

# 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 přesnými, 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 u všech autozomů.

Díky kombinaci široké nabídky testů, přesných výsledků a nízké chybovosti nabízí řešení VeriSeq NIPT Solution v2 nejkomplexnější vyšetření fetálního genomu, a umožňuje tak informovanou a včasnou rozhodnutí týkající se těhotenství.<sup>1</sup> Díky poskytnutí reagentů, přístrojů, softwaru, instalace a školení představuje řešení VeriSeq NIPT Solution v2 automatizované a spolehlivé řešení pro provádění vlastního NIPT (viz [Obrázek 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 těchto testech budou chybět částečné duplikace a delece o velikosti  $\geq 7$  Mb, které mohou být spojeny s anomáliemi nebo opožděním vývoje plodu, a míra pozitivit vyšetření u NIPT je 0,12 %.<sup>4</sup> Dále budou v těchto testech chybět těhotenství s vyšetřením pozitivním na RAA, které mohou mít nežádoucí důsledky včetně potratu, intrauterinního zpomalení růstu (IUGR), uniparentální dizomie (UPD), spontánního předčasného porodu, anomálií plodu a dalších.<sup>5</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	~ 26 h
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 o velikosti $\geq 7$ Mb u všech autozomů

## Ověřená účinnost testů

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

## Přesné výsledky

Řešení VeriSeq NIPT Solution v2 je ověřeno k určování klinické přesnosti a spolehlivosti. Ověřovací klinická studie byla provedena se vzorky z postižených těhotenství, které 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 o velikosti  $\geq 7$  Mb u všech autozomů a SCA, a výsledky byly porovnány s klinickými referenčními standardními závěry.



Obrázek 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 ≥ 7 Mb	Libovolná 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	Mužské pohlaví	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY
Procentní shoda	100 %	100 %	100 %	100 %	90,5 %	100 %	100 %	91,7 %

Výsledky prokázaly vysokou citlivost a specifitu u běžných trizomií, RAA, částečných duplikací a delecí o velikosti ≥ 7 Mb u všech autozomů, 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>

## Rychlé výsledky

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

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

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

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, které používají cílený přístup nebo jednu polymorfni metodu, vykazují vyšší chybovost primárního testu než NGS.<sup>6</sup> Řešení VeriSeq NIPT Solution v2 zajišťuje pomocí WGS dostatek dat ze všech chromozomů, aniž by došlo k ovlivnění přesnosti nebo zvýšení chybovosti či množství falešně pozitivních výsledků. V rámci ověřovací klinické studie byla chybovost při prvním průchodu 1,2 %.<sup>1</sup> V laboratorní praxi bude z počátečního odběru krve k dispozici dostatečné množství plazmy pro případné opakování pracovního postupu VeriSeq NIPT.<sup>7</sup> V rámci ověřovací klinické studie bylo zjištěno, že naše výsledná chybovost při druhém odběru krve byla 0,4 %.<sup>7</sup>

## Jednoduché a škálovatelné řešení IVD

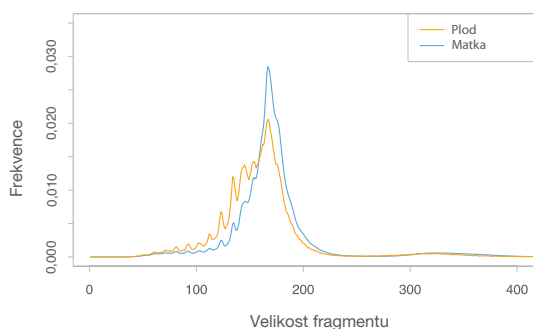
Integrované řešení VeriSeq NIPT Solution v2 poskytuje vše, co je potřeba k provedení rozboru. Automatizovaný pracovní postup se snadno škáluje na analýzu 24, 48 nebo 96 vzorků v jednom běhu, což umožňuje efektivitu a flexibilitu při správě objemů vzorků. Laboratoř se může u každého vzorku rozhodnout, 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 plně 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 čtení jsou obohacena o DNA matky, zatímco kratší čtení jsou obohacena o DNA plodu (viz [Obrázek 2](#)).<sup>8</sup> VeriSeq NIPT Solution v2 rychle a efektivně identifikuje délky všech fragmentů cfDNA v rámci jednoho vzorku a v algoritmu analýzy klade větší důraz na kratší cfDNA pomocí párového sekvenování prováděného na systému Illumina NextSeq™ 550Dx, která spojuje účinnost vysoce výkonného NGS<sup>9</sup> a dostupnost stolního systému (viz [Tabulka 5](#)).



Obrázek 2: Porovnání velikostí fragmentů cfDNA matky a plodu – Sekvenování párových konců rozlišuje fragmenty cfDNA na základě velikosti. Delší fragmenty jsou obohaceny o DNA matky, zatímco kratší fragmenty jsou obohaceny o DNA plodu.

Tabulka 5: Požadavky na výkon přístroje pro NGS

Parametr	Specifikace
Délka čtení	2 × 36 bázových párů
Typ souboru sekvenování	.BCL
Výstupní data sekvenování	~ 400 milionů čtení
Doba běhu	~ 14 h
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 (bin) a pomáhá při detekci a rozlišování aneuploidii 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 delecí, a to i pro vzorky s nízkou fetální frakcí.<sup>10</sup> Tato dynamická mezní hodnota umožňuje softwaru VeriSeq NIPT Assay Software v2 hlásit vzorky s nízkou fetální frakcí, což zajišťuje nízkou chybovost testu.<sup>1</sup>

## Generování výkazu

Po analýze dat vygeneruje VeriSeq NIPT Assay Software pro chromozomy testované v jednotlivých vzorcích výsledky „Aneuploidy Detected“ (Zjištěna aneuploidie) nebo „No Aneuploidy Detected“ (Aneuploidie nezjištěna). Pokud je zjištěna částečná delece nebo duplikace, zobrazí se ve výkazu přesné souřadnice v genomu. Výstupem informací je soubor „.tab“, 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 reagencie</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 umělé 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 umělé plazmy se známými charakteristikami (poskytne Illumina)</li> </ul>

## Shrnutí

VeriSeq NIPT Solution v2 přináší revoluční změnu z hlediska dostupnosti, spolehlivosti a výkonnosti NIPT. Laboratoře teď mohou využít NGS k rychlému získání spolehlivých a 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
NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit verze 2.5, 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 zažádat o hlášení aneuploidíí 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, Spojené království: 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. Yaron Y. [The implications of non-invasive prenatal testing failures: a review of an under-discussed phenomenon](#). *Prenat Diagn*. 2016;36:391-396.
7. 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.
8. 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.
9. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. [Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry](#). *Nature*. 2008;456(7218):53-59.
10. 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.



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

© 2022 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-GL-01319 CZE v1.0