

# VeriSeq™ NIPT Solution v2

Ucelený přístupný rozbor  
sekvenování celého genomu

- Komplexní pohled na chromozomy plodu se širokou nabídkou ověřenou studií klinické přesnosti na více než 2300 vzorcích
- Ověřená účinnost testů<sup>1</sup> s vysokou přesností, rychlými výsledky a nízkou chybovostí
- Jednoduché škálovatelné řešení diagnostiky *in vitro* umožňující analyzovat v každém běhu 24, 48 nebo 96 vzorků

illumina®

## Úvod

Neinvasivní prenatalní testování (NIPT) prováděné pomocí sekvenování nové generace (NGS) poskytuje spolehlivé výsledky vyšetření aneuploidií chromozomů plodu již v 10. týdnu těhotenství, a to z jediné zkumavky krve matky.<sup>2,3</sup> VeriSeq NIPT Solution v2 s využitím výkonné technologie Illumina NGS přináší do NIPT výhody sekvenování celého genomu (WGS) a rozšiřuje možnosti nabídky testů o běžné aneuploidie (chromozomy 21, 18 a 13), vzácné autozomální aneuploidie (RAA), vybrané aneuploidie pohlavních chromozomů (SCA) a částečné delece a duplikace o velikosti  $\geq 7$  Mb.

Kombinací široké nabídky testů, přesných výsledků a nízké chybovosti poskytuje VeriSeq NIPT Solution v2 komplexní vyšetření chromozomů plodu a umožňuje provádět včasné a informované rozhodnutí týkající se řízení těhotenství.<sup>1</sup> VeriSeq NIPT Solution v2, zahrnující reagenty, přístroje, software, instalaci a školení, je automatizovaným spolehlivým řešením pro in-house NIPT (viz Obr. 1 a Tabulka 1).

## Úplný pohled na chromozomy plodu

Řada řešení pro laboratorní NIPT se zaměřuje na vyšetření trizomií u chromozomů 21, 18 a 13, ale tyto stavy představují pouze část možných anomálií. V takových testech budou chybět částečné duplikace a delece větší nebo rovné 7 Mb, které mohou souviset s anomáliemi a opožděným vývojem plodu a mají u NIPT míru pozitivitu 0,12 %.<sup>4</sup> Dále budou v těchto testech chybět těhotenství pozitivní na RAA, které mohou souviset s nepříznivými výsledky včetně například potratu, omezení nitroděložního růstu (IUGR), uniparentální dizomie (UPD), spontánního předčasného porodu a anomálií plodu.<sup>5</sup> Kombinovaná míra pozitivitu na RAA při vyšetření je 0,34 %<sup>5</sup> oproti 0,30 % u trizomie 21.<sup>6,7</sup>

Tabulka 1: VeriSeq NIPT Solution v2 v kostce

Parametr	Popis
Metoda	Sekvenování celého genomu
Příprava knihovny	Bez PCR
Chemie	Sekvenování párových konců
Počet vzorků	24, 48 nebo 96 v jedné dávce
Čas do výkazu	Cca 26 hodin
Počet techniků	1
Vzorek	7–10 ml z jedné zkumavky krve matky
Nabízená analýza	Stav aneuploidie všech autozomů a pohlavních chromozomů; částečné duplikace a delece $\geq 7$ Mb

## Ověřená účinnost testů

Přesností výsledků, dobou reakce a chybovostí představuje VeriSeq NIPT Solution v2 vynikající řešení.

## Vysoká přesnost

Řešení VeriSeq NIPT Solution v2 je ověřeno k určování klinické přesnosti a spolehlivosti. Vzorky z postižených těhotenství byly způsobilé pro testování, pokud byly k dispozici klinické závěry a splňovaly kritéria pro zařazení vzorků. Kohortu tvořila těhotenství o délce alespoň 10 týdnů, vzorky s nízkou fetální frakcí a dvojčetná těhotenství. Při studii bylo pomocí VeriSeq NIPT Solution v2 vyšetřeno více než 2300 vzorků od matek, u nichž byly známy trizomie chromozomu 21, trizomie chromozomu 18, trizomie chromozomu 13, RAA, částečné duplikace a delece  $\geq 7$  Mb a SCA, a výsledky byly porovnány s klinickými referenčními standardními závěry. Výsledky prokázaly vysokou citlivost a specifitu u běžných trizomií, RAA, částečných duplikací a delecí  $\geq 7$  Mb, vysokou shodu s klinickými závěry u klasifikace pohlaví plodu a nízkou chybovost vzorků při prvním průchodu 1,2 % (viz Tabulka 2 a Tabulka 3).<sup>1</sup>



Obr. 1: Celý pracovní postup IVD NIPT – VeriSeq NIPT Solution v2 poskytuje vše, co je potřeba k provedení NIPT pomocí NGS, včetně reagentů pro extrakci DNA, přípravu knihovny a sekvenování, vybavení pro automatizaci přípravy knihovny a sekvenování se softwarem Workflow Manager, lokálního serveru pro bezpečné ukládání a analýzu dat a softwaru pro analýzu dat, který dokáže vygenerovat výkaz s kvalitativními výsledky.

Tabulka 2: Klinická účinnost řešení VeriSeq NIPT Solution v2<sup>1</sup>

	Trizomie chromozomu 21 <sup>c</sup>	Trizomie chromozomu 18	Trizomie chromozomu 13	RAA <sup>d</sup>	Částečné duplikace a delece $\geq 7$ Mb	Jakákoli anomálie <sup>e</sup>
Citlivost <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)
Oboustranný 95% interval spolehlivosti <sup>b</sup>	97,1 %, 100 %	91,4 %, 100 %	87,1 %, 100 %	82,3 %, 99,4 %	55,3 %, 86,8 %	92,7 %, 97,3 %
Specifická	99,90 % (1982/1984)	99,90 % (1995/1997)	99,90 % (2000/2002)	99,80 % (2001/2005)	99,80 % (2000/2004)	99,34 % (1954/1967)
Oboustranný 95% interval spolehlivosti <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. Účinnost základního vyšetření je vykázána pro T21, T18 a T13 a nezahrnuje 16 vzorků se známým mozaicismem a 49 vzorků postižených anomáliemi pouze u celogenomového vyšetření; účinnost celogenomového vyšetření je vykázána pro RAA a částečné duplikace a delece
- b. Interval spolehlivosti založený na Wilsonově metodě hodnocení
- c. V tabulce není uvedeno sedm dvojčetných těhotenství správně vykázaných jako T21
- d. RAA nezahrnuje chromozomy 21, 18 a 13
- e. Každá případná anomálie zahrnuje vzorky ze základního a celogenomového vyšetření SCA

Tabulka 3: Shoda klasifikace pohlaví plodu pomocí VeriSeq NIPT Solution v2 s klinickou referencí<sup>1</sup>

Výsledky VeriSeq NIPT Solution v2	Výsledek fyzického vyšetření novorozence		Cytogenetické výsledky					
	Ženské pohlaví	Mušské pohlaví	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY
Procentní shoda	100 %	100 %	100 %	100 %	90,5 %	100 %	100 %	91,7 %

## Rychlé výsledky

VeriSeq NIPT Solution v2 nabízí pro NIPT rychlý třístupňový pracovní postup, který generuje přesné výsledky již za o něco déle než jeden den (Tabulka 4). Využitím jednoduchého automatizovaného pracovního postupu může jeden technik analyzovat 24–96 vzorků za méně než 8 hodin s minimálním hands-on time. Cílené sekvenování a čipové metody mívají delší laboratorní protokoly, což vyžaduje více pracovního času.

Tabulka 4: NIPT VeriSeq trvá o něco málo déle než jeden den

Krok	Pracovní čas	Celkový čas
Příprava vzorků a knihovny	Cca 2 hodiny	Cca 8 hodin
Sekvenování	Cca 15 minut	Cca 14 hodin
Analýza dat a generování výkazu	N/A	Cca 4 hodiny
Celkový čas	Cca 2,25 hodiny	Cca 26 hodin

Skutečné časy závisí na praxi jednotlivých laboratoří a mohou se lišit.  
N/A = nepoužívá se.

## Nízká chybovost testů

Pokud nelze provést přiřazení žádné dizomie nebo aneuploidie, je chybovost testů důležitým faktorem spolehlivosti a klinické využitelnosti NIPT. Podle použitého testu se chybovost testů NIPT výrazně liší. Testy používající cílený přístup nebo metodu jednoho polymorfismu vykazují vyšší chybovost primárních testů než NGS.<sup>8</sup> VeriSeq NIPT Solution v2, využívající sekvenování celého genomu (WGS) poskytuje dostatek dat ze všech chromozomů, aniž by to mělo vliv na přesnost nebo zvýšení chybovosti či falešné positivity. V ověřovací klinické studii byla chybovost při prvním průchodu 1,2 %.<sup>1</sup> V laboratorní praxi bude k dispozici dostatek plazmy z prvního odběru krve, aby se pracovní postup VeriSeq NIPT mohl v případě potřeby zopakovat.<sup>9</sup> Bylo prokázáno, že při opakování poklesla primární chybovost ve stejném vzorku z 2 % na 1,3 %.<sup>9</sup>

## Jednoduché a škálovatelné řešení IVD

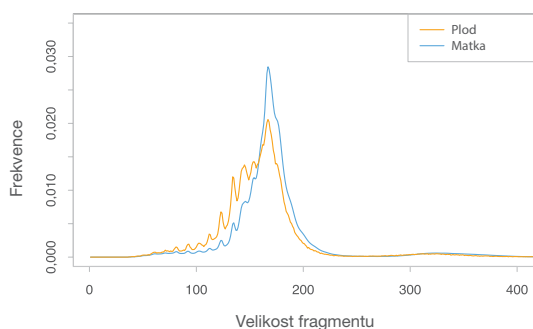
Integrované řešení VeriSeq NIPT Solution v2 poskytuje vše, co je potřeba k provedení rozboru. Automatizovaný pracovní postup se snadno škáluje na analýzu 24, 48 nebo 96 vzorků v jednom běhu, což umožňuje efektivitu a flexibilitu při správě objemů vzorků. Laboratoř se může u každého vzorku rozhodnout, jestli provede základní, nebo celogenomové vyšetření.

## Automatizovaný pracovní postup

Plně automatizovaný rozbor VeriSeq NIPT poskytuje jednoduchý pracovní postup, který minimalizuje pracovní čas technika a potenciál k chybě. Protokol vyžaduje 7–10 ml periferní plné krve matky, odebrané do zkumavky Streck Blood Collect Tube (BCT). Optimalizované sady pro přípravu vzorků VeriSeq NIPT obsahují reagentie a štítky pro přípravu sekvenačních knihoven z cfDNA. Izolace plazmy, extrakce cfDNA a příprava knihovny bez PCR, včetně tvorby kvantifikačních desek, kvantifikace knihovny a vyváření fondů knihoven jsou automatizovány v systému VeriSeq NIPT Microlab STAR, což je systém Hamilton Microlab STAR speciálně zákaznický konfigurovaný pro použití v pracovním postupu VeriSeq NIPT. Všechny aspekty přípravy vzorků včetně jejich sledování řídí uživatelsky přívětivý nástroj VeriSeq NIPT Workflow Manager.

## Sekvenování

Vzorek krve matky obsahuje fragmenty cfDNA různých délek; delší bývají mateřské, kratší obvykle pocházejí z plodu (viz Obr. 2).<sup>10</sup> VeriSeq NIPT Solution v2 rychle a efektivně identifikuje délku všech fragmentů cfDNA v jednom vzorku a zaměří analýzu na kratší cfDNA pomocí sekvenování párových konců prováděného v systému Illumina NextSeq™ 550Dx, který se vyznačuje vlastnostmi vysoce výkonného NGS<sup>11</sup> a zároveň dostupností běžného stolního systému (viz Tabulka 5).



Obr. 2: Porovnání velikostí fragmentů cfDNA matky a plodu – Sekvenování párových konců rozlišuje fragmenty cfDNA na základě velikosti. Delší fragmenty mívají původ u matky, kratší obvykle pocházejí od plodu.

Tabulka 5: Výkonnostní požadavky na přístroj NGS

Parametr	Specifikace
Délka čtení	2 × 36 bp
Typ souboru sekvenování	.BCL
Výstup sekvenování	400 milionů čtení
Doba běhu	Cca 14 hodin
Multiplexování	24 nebo 48 vzorků v každém běhu

## Analýza na místě

Analýza dat je prováděna na vyhrazeném serveru VeriSeq v2 Onsite Server vybaveném softwarem IVD VeriSeq NIPT Assay Software v2. Server zpracovává data sekvenování automaticky. Více dávek vzorků se může pro analýzu na jednom serveru zařadit do fronty. Data není potřeba k analýze nikam posílat, což šetří čas a chrání identitu vzorků.

## VeriSeq NIPT Assay Software v2

VeriSeq NIPT Assay Software v2 filtruje a zarovnává čtení podle referenčního genomu. Pokročilý algoritmus určuje hustotu čtení pro každý chromozom (segment) a pomáhá při detekci a rozlišování aneuploidí a částečných duplikací a delecí. Software také pro každý vzorek generuje a vykazuje odhad fetální frakce. Údaje fetální frakce jsou zkombinovány s pokrytím a dalšími statistickými vstupy vygenerovanými během sekvenování a je vyhodnocen stav aneuploidie.

Pro zajištění nízké chybovosti testů obsahuje VeriSeq NIPT Assay Software v2 metriku hodnocení kvality vzorku pomocí individualizované zkoušky iFACT (individualized Fetal Aneuploidy Confidence Test). Zkouška iFACT určuje, jestli rozbor vygeneroval dostatečné pokrytí sekvenování vzhledem k odhadu fetální frakce pro každý vzorek, aby bylo možné provést přiřazení aneuploidie nebo částečné duplikace a delece, a to i pro vzorky s nízkou fetální frakcí.<sup>12</sup> Tato dynamická mezní hodnota umožňuje softwaru VeriSeq NIPT Assay Software v2 vykázat vzorky s nízkou fetální frakcí, což vede k nízké chybovosti testů.<sup>1</sup>

## Generování výkazu

Po analýze dat vygeneruje VeriSeq NIPT Assay Software pro chromozomy testované v jednotlivých vzorcích výsledek „Aneuploidy Detected“ (Zjištěna aneuploidie) nebo „No Aneuploidy Detected“ (Aneuploidie nezjištěna). Pokud je zjištěna částečná delece a duplikace, zobrazí se ve výkazu přesné souřadnice v genomu. Výstupem informací je soubor „.CSV“, který lze integrovat se stávajícím LIMS. Data lze použít k vytvoření přizpůsobené klinické zprávy.

## Plně podporovaná implementace

Pro snadnou integraci v laboratoři je součástí řešení VeriSeq NIPT Solution v2 kompletní instalace systému kvalifikovaným servisním technikem společnosti Illumina a školení na místě. Fundovaní odborníci společnosti Illumina vysvětlí personálu laboratoře krok za krokem extrakci vzorků, přípravu knihovny, sekvenování a analýzu (viz Tabulka 6). Až se práce v laboratoři rozběhne, tým technické podpory společnosti Illumina jí bude nadále poskytovat podporu.

Tabulka 6: Školení VeriSeq NIPT Solution v2

Téma	Podrobnosti
Úvod do řešení VeriSeq NIPT Solution v2	Seminář: přehled pracovního postupu a analýzy <ul style="list-style-type: none"> <li>• Průvodce pomocným vybavením</li> <li>• Průvodce spotřebním materiálem</li> <li>• Protokol odběru krve</li> <li>• Protokol izolace plazmy</li> </ul>
Školení obsluhy přístrojů	Školení na místě <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vyžaduje nainstalovaný přístroj</li> </ul>
Kontrola pracoviště	Ověření pracoviště <ul style="list-style-type: none"> <li>• Instalace pomocného vybavení</li> <li>• Potřebné reagenty</li> <li>• Připojení součástí systému</li> </ul>
Školení na místě	Rozbor provedený odborníkem společnosti Illumina <ul style="list-style-type: none"> <li>• Předem otestované vzorky plazmy se známými charakteristikami (poskytne Illumina)</li> <li>• Průvodce pracovním postupem rozboru od izolace plazmy přes obsluhu přístrojů k analýze dat</li> <li>• Školení analýzy dat</li> </ul>
Zkouška způsobilosti na místě	Rozbor provedený zákazníkem <ul style="list-style-type: none"> <li>• Předem otestované vzorky plazmy se známými charakteristikami (poskytne Illumina)</li> </ul>

## Shrnutí

VeriSeq NIPT Solution v2 přináší průlom do dostupnosti, spolehlivosti a výkonnosti NIPT. Laboratoře teď mohou využít NGS k rychlému získání spolehlivých a vysoce přesných výsledků NIPT s nízkou chybovostí.

## Další informace

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

## Údaje pro objednání

Produkt	Katalogové číslo
Sada pro přípravu vzorků VeriSeq NIPT (24 vzorků)	20025895
Sada pro přípravu vzorků VeriSeq NIPT (48 vzorků)	15066801
Sada pro přípravu vzorků VeriSeq NIPT (96 vzorků)	15066802
VeriSeq NIPT Assay Software v2	20047024
VeriSeq Onsite Server v2	20028403 20047000
Zkumavka Streck Cell-Free DNA BCT (CE)	15073345
Přístroj NextSeq 550Dx	20005715
Sada reagentů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 cyklů	20028870

## Prohlášení o zamýšleném použití

VeriSeq NIPT Solution v2 je diagnostický test *in vitro* určený k vyšetření za účelem zjištění celogenomových genetických anomálií plodu ze vzorků periferní plné krve matky v nejméně 10. týdnu těhotenství. Pomocí sekvenování celého genomu zjišťuje VeriSeq NIPT Solution v2 částečné duplikace a delece u všech autozomů a stav aneuploidie u všech chromozomů. Test nabízí možnost požádat o hlášení aneuploidii pohlavního chromozomu (SCA). Tento produkt se nesmí používat jako jediný základ pro diagnostiku a další rozhodnutí týkající se řízení těhotenství.

## Literatura

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*. Londýn, Velká Británie: 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®

Bezplatná linka (USA) 1 800 809 4566 | Tel. +1 858 202 4566  
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2021 Illumina, Inc. Všechna práva vyhrazena. Všechny ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. nebo jejich příslušných vlastníků. Informace o konkrétních ochranných známkách naleznete na adrese [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
 M-APJ-00036 CZE v2.0