

VeriSeq™ NIPT Solution v2

Kompleksowy, przystępny
test do sekwencjonowania
całego genomu

- Całościowy obraz chromosomów płodu dzięki szerokiemu menu testów zatwierdzonemu w badaniu dokładności klinicznej, które obejmowało >2300 próbek.
- Niezawodne działanie testu¹ przy dokładnych wynikach i niskich wskaźnikach niepowodzeń.
- Proste, skalowalne rozwiązanie do diagnostyki *in vitro*, które może analizować 24, 48 lub 96 próbek na przebieg.



Wstęp

Nieinwazyjne badania prenatalne (NIPT, Noninvasive Prenatal Testing) wykonywane metodą sekwencjonowania nowej generacji (NGS, Next-Generation Sequencing) zapewniają wiarygodne wyniki badań przesiewowych wykonywanych pod kątem aneuploidii chromosomów płodu już od 10. tygodnia ciąży – z użyciem pojedynczej próbki krwi matki^{2,3}. W rozwiązaniu VeriSeq NIPT Solution v2 zastosowano zaawansowaną technologię NGS firmy Illumina, aby możliwości, jakie daje sekwencjonowanie całego genomu (WGS, Whole-Genome Sequencing), mogły być wykorzystane w testach NIPT poprzez rozszerzenie opcji w menu testów o najczęstsze aneuploidie (chromosomy 21, 18 i 13), rzadkie aneuploidie autosomalne (RAA, Rare Autosomal Aneuploidies), wybrane aneuploidie chromosomów płci (SCA, Sex Chromosome Aneuploidies) oraz częściowe duplikacje i delecje ≥ 7 Mb we wszystkich autosomach.

Połączenie szerokiego menu testów, dokładnych wyników i niskich wskaźników niepowodzeń sprawia, że rozwiązanie VeriSeq NIPT Solution v2 pozwala wykonywać kompleksowe badania przesiewowe chromosomów płodu, dzięki czemu umożliwia podejmowanie we właściwym czasie świadomych decyzji dotyczących prowadzenia ciąży¹. Rozwiązanie VeriSeq NIPT Solution v2 to zautomatyzowane, niezawodne rozwiązanie do badań NIPT przeprowadzanych w laboratorium obejmujące odczynniki, przyrządy, oprogramowanie, usługę instalacji oraz szkolenie (rysunek 1 i tabela 1).

Pełny obraz chromosomów płodu

Wiele rozwiązań do wykonywania testów NIPT w laboratorium koncentruje się na testach przesiewowych w kierunku trisomii chromosomów 21, 18 i 13, ale takie aberracje stanowią tylko część anomalii, które mogą występować. Rozwiązania te pomijają częściowe duplikacje i delecje ≥ 7 Mb, które mogą być powiązane z anomalią płodu i opóźnieniem w rozwoju, a przesiewowe testy NIPT wykonywane w kierunku takich aberracji dają 0,12% wyników dodatnich⁴. Takie testy przesiewowe pomijają również cięższe z dodatnimi wynikami rzadkich

aneuploidii autosomalnych (RAA), które mogą być powiązane z niepożądanymi skutkami, takimi jak poronienie, wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu płodu (IUGR, Intrauterine Growth Restriction), dysomia jednorodzielska (UPD, uniparental disomy), spontaniczny poród przedwczesny i anomalie płodu⁵.

Tabela 1: Skrót informacji o rozwiązaniu VeriSeq NIPT Solution v2

Parametr	Opis
Metoda	Sekwencjonowanie całego genomu
Przygotowanie biblioteki	Bez użycia PCR
Reakcja chemiczna	Sekwencjonowanie w trybie sparowanych końców
Liczba próbek	24, 48 lub 96 na partię
Czas do uzyskania raportu	~ 26 godzin
Liczba techników	1
Próbka	7–10 ml z pojedynczej próbki krwi matki
Oferowana analiza	Stan aneuploidii we wszystkich autosomach i chromosomach płci; częściowe duplikacje i delecje ≥ 7 Mb we wszystkich autosomach

Niezawodne działanie testu

Na podstawie dokładności wyników, czasu do uzyskania odpowiedzi oraz wskaźników niepowodzeń można stwierdzić, że rozwiązanie VeriSeq NIPT Solution v2 wykazuje doskonałe działanie.

Dokładne wyniki

Rozwiązanie VeriSeq NIPT Solution v2 zostało poddane walidacji celem określenia jego dokładności klinicznej i niezawodności. Przeprowadzono kliniczne badanie walidacyjne z użyciem próbek pochodzących z ciąży, w których wykryto aberracje,



Rysunek 1. Pełny przebieg procedury wykonania nieinwazyjnych badań prenatalnych w ramach diagnostyki *in vitro* – rozwiązanie VeriSeq NIPT Solution v2 zawiera wszystko, co jest potrzebne do wykonania testów NIPT metodą NGS, w tym odczynniki do ekstrakcji DNA, przygotowania biblioteki i sekwencjonowania; wyposażenie do automatyzacji przygotowania biblioteki i sekwencjonowania przy użyciu oprogramowania Workflow Manager; serwer lokalny do bezpiecznego przechowywania i analizowania danych oraz oprogramowanie do analizy danych z funkcją generowania raportu zawierającego wyniki jakościowe.

Tabela 2. Skuteczność kliniczna rozwiązania VeriSeq NIPT Solution v2¹

	Trisomia 21 ^c	Trisomia 18	Trisomia 13	RAA ^d	Częściowe duplikacje i delecje ≥ 7 Mb	Dowolna anomalia ^e
Czułość ^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)
Dwustronny 95% CI ^b	97,1%; 100%	91,4%; 100%	87,1%; 100%	82,3%; 99,4%	55,3%; 86,8%	92,7%; 97,3%
Swoistość	99,90% (1982/1984)	99,90% (1995/1997)	99,90% (2000/2002)	99,80% (2001/2005)	99,80% (2000/2004)	99,34% (1954/1967)
Dwustronny 95% CI ^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. Wyniki podstawowych badań przesiewowych są zgłaszane w odniesieniu do T21, T18 i T13 i nie obejmują 16 próbek ze stwierdzonym mozaicyzmem ani 49 próbek z anomaliaми, które są uwzględniane tylko przez badania przesiewowe dotyczące całego genomu; wyniki badań przesiewowych całego genomu są zgłaszane w odniesieniu do RAA oraz częściowych duplikacji i delecji.

b. Przedział ufności na podstawie wzoru Wilsona.

c. W tabeli nie przedstawiono siedmiu ciężych bliźniaczy, w których prawidłowo wykryto status T21.

d. RAA nie dotyczy chromosomów 21, 18 ani 13.

e. Dowolna anomalia obejmuje próbki z SCA z podstawowych badań przesiewowych i badań przesiewowych dotyczących całego genomu.

Tabela 3. Zgodność wyników klasyfikacji płci płodu z rozwiązaniem VeriSeq NIPT Solution v2 ze standardem klinicznym¹

Wyniki z rozwiązania VeriSeq NIPT Solution v2	Wynik z badania fizykalnego noworodka		Wyniki cytogenetyczne					
	Kobieta	Mężczyzna	XX	XY	XO	XXX	XXY	XXY
Procentowa zgodność	100%	100%	100%	100%	90,5%	100%	100%	91,7%

a które kwalifikowano do badania, jeśli dostępne były wyniki kliniczne i spełnione zostały kryteria włączenia. Kohorta obejmowała ciężę w co najmniej 10. tygodniu, próbki o niskiej frakcji płodowej oraz ciężę bliźniacze. W badaniu poddano testom przesiewowym >2300 próbek pobranych od matek, które miały znane wyniki dotyczące trisomii chromosomu 21, trisomii chromosomu 18, trisomii chromosomu 13, RAA, częściowych duplikacji i delecji ≥ 7 Mb we wszystkich autosomach oraz SCA – do wykonania testu użyto rozwiązania VeriSeq NIPT Solution v2, a następnie porównano wyniki z potwierdzonymi wynikami klinicznymi. Wyniki wykazały wysoką czułość i swoistość omawianego rozwiązania w przypadku często występujących trisomii, RAA, częściowych duplikacji i delecji ≥ 7 Mb we wszystkich autosomach oraz wysoką zgodność klasyfikacji płci płodu z wynikami klinicznymi, a także niski odsetek niepowodzeń próbki przy pierwszym przebiegu wynoszący 1,2% (tabela 2 i tabela 3)¹.

Szybkie uzyskiwanie wyników

Działanie rozwiązania VeriSeq NIPT Solution v2 odbywa się z użyciem szybkiej, trzyetapowej procedury nieinwazyjnych badań prenatalnych (NIPT), która generuje dokładne wyniki w czasie nieznacznie dłuższym niż jedna doba (tabela 4). Korzystając z tej prostej, zautomatyzowanej procedury, jeden technik może przeanalizować od 24 do 96 próbek w czasie <8 godzin przy minimalnym nakładzie poświęcanego czasu. Protokoły sekwencjonowania ukierunkowanego oraz sekwencjonowania z wykorzystaniem mikromacierzy są zazwyczaj dłuższe i wymagają od personelu większego nakładu pracy.

Tabela 4. Oznaczenia z użyciem rozwiązania VeriSeq NIPT ukończone w czasie niewiele dłuższym niż jedna doba

Etap	Czas poświęcony przez personel	Łączny czas
Przygotowanie próbki i biblioteki	~ 2 godziny	~ 8 godzin
Sekwencjonowanie	~ 15 min	~ 14 godzin
Analiza danych i generowanie raportu	nd.	~ 4 godziny
Łączny czas	~ 2,25 godziny	~ 26 godzin

Rzeczywisty czas jest zależny od praktyk obowiązujących w konkretnym laboratorium i może być różny; nd. – nie dotyczy.

Niski odsetek niepowodzeń testu

Niepowodzenia testu polegające na tym, że nie następuje rozpoznanie disomii lub aneuploidii, stanowią istotny czynnik dotyczący niezawodności oraz użyteczności klinicznej testów NIPT. Odsetek niepowodzeń testów NIPT różni się znacząco w zależności od używanego testu. Testy, w których stosowane jest podejście ukierunkowane lub metoda wykrywania polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, cechują się wyższymi odsetkami niepowodzeń pierwszego testu niż sekwencjonowanie nowej generacji (NGS)⁶. Rozwiązanie VeriSeq NIPT Solution v2 wykorzystuje sekwencjonowanie całego genomu (WGS),

aby zapewnić dostatecznie dużo danych dotyczących wszystkich chromosomów bez obniżania dokładności i bez zwiększania odsetka niepowodzeń ani wyników fałszywie dodatnich. W klinicznym badaniu walidacyjnym odsetek niepowodzeń przy pierwszym przebiegu wyniósł 1,2%¹. Jeśli zajdzie taka potrzeba, w laboratorium dostępna będzie wystarczająca ilość osocza z początkowego pobrania krwi celem powtórzenia przebiegu procedury z użyciem rozwiązania VeriSeq NIPT⁷. Podczas klinicznego badania walidacyjnego zaobserwowano, że uzyskany przez nas odsetek ostatecznego niepowodzenia po drugim pobraniu krwi wyniósł 0,4%⁷.

Proste, skalowalne rozwiązanie do diagnostyki *in vitro*

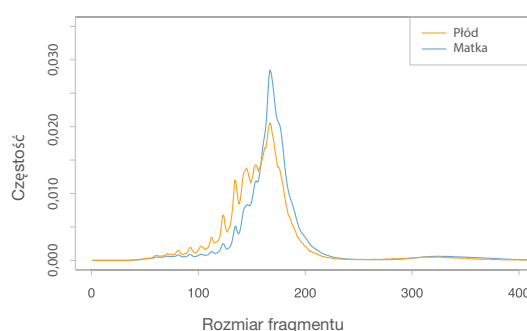
Zintegrowane rozwiązanie VeriSeq NIPT Solution v2 obejmuje wszystko, co jest potrzebne do wykonania oznaczenia. Zautomatyzowany przebieg procesu można łatwo skalować, aby analizować 24, 48 lub 96 próbek na przebieg, dzięki czemu możliwe jest wydajne i elastyczne zarządzanie objętościami próbek. Laboratorium może wybrać – w odniesieniu do każdej próbki, czy zostaną wykonane testy przesiewowe podstawowe, czy dotyczące całego genomu.

Zautomatyzowana procedura

W pełni zautomatyzowane oznaczenie wykonywane z użyciem rozwiązania VeriSeq NIPT obejmuje prostą procedurę, która minimalizuje czas poświęcany przez technika oraz ryzyko błędów. Protokół wymaga 7–10 ml pełnej krwi obwodowej matki pobranej do zalecanej probówki do pobierania krwi (BCT, Blood Collect Tube) firmy Streck. Zoptymalizowane zestawy do przygotowania próbek, dostępne z użyciem rozwiązania VeriSeq NIPT, zawierają odczynniki i etykiety przeznaczone do przygotowywania bibliotek sekwencjonowania z cfDNA. Izolacja osocza, ekstrakcja cfDNA oraz przygotowanie biblioteki bez użycia PCR wraz z utworzeniem płytki do kwantyfikacji, kwantyfikacja biblioteki oraz pulowanie biblioteki – wszystkie te czynności są wykonywane automatycznie na platformie VeriSeq NIPT Microlab STAR, która jest systemem Hamilton Microlab STAR niestandardowo skonfigurowanym na potrzeby użycia w przebiegu pracy rozwiązania VeriSeq NIPT. Łatwe w obsłudze oprogramowanie VeriSeq NIPT Workflow Manager kontroluje wszystkie aspekty przygotowania próbki, w tym także śledzenie próbek.

Sekwencjonowanie

Próbka krwi pobrana od matki zawiera fragmenty cfDNA różnych długości; dłuższe fragmenty są wzbogacane w przypadku DNA matki, a krótsze są wzbogacane w przypadku DNA płodu (**rysunek 2**)⁸. Rozwiązanie VeriSeq NIPT Solution v2 szybko i wydajnie rozpoznaje długości wszystkich fragmentów cfDNA w pojedynczej próbce, po czym w algorytmie analizy stosuje większą wagę względem krótszych fragmentów cfDNA, stosując sekwencjonowanie w trybie sparowanych końców wykonywane w systemie Illumina NextSeq™ 550Dx System, który łączy wysoką wydajność rozwiązania do NGS⁹ z przystępnością cenową systemu stołowego (**tabela 5**).



Rysunek 2. Porównanie rozmiarów fragmentów cfDNA matki i płodu – sekwencjonowanie w trybie sparowanych końców odróżnia fragmenty cfDNA na podstawie ich rozmiarów. Dłuższe fragmenty są wzbogacane w przypadku DNA matki, a krótsze są wzbogacane w przypadku DNA płodu.

Tabela 5. Wymagania dotyczące wydajności urządzenia do metody NGS

Parametr	Specyfikacja
Długość odczytu	2 × 36 bp
Typ pliku sekwencjonowania	Plik .BCL
Dane wyjściowe sekwencjonowania	~ 400 mln odczytów
Czas przebiegu	~ 14 godzin
Multipleksowanie	24 lub 48 próbek na przebieg

Analiza w placówce

Analiza danych jest wykonywana na dedykowanym serwerze VeriSeq v2 Onsite Server przy użyciu oprogramowania IVD VeriSeq NIPT Assay Software v2. Serwer automatycznie przetwarza dane sekwencjonowania. Na pojedynczym serwerze można ustawić kolejkę wielu partii próbek. Nie ma potrzeby wysyłania danych do analizy, co oszczędza czas i chroni tożsamość próbek.

VeriSeq NIPT Assay Software v2

Oprogramowanie VeriSeq NIPT Assay Software v2 filtruje i dopasowuje odczyty do genomu referencyjnego. Zaawansowany algorytm określa gęstość odczytu na chromosom (silos) oraz wspomaga wykrywanie i odróżnianie aneuploidii oraz częściowych duplikacji i delecji. Oprogramowanie generuje także i raportuje szacowaną frakcję płodową dla każdej próbki. Dane dotyczące frakcji płodowej są łączone z danymi dotyczącymi pokrycia oraz innymi wejściowymi danymi statystycznymi, które są generowane podczas sekwencjonowania w celu oceny stanu aneuploidii.

Aby osiągnąć niski odsetek niepowodzeń testów, oprogramowanie VeriSeq NIPT Assay Software v2 uwzględnia zindywidualizowany test pewności aneuploidii płodu (iFACT, individualized Fetal Aneuploidy Confidence Test), który jest metryką służącą do oceny jakości próbki. Test iFACT wskazuje, czy oznaczenie wygenerowało wystarczające pokrycie sekwencjonowania, przy uwzględnieniu oszacowania frakcji płodowej dla każdej próbki, aby umożliwić rozpoznanie aneuploidii lub częściowej duplikacji i delecji, nawet w przypadku próbek o niskiej frakcji płodowej¹⁰. Taka dynamiczna wartość odcięcia umożliwia oprogramowaniu VeriSeq NIPT Assay Software v2 zgłaszanie próbek z niską frakcją płodową, co skutkuje obniżeniem odsetka niepowodzeń testu¹.

Generowanie raportu

Po analizie danych oprogramowanie VeriSeq NIPT Assay Software generuje wynik „Aneuploidy Detected” (Wykryto aneuploidię) lub „No Aneuploidy Detected” (Nie wykryto aneuploidii) w odniesieniu do chromosomów testowanych w każdej próbce. W przypadku wykrycia częściowej delecji lub duplikacji w raporcie udostępniane są dokładne współrzędne takiej aberracji w genomie. Dane wynikowe są generowane w postaci pliku o rozszerzeniu „.tab”, który można zintegrować z istniejącym systemem LIMS. Tych danych można użyć w celu utworzenia niestandardowego raportu klinicznego.

Pełne wsparcie wdrożenia

Na potrzeby bezproblemowej integracji z laboratorium oprogramowanie VeriSeq NIPT Solution v2 jest oferowane z kompletną instalacją systemu przez wykwalifikowanego terenowego pracownika serwisu firmy Illumina oraz ze szkoleniem praktycznym. Posiadający odpowiednią wiedzę specjaliści z firmy Illumina prowadzą personel laboratorium krok po kroku przez ekstrakcję próbki, przygotowanie biblioteki, sekwencjonowanie oraz analizę (tabela 6). Laboratorium, które zacznie korzystać z opisywanych rozwiązań, otrzymuje ciągłe wsparcie zespołu Pomocy technicznej firmy Illumina.

Tabela 6. Szkolenie z rozwiązania VeriSeq NIPT Solution v2

Zagadnienie	Szczegóły
Wprowadzenie do rozwiązania VeriSeq NIPT Solution v2	Przegląd informacji o procedurze i analizie (seminarium) <ul style="list-style-type: none"> Przewodnik po sprzęcie pomocniczym Przewodnik po materiałach eksploatacyjnych Protokół pobierania krwi Protokół izolacji osocza
Szkolenie z obsługi aparatu	Szkolenie w placówce <ul style="list-style-type: none"> Wymaga instalacji sprzętu
Inspekcja placówki klienta	Zatwierdzenie w placówce <ul style="list-style-type: none"> Instalacja sprzętu pomocniczego Wymagane odczynniki Połączenie elementów systemu
Szkolenie w placówce	Oznaczenie wykonywane przez specjalistę z firmy Illumina <ul style="list-style-type: none"> Uprzednio przetestowane próbki sztucznego osocza o znanej charakterystyce (udostępniane przez firmę Illumina) Omówienie krok po kroku przebiegu oznaczenia od izolacji osocza po obsługę aparatu i analizę danych Szkolenie w zakresie analizy danych
Testy kompetencji w placówce	Oznaczenie wykonywane przez personel klienta <ul style="list-style-type: none"> Uprzednio przetestowane próbki sztucznego osocza o znanej charakterystyce (udostępniane przez firmę Illumina)

Podsumowanie

Rozwiązanie VeriSeq NIPT Solution v2 jest produktem, który rewolucjonizuje nieinwazyjne badania prenatalne (NIPT) pod względem ich dostępności, niezawodności i możliwości. Dzięki niemu laboratoria mogą korzystać z sekwencjonowania nowej generacji (NGS), aby wykonywać szybkie, niezawodne i dokładne testy NIPT z niskimi wskaźnikami niepowodzeń.

Dowiedz się więcej

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

Informacje na temat zamawiania

Produkt	Nr katalogowy
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

Oświadczenie dotyczące przeznaczenia

Rozwiązanie VeriSeq NIPT Solution v2 jest testem diagnostycznym *in vitro* przeznaczonym do stosowania jako test przesiewowy wykrywający anomalie genetyczne płodu w całym genomie na podstawie próbek pełnej krwi obwodowej kobiety w co najmniej 10. tygodniu ciąży. Rozwiązanie VeriSeq NIPT Solution v2 wykorzystuje metodę sekwencjonowania całego genomu do wykrywania częściowych duplikacji i delecji we wszystkich autosomach oraz statusu aneuploidii we wszystkich chromosomach. Test umożliwia też wykrycie aneuploidii chromosomów płci (SCA). Wyniki tego testu nie mogą być jedyną podstawą decyzji diagnostycznych lub innych decyzji dotyczących prowadzenia ciąży.



1 800 809 4566 (połączenie bezpłatne) (USA) | tel. +1 858 202 4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2022 Illumina, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone. Wszystkie znaki towarowe są własnością firmy Illumina, Inc. lub ich odpowiednich właścicieli. Szczegółowe informacje na temat znaków towarowych można znaleźć pod adresem www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-01319 POL 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, Sehntert 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 fetoplacental 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.