cromossomas. O teste oferece uma opção para reportar uma aneuploidia do cromossoma sexual (SCA). Este produto não pode ser utilizado como a única base de diagnóstico ou de outras decisões de gestão da gravidez.

Referências

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, 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.



1 800 809 4566 número gratuito (EUA) | +1 858 202 4566 tel
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2021 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados. Todas as marcas comerciais são propriedade da Illumina, Inc. ou dos respetivos proprietários. Para informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

M-APJ-00036 POR v2.0