

# VeriSeq™ NIPT Solution v2

Řešení VeriSeq NIPT Solution v2, které znamená revoluční změnu v neinvazivním prenatalním testování (NIPT), je komplexní a dostupná sekvenční analýza celého genomu, jež poskytuje přesné výsledky až pro 96 vzorků za ~ 26 hodin.

## Hlavní vlastnosti

- Nejkomplexnější zobrazení fetálního genomu**  
 Laboratorní řešení NIPT pro IVD nabízející nejširší nabídku testů ověřenou studií klinické přesnosti na více než 2000 vzorcích
- Vynikající účinnost testů<sup>1</sup>**  
 Bezkonkurenční přesnost, nejrychlejší výsledky, nízká chybovost
- Jednoduché a škálovatelné řešení IVD**  
 Snadno implementovatelné řešení analyzuje v každém běhu 24, 48 nebo 96 vzorků

Tabulka 1: VeriSeq NIPT Solution v2 stručně

Parametr	Popis
Způsob	Celogenomové sekvenování
Příprava knihovny	Bez PCR
Chemie	Sekvenování párových konců
Počet vzorků	24, 48 nebo 96 na jednu dávku
Čas do výkazu	~ 26 hodin
Počet techniků	1
Vzorek	7–10 ml z jedné zkumavky krve matky
Nabízená analýza	Stav aneuploidie u všech autozomů a pohlavních chromozomů Některé subchromozomální variace počtu kopií $\geq 7$ Mb

## Úvod

Neinvazivní prenatalní testování (NIPT) prováděné pomocí sekvenování nové generace (NGS) poskytuje spolehlivé výsledky vyšetření pro aneuploidie chromozomů plodu již od 10. týdne těhotenství – a to z jediné zkumavky krve matky.<sup>2,3</sup> VeriSeq NIPT Solution v2 využívá výkonnou technologii NGS společnosti Illumina k aplikaci přístupu celogenomového sekvenování (WGS) u NIPT a rozšiřuje možnosti nabídky testů o běžné aneuploidie (chromozomy 21, 18 a 13), všechny vzácné autozomální aneuploidie (RAA), aneuploidie pohlavních chromozomů (SCA) a částečné delece a duplikace, které se označují jako variace počtu kopií (CNV), o velikosti  $\geq 7$  Mb. Díky kombinaci široké nabídky testů, přesných výsledků a nízké chybovosti nabízí VeriSeq NIPT Solution nejkomplexnější vyšetření fetálního genomu, a umožňuje tak informovaná a včasná rozhodnutí týkající se těhotenství.<sup>4,5</sup>

VeriSeq NIPT Solution v2 zahrnuje pracovní postup, přístroje a softwarové inovace, díky kterým je NIPT založené na NGS dostupné pro každou laboratoř provádějící prenatalní klinická vyšetření aneuploidii. Díky poskytnutí reagensií, přístrojů, softwaru, instalace a školení představuje VeriSeq NIPT automatizované a spolehlivé řešení pro provádění vlastního NIPT (Obr. 1 a Tabulka 1).

## Komplexní zobrazení fetálního genomu

Řada laboratorních řešení NIPT se zaměřuje na trizomie chromozomů 21, 18 a 13, ale tyto chromozomy představují pouze část genomu. V těchto testech budou chybět CNV o velikosti  $\geq 7$  Mb, které mají možnou míru výskytu 0,10 % a jsou spojovány s anomáliemi nebo opožděním vývoje plodu. Dále budou v těchto testech chybět těhotenství s vyšetřením pozitivním na RAA, která mohou mít nežádoucí důsledky včetně potratu, intrauterinního zpomalení růstu (IUGR), uniparentální dizomie (UPD), předčasného porodu, anomálií plodu a dalších.<sup>6</sup> Protože RAA mají kombinovanou míru výskytu 0,34 %<sup>6</sup>, oproti 0,30 % u trizomie 21<sup>7</sup>, může se stát, že samotné základní vyšetření NIPT nezachytí významné anomálie.

## Vynikající účinnost testů

Z hlediska přesnosti výsledků, reakční doby a chybovosti je výkonnost systému VeriSeq NIPT Solution v2 vynikající.



Obr. 1: Úplný pracovní postup NIPT IVD – VeriSeq NIPT Solution v2 poskytuje vše, co je potřeba k provádění NIPT pomocí NGS, včetně reagensií pro extrakci DNA, přípravu knihovny a sekvenování; vybavení pro automatizovanou přípravu knihovny a sekvenování pomocí softwaru pro správu pracovního postupu; místního serveru pro zabezpečené ukládání a analýzu dat; a softwaru pro analýzu dat schopného generovat klinické výsledky.

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

	Trizomie chromozomu 21	Trizomie chromozomu 18	Trizomie chromozomu 13	RAA <sup>d</sup>	CNV ≥ 7 Mb	Libovolná anomálie <sup>e</sup>
<b>Citlivost<sup>b</sup></b>	> 99,9 % (130/130)	> 99,9 % (41/41)	> 99,9 % (26/26)	96,4 % (27/28)	74,1 % (20/27)	95,5 % (318/333)
<b>Oboustranný 95 % interval spolehlivosti<sup>c</sup></b>	97,1 %, 100 %	91,4 %, 100 %	87,1 %, 100 %	82,3 %, 99,4 %	55,3 %, 86,8 %	92,7 %, 97,3 %
<b>Specifická</b>	99,90 % (1982/1984)	99,90 % (1995/1997)	99,90 (2000/2002)	99,80 % (2001/2005)	99,80 % (2000/2004)	99,34 % (1954/1967)
<b>Oboustranný 95 % interval spolehlivosti<sup>c</sup></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. Sedm dvoučetných těhotenství, která byla správně vykázána jako T21, není v tabulce uvedeno
- b. Pro T21, T18 a T13 je uvedena účinnost základního vyšetření s vyloučením 16 vzorků se známými mozaikami a dalších 49 vzorků ovlivněných anomáliemi pouze pro celogenomové vyšetření; pro RAA a CNV je uvedena účinnost celogenomového vyšetření
- c. Interval spolehlivosti založený na Wilsonově metodě hodnocení
- d. RAA nezahrnuje chromozomy 21, 18 a 13
- e. Libovolné anomálie zahrnují vzorky ze základního a celogenomového vyšetření SCA

**Tabulka 3: Shoda výsledků VeriSeq NIPT Solution v2 pro klasifikaci pohlaví plodu s klinickým referenčním standardním závěrem**

Výsledky testů VeriSeq NIPT Solution v2	Výsledek fyzického vyšetření novorozence <sup>a</sup>		Cytogenetické výsledky					
	Ženské pohlaví	Mušské pohlaví	XX	XY	XO	XXX	XXY	XXY
<b>Procentní shoda</b>	100 %	100 %	100 %	100 %	90,5 %	100 %	100 %	91,7 %

- a. Žádné cytogenetické výsledky

## Bezkonkurenční přesnost

Systém VeriSeq NIPT Solution v2 prošel rozsáhlým testováním pro určení klinické přesnosti a spolehlivosti. Vzorky z postižených těhotenství byly způsobilé pro testování, pokud byly k dispozici klinické výsledky, které splňovaly kritéria pro zařazení vzorků. Kohorta zahrnovala délky těhotenství kolem 11 týdnů, vzorky s nízkou fetální frakcí a dvočetná těhotenství. V rámci studie bylo systémem VeriSeq NIPT Solution v2 vyšetřeno více než 2300 vzorků od matek se známými nálezy trizomie 21, trizomie 18, trizomie 13, všech vzácných autozomálních trizomií, CNV ≥ 7 Mb a SCA a výsledky byly porovnány s klinickými referenčními daty. Výsledky prokázaly mimořádně vysokou citlivost a specifitu u cílových aneuploidí a CNV ≥ 7 Mb (Tabulka 2 a Tabulka 3) a nízkou celkovou chybovost vzorků 1,2 %.<sup>8</sup>

## Nejrychlejší výsledky

VeriSeq NIPT Solution v2 nabízí u NIPT rychlý pracovní postup ve třech krocích, který vygeneruje přesné výsledky za dobu o něco málo delší než 1 den (Tabulka 4). Podle jednoduchého automatizovaného pracovního postupu může jeden technik analyzovat 24–96 vzorků za méně než 8 hodin s minimálním časem aktivní práce. Cílené sekvenování a čipové (array-based) metody mívají delší laboratorní protokoly, které vyžadují delší čas aktivní práce.

**Tabulka 4: Výstupy VeriSeq NIPT za cca 1 den**

Krok	Čas aktivní práce	Celkový čas
<b>Příprava vzorku</b> (izolace plazmy, extrakce DNA, příprava knihovny)	~ 2 hodiny	~ 8 hodin
<b>Sekvenování</b> (načtení knihovny a nastavení běhu)	~ 15 minut	~ 14 hodin
<b>Analýza dat a vytvoření výkazu<sup>a</sup></b>	Není k dispozici	~ 4 hodiny
Celkový čas	~ 2,25 hodiny	~ 26 hodin

- a. Skutečný čas závisí na postupech jednotlivých laboratoří a může se u různých pracovišť lišit. N/A: není k dispozici

## Nízká chybovost testů

Chyby vzorků, kde nelze přiřadit dizomii nebo aneuploidii, je důležitým faktorem spolehlivosti a klinické užitečnosti NIPT. Chybovost testů NIPT se značně liší podle použitého testu. Testy, které používají cílený přístup, vykazují vyšší chybovost než testy, které sekvenují celý genom, a to jak u ověřovacích studií, tak u klinických studií.<sup>9</sup> VeriSeq NIPT Solution v2 pomocí WGS zajišťuje dostatek dat z celého diploidního genomu, aniž by došlo k ovlivnění přesnosti nebo zvýšení chybovosti či množství falešně pozitivních výsledků. U klinických studií poskytl cca 99 % vzorků výsledek v prvním běhu.<sup>8</sup> V laboratorní praxi může být z počátečního odběru krve k dispozici dostatek materiálu k zopakování pracovního postupu VeriSeq NIPT, pokud je to potřeba.

## Jednoduché a škálovatelné řešení IVD

Integrované řešení VeriSeq NIPT Solution v2 poskytuje vše, co je potřeba k analýze. Automatizovaný pracovní postup se snadno škáluje, aby bylo možné provádět v každém běhu analýzu 24, 48 nebo 96 vzorků, což zajišťuje efektivitu a flexibilitu při správě objemů vzorků.

## Automatizovaná příprava knihovny

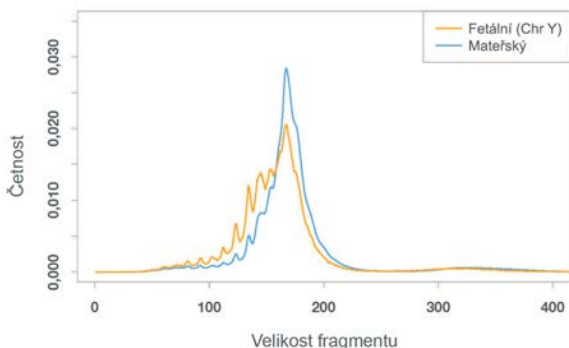
Plně automatizovaná procedura VeriSeq NIPT přináší jednoduchý pracovní postup, který minimalizuje dobu pracovního zapojení technika a možnost chyby. Protokol začíná se 7–10 ml periferní plně krve matky, odebrané pomocí dodané odběrové zkumavky (BCT) Streck. Optimalizované sady pro přípravu vzorků VeriSeq NIPT obsahují reagentie a spotřební materiál pro přípravu knihoven sekvenování z cfDNA. Izolace plazmy, extrakce cfDNA a příprava knihovny bez PCR, včetně vytvoření desky pro kvantifikaci, kvantifikace knihoven a slučování knihoven, jsou automatizovány v systému VeriSeq NIPT Microlab STAR, což je systém Hamilton Microlab STAR zákaznický nakonfigurovaný speciálně pro použití v pracovním postupu VeriSeq NIPT. Uživatelsky přívětivý program VeriSeq NIPT Workflow Manager (Správce pracovního postupu) umožňuje řídit všechny aspekty přípravy vzorků včetně jejich sledování.

## Sekvenování

Systém VeriSeq NIPT Solution v2 je založen na osvědčené technologii sekvenování syntézou (SBS) společnosti Illumina, jejímž prostřednictvím se generuje více než 90 % dat sekvenování na světě.<sup>10</sup>

### Vyšší účinnost u sekvenování párových konců

Vzorek krve matky obsahuje různé délky cfDNA; delší bývají mateřské, kratší bývají silněji spojené s plodem (Obr. 2).<sup>11</sup> Pomocí sekvenování párových konců, které za stejnou dobu a se stejnou vynaloženou prací poskytuje dvakrát více dat než sekvenování jednoduchého čtení, VeriSeq NIPT Solution v2 rychle a efektivně identifikuje délky všech fragmentů cfDNA v rámci jednoho vzorku. Algoritmus VeriSeq NIPT Assay Software používá tato data k zaměření analýzy na kratší fragmenty, čímž se posiluje signál z fetální cfDNA.



Obr. 2: Porovnání velikostí fragmentů cfDNA matky a plodu – sekvenování párových konců rozlišuje fragmenty cfDNA podle velikosti. Delší fragmenty mívají původ u matky, zatímco kratší fragmenty jsou fetální.

### Účinnost diagnostiky ve stolním sekvenčeru

Sekvenování pomocí VeriSeq NIPT Solution v2 je prováděno na systému Illumina NextSeq™ 550Dx, což je platforma regulovaná FDA a označená značkou CE-IVD, která spojuje účinnost vysoce výkonného NGS a dostupnost stolního systému (Tabulka 5).

Systém NextSeq 550Dx je vybaven pracovním postupem ihned připraveným ke spuštění, který vyžaduje zhruba 30 minut aktivní práce. Intuitivní uživatelské rozhraní umožňuje uživatelům provádět aplikace sekvenování po nejzákladnějším školení a s minimálním časem potřebným pro nastavení přístrojů.

Tabulka 5: Požadavky na výkon přístroje pro NGS

Parametr	Specifikace
Délka čtení	2 × 36 bp
Typ souboru sekvenování	Soubor .BCL
Výstup sekvenování	400 milionů čtení
Doba běhu	~ 14 hodin
Multiplexing	24 nebo 48 vzorků v jednom běhu

## Analýza na pracovišti

Analýza dat se provádí ve vyhrazeném serveru VeriSeq Onsite Server v2 se softwarem VeriSeq NIPT Assay Software v2 nesoucím značku MD. Server automaticky zpracovává data sekvenování. Na jediném serveru lze do fronty pro analýzu zařadit několik dávek vzorků. Data není k analýze potřeba nikam odesílat, což šetří čas a chrání identitu vzorků.

## VeriSeq NIPT Assay Software

VeriSeq NIPT Assay Software filtruje čtení a uspořádává je podle referenčního genomu. Pokročilý algoritmus počítá počet čtení na jeden chromozom. Skóre odrážejí normalizované pokrytí testovaného chromozomu nebo subchromozomální oblasti a pomáhají při detekci a diferenciaci aneuploidie a CNV. Software také pro každý vzorek vytváří a vykazuje odhad fetální frakce. Data fetální frakce jsou zkombinována s pokrytím a dalšími statistickými vstupy vygenerovanými během sekvenování pro vyhodnocení stavu aneuploidie.

Pro zajištění nízké chybovosti obsahuje VeriSeq NIPT Assay Software metriku pro hodnocení kvality vzorku individualizované zkoušky iFACT (Individualized Fetal Aneuploidy Confidence Test). iFACT určuje, zda přístroj vygeneroval dostatečné pokrytí sekvenování a kvalitu dat, při použití odhadu fetální frakce pro každý vzorek, aby bylo možné přiřadit aneuploidii nebo CNV, a to i u vzorků s nízkou fetální frakcí.<sup>12–14</sup> Tato dynamická mezní hodnota umožňuje softwaru VeriSeq NIPT Assay Software hlásit vzorky s nízkou fetální frakcí, což zajišťuje nízkou chybovost.<sup>14–16</sup>

## Vytváření výkazů

Po analýze dat vygeneruje VeriSeq NIPT Assay Software zprávu „Aneuploidy detected“ (Zjištěna aneuploidie) nebo „No aneuploidy detected“ (Aneuploidie nezjištěna) pro chromozom testovaný v příslušném vzorku. Pokud je zjištěna CNV, zobrazí se ve výstupním výkazu pro daný vzorek přesné souřadnice v genomu. Výstupním formátem informací je soubor .CSV, který lze integrovat se stávajícím LIMS. Data lze použít k vytvoření vlastní klinické zprávy podle potřeb laboratoře.

## Plně podporovaná implementace

Pro snadnou integraci do prostředí laboratoře je součástí řešení VeriSeq NIPT Solution v2 kompletní instalace systému provedená

kvalifikovaným servisním technikem společnosti Illumina a školení praktického použití. Zkušení odborníci společnosti Illumina předvedou personálu laboratoře krok za krokem postup extrakce vzorků, přípravy knihovny, sekvenování a analýzy (Tabulka 6). Až se práce v laboratoři rozběhne, bude tým technické podpory společnosti Illumina nadále poskytovat trvalou podporu.

**Tabulka 6: Školení VeriSeq NIPT Solution v2**

Téma	Podrobnosti
Seznámení s řešením VeriSeq NIPT Solution v2	<p>Stručný seminář o pracovním postupu a analýze</p> <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 přístroje	<p>Školení na pracovišti</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Je potřeba nainstalovaný přístroj</li> </ul>
Kontrola pracoviště	<p>Ověření na pracovišti</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Instalace pomocného vybavení</li> <li>Potřebné reagencie</li> <li>Propojení součástí systému</li> </ul>
Školení na pracovišti	<p>Analýza prováděná odborníkem společnosti Illumina</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Předem otestované vzorky plazmy se známými charakteristikami (poskytne společnost Illumina)</li> <li>Pracovní postup analýzy krok za krokem od izolace plazmy přes ovládání přístroje po analýzu dat</li> <li>Školení analýzy dat</li> </ul>
Testování způsobilosti na pracovišti	<p>Analýza prováděná zákazníkem</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Předem otestované vzorky plazmy se známými charakteristikami (poskytne společnost Illumina)</li> </ul>

## Souhrn

VeriSeq NIPT Solution v2 přináší revoluční změnu z hlediska dostupnosti, spolehlivosti a výkonnosti NIPT. Každá laboratoř si teď může osvojit NGS a získávat tak rychlé, spolehlivé a vysoce přesné výsledky NIPT s nízkou chybovostí.

## Další informace

Chcete-li se o řešení VeriSeq NIPT Solution v2 dozvědět víc, navštivte stránku [www.illumina.com/VeriSeqNIPT](http://www.illumina.com/VeriSeqNIPT).

## Objednací informace

Produkt	Katalog. č.
Sada pro přípravu zpracování vzorků VeriSeq NIPT (24 vzorků)	20025895
Sada pro přípravu zpracování vzorků VeriSeq NIPT (48 vzorků)	15066801
Sada pro přípravu zpracování vzorků VeriSeq NIPT (96 vzorků)	15066802
VeriSeq Onsite Server v2	20028403
Aktivace řešení VeriSeq NIPT Solution	15076162
Zkumavka Streck (BCT) pro odběr bezbuněčné DNA (CE)	15073345
Přístroj NextSeq 550Dx	20005715

Illumina, Inc. • Bezplatná linka (USA) 1 800 809 4566 • Telefon +1 858 202 4566 • [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com) • [www.illumina.com](http://www.illumina.com)

© 2019 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). Č. dokumentu 100000119416 v00 CZE QB 7743

## Prohlášení o určeném použití

VeriSeq NIPT Solution v2 je diagnostický test *in vitro*, který je určen k použití jako vyšetřovací test zjišťující celogenomové genetické anomálie plodu ze vzorků periferní plné krve žen, které jsou alespoň 10 týdnů těhotné. VeriSeq NIPT využívá celogenomové sekvenování k detekci CNV pro všechny autozomy a stavy aneuploidie pro všechny chromozomy. Test nabízí možnost zažádat o hlášení aneuploidii pohlavního chromozomu (SCA). Tento produkt se nesmí používat jako jediný základ pro diagnostiku a další rozhodování týkající se těhotenství.

## Odkazy

- Data v souboru. Illumina, Inc 2019.
- 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.
- Datové výpočty v souboru. Illumina, Inc 2019.
- ACOG Committee on Practice Bulletins—Obstetrics, Committee on Genetics, and the Society for Maternal-Fetal Medicine. *Practice Bulletin No. 163: Screening For Fetal Aneuploidy. Obstet Gynecol.* 2016;127(5):e123-37. doi: 10.1097/AOG.0000000000001406.
- 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).
- Galjaard RJ, Henneman L, Macville M, et al. Implementing NIPT as part of a national prenatal screening program: The Dutch TRIDENT studies. Oral abstract: International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy; July 2018; Antwerp, Belgium.
- Illumina. Příloha k balení produktu VeriSeq NIPT Solution v2. 2019.
- Illumina. Don't settle for failure. [mkt.illumina.com/rs/600-XEX-927/images/dont-settle-for-failure.pdf](http://mkt.illumina.com/rs/600-XEX-927/images/dont-settle-for-failure.pdf). Datum přístupu: 15. března 2017.
- Datové výpočty v souboru. Illumina, Inc 2017.
- 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.
- Duenwald S, Chen G, Barbacioru C, et al. Development of a Novel Paired-End Sequencing-Based Noninvasive Prenatal Test. Leták představený na 36. výroční konferenci o těhotenství Society for Maternal-Fetal Medicine; 1.–6. února 2016; Atlanta, Georgia.
- 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. [Verze ve formátu Epub předchází tištěné verzi].
- Cirigliano V, Ordonez E, Rueda L, et al. Performance evaluation and clinical application of a new paired end MPSS approach for cfDNA based prenatal aneuploidy screening. Leták představený na setkání International Society for Prenatal Diagnosis. 10.–13. června 2016; Berlín, Německo.
- Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. *Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. Prenat Diagn.* 2013; 33:662-666.
- Pergament E, Cuckle H, Zimmermann B, et al. *Single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal screening in a high-risk and low-risk cohort. Obstet Gynecol.* 2014; 124(2 Pt 1):210-218.