

VeriSeq™ NIPT Solution v2

Ein umfassender,
anwenderfreundlicher
Gesamtenom-
Sequenzierungsassay

- Umfassende Analyse fetaler Chromosomen mit einem umfangreichen Testmenü, überprüft in einer Studie zur klinischen Genauigkeit mit mehr als 2.300 Proben
- Zuverlässige Testperformance¹ mit hoher Genauigkeit, schnellen Ergebnissen und geringen Fehlerraten
- Einfache, skalierbare IVD-Lösung zur Analyse von 24, 48 oder 96 Proben pro Lauf

illumina®

Einleitung

Im Rahmen der Sequenzierung der nächsten Generation (NGS, Next-Generation Sequencing) durchgeführte nicht-invasive Pränataltests (NIPT, Noninvasive Prenatal Testing) bieten bereits in der 10. Schwangerschaftswoche zuverlässige Screening-Ergebnisse für fetale chromosomale Aneuploidien. Dafür ist lediglich ein einziges Röhrchen mit mütterlichem Blut erforderlich.^{2,3} VeriSeq NIPT Solution v2 profitiert von der leistungsstarken NGS-Technologie von Illumina, die die Gesamtgenom-Sequenzierung (WGS, Whole-Genome Sequencing) für NIPT nutzbar macht und die Testmenüoptionen um häufige Aneuploidien (Chromosomen 21, 18 und 13), seltene autosomale Aneuploidien (RAAs, Rare Autosomal Aneuploidies), bestimmte Geschlechtschromosom-Aneuploidien (SCAs, Sex Chromosome Aneuploidies) sowie partielle Duplikationen und Deletionen mit einer Größe ≥ 7 Mb erweitert.

VeriSeq NIPT Solution v2 vereint ein umfangreiches Testmenü, genaue Ergebnisse sowie geringe Fehlerraten, bietet ein umfassendes Screening fetaler Chromosomen und ermöglicht so fundierte, zeitnahe Entscheidungen im Zusammenhang mit der Schwangerschaft.¹ Bei VeriSeq NIPT Solution v2 handelt es sich um eine automatisierte, zuverlässige Lösung für interne NIPT, die Reagenzien, Geräte, Software, Installation und Schulung umfasst (Abbildung 1 und Tabelle 1).

Vollständige Analyse fetaler Chromosomen

Viele im Labor verwendete NIPT-Lösungen konzentrieren sich auf das Screening von Trisomien der Chromosomen 21, 18 und 13. Diese Chromosomenstörungen machen jedoch nur einen Teil der Anomalien aus, die auftreten können. Bei diesen Tests werden partielle Duplikationen und Deletionen ≥ 7 Mb nicht erfasst, die mit fetalen Anomalien und Entwicklungsverzögerungen in Zusammenhang stehen können und beim NIPT 0,12 % der positiven Screening-Ergebnisse ausmachen.⁴ Bei diesen Tests werden außerdem Schwangerschaften mit positivem Screening auf RAAs nicht erfasst, die mit unerwünschten Folgen wie beispielsweise Fehlgeburt, intrauteriner Wachstumsverzögerung (IUGR, Intrauterine Growth Restriction), uniparentaler Disomie (UPD), spontanen Frühwehen und fetalen Anomalien in Verbindung stehen können.⁵ Die kombinierte Rate positiver Screening-Ergebnisse für RAAs beträgt 0,34 %, ⁵ für Trisomie 21 liegt sie bei 0,30 %.^{6,7}

Tabelle 1: VeriSeq NIPT Solution v2, Übersicht

Bereich	Beschreibung
Methode	Gesamtgenom-Sequenzierung
Bibliotheksvorbereitung	ohne PCR
Chemie	Paired-End-Sequenzierung
Anzahl der Proben	24, 48 oder 96 je Batch
Dauer bis Bericht	ca. 26 Stunden
Anzahl der Techniker	1
Probe	7–10 ml aus einem einzigen Röhrchen mit mütterlichem Blut
Nutzung der Analyse	Aneuploidiestatus sämtlicher Autosomen und Geschlechtschromosomen; partielle Duplikationen und Deletionen ≥ 7 Mb

Zuverlässige Testperformance

Bezogen auf die Genauigkeit der Ergebnisse, die Reaktionszeit und die Fehlerraten weist VeriSeq NIPT Solution v2 eine herausragende Performance auf.

Hohe Genauigkeit

VeriSeq NIPT Solution v2 wurde zur Ermittlung der klinischen Genauigkeit und Zuverlässigkeit getestet. Proben betroffener Schwangerschaften wurden in die Testgruppe aufgenommen, wenn klinische Ergebnisse vorlagen und die Probeneinschlusskriterien erfüllt waren. Die Kohorte umfasste ein Gestationsalter von ca. 10 Wochen, Proben mit niedriger fetaler Fraktion sowie Zwillingsschwangerschaften. In der Studie wurden mehr als 2.300 mütterliche Proben mit bekannten Ergebnissen für Trisomie 21, Trisomie 18, Trisomie 13, RAAs, partielle Duplikationen und Deletionen ≥ 7 Mb und SCAs mit VeriSeq NIPT Solution v2 getestet und mit den klinischen Referenzergebnissen verglichen. Die Ergebnisse zeigten eine hohe Sensitivität und Spezifität für häufige Trisomien, RAAs, partielle Duplikationen und Deletionen ≥ 7 Mb, eine hohe Übereinstimmung bei der Klassifizierung des Geschlechts des Fetus mit den klinischen Ergebnissen sowie eine geringe Probenfehlerrate beim ersten Lauf von 1,2 % (Tabelle 2 und Tabelle 3).¹



Abbildung 1: Umfassender IVD-NIPT-Workflow: VeriSeq NIPT Solution v2 bietet alles, was für NIPT mit NGS benötigt wird, darunter Reagenzien für die DNA-Extraktion, Bibliotheksvorbereitung und Sequenzierung, Geräte für die automatisierte Bibliotheksvorbereitung und Sequenzierung mit Workflow-Manager-Software, einen Vor-Ort-Server für die sichere Datenspeicherung und -analyse sowie Datenanalysesoftware, die auf das Erstellen von Berichten mit qualitativen Ergebnissen ausgelegt ist.

Tabelle 2: Klinische Performance von VeriSeq NIPT Solution v2¹

	Trisomie 21 ^c	Trisomie 18	Trisomie 13	RAA ^d	Partielle Duplikationen und Deletionen ≥ 7 Mb	Beliebige Anomalie ^e
Sensitivität ^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)
Zweiseitiges 95%-KI ^b	97,1 %, 100 %	91,4 %, 100 %	87,1 %, 100 %	82,3 %, 99,4 %	55,3 %, 86,8 %	92,7 %, 97,3 %
Spezifität	99,90 % (1.982/1.984)	99,90 % (1.995/1.997)	99,90 % (2.000/2.002)	99,80 % (2.001/2.005)	99,80 % (2.000/2.004)	99,34 % (1.954/1.967)
Zweiseitiges 95%-KI ^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. Der Bericht mit der grundlegenden Screening-Performance umfasst T21, T18 und T13. Nicht enthalten sind 16 Proben mit bekannten Mosaiken sowie, ausschließlich beim genomweiten Screening, 49 weitere Proben mit Anomalien. Die genomweite Screening-Performance wird für RAAs sowie partielle Duplikationen und Deletionen angegeben.
- b. KI basiert auf der Score-Methode nach Wilson
- c. Sieben Zwillingsschwangerschaften korrekt als T21 ermittelt, nicht in der Tabelle enthalten
- d. RAA ohne die Chromosomen 21, 18 und 13
- e. Beliebige Anomalie umfasst Proben aus grundlegenden und genomweiten SCA-Screenings.

Tabelle 3: Übereinstimmung der Ergebnisse von VeriSeq NIPT Solution v2 zur Klassifizierung des Geschlechts des Fetus mit klinischer Referenz¹

Ergebnisse von VeriSeq NIPT Solution v2	Ergebnis der körperlichen Untersuchung der Neugeborenen		Zytogenetische Ergebnisse					
	Weiblich	Männlich	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY
Übereinstimmung in Prozent	100 %	100 %	100 %	100 %	90,5 %	100 %	100 %	91,7 %

Schnelle Ergebnisse

VeriSeq NIPT Solution v2 bietet einen schnellen, drei Schritte umfassenden Workflow für NIPT. In nur etwas mehr als einem Tag liegen genaue Ergebnisse vor (Tabelle 4). Mit dem einfachen automatisierten Workflow kann ein Techniker 24–96 Proben in weniger als 8 Stunden mit nur minimalem manuellen Aufwand analysieren. Die zielgerichtete Sequenzierung und die arraybasierten Methoden nehmen im Labor in der Regel mehr Zeit in Anspruch und erfordern einen höheren manuellen Aufwand.

Tabelle 4: VeriSeq NIPT ist in gut einem Tag abgeschlossen

Schritt	Manueller Aufwand	Gesamtdauer
Proben- und Bibliotheksvorbereitung	ca. 2 Stunden	ca. 8 Stunden
Sequenzierung	ca. 15 Minuten	ca. 14 Stunden
Datenanalyse und Berichterstellung	n. z.	ca. 4 Stunden
Gesamtdauer	ca. 2,25 Stunden	ca. 26 Stunden

Die tatsächliche Dauer hängt von den individuellen Laborprozessen ab und kann variieren; n. z.: nicht zutreffend

Geringe Testfehlerraten

Testfehler, d. h. es kann kein Call für eine Disomie oder Aneuploidie erzeugt werden, sind ein wichtiger Faktor in Bezug auf die Zuverlässigkeit und klinische Anwendung von NIPT. Die NIPT-Testfehlerraten unterscheiden sich je nach verwendetem Test signifikant voneinander. Bei Tests mit einem zielgerichteten Ansatz oder auf Grundlage von Einzelnukleotidpolymorphismen war die Rate von Primärtestfehlern höher als bei der NGS.⁸ Mithilfe der WGS liefert VeriSeq NIPT Solution v2 ausreichend Daten für sämtliche Chromosomen, ohne negative Auswirkungen auf die Genauigkeit oder einen Anstieg von Fehlern bzw. falsch positiven Ergebnissen. In der klinischen Validierungsstudie betrug die Fehlerrate beim ersten Lauf 1,2 %.¹ Im Laboreinsatz ist ausreichend Plasma von der ersten Blutentnahme verfügbar, um den VeriSeq NIPT-Workflow bei Bedarf zu wiederholen.⁹ Bei der Wiederholung mit derselben Probe sank die Primärfehlerrate von 2 % auf 1,3 %.⁹

Einfache, skalierbare IVD-Lösung

Die integrierte VeriSeq NIPT Solution v2 bietet alles, was für die Durchführung des Assays benötigt wird. Der automatisierte Workflow lässt sich problemlos mit 24, 48 oder 96 Proben pro Lauf durchführen und ermöglicht so eine effiziente und flexible Verarbeitung unterschiedlicher Mengen von Proben. Das Labor kann je nach Probe ein einfaches oder ein genomweites Screening durchführen.

Automatisierter Workflow

Der vollständig automatisierte VeriSeq NIPT-Assay bietet einen einfachen Workflow, der den durch einen Techniker erforderlichen manuellen Aufwand und mögliche Fehlerquellen minimiert. Für das Protokoll sind 7–10 ml mütterlichen peripheren Vollbluts erforderlich, die in das empfohlene Streck Blood Collect Tube (BCT) gegeben werden. Optimierte VeriSeq NIPT-Probenvorbereitungskits enthalten Reagenzien und Etiketten für die Vorbereitung von Sequenzierungsbibliotheken aus cfDNA. Die Plasmaisolation, cfDNA-Extraktion und Bibliotheksvorbereitung ohne PCR, einschließlich Erstellung von Quantifizierungsplatten, Bibliotheksquantifizierung und Bibliotheks-Pooling, werden in einem automatisierten Verfahren auf dem VeriSeq NIPT Microlab STAR durchgeführt, einem Hamilton Microlab STAR-System, das speziell für die Verwendung mit dem VeriSeq NIPT-Workflow konfiguriert wurde. Mit dem benutzerfreundlichen VeriSeq NIPT Workflow Manager lassen sich sämtliche Aspekte der Probenvorbereitung, einschließlich der Probenverfolgung, steuern.

Sequenzierung

Eine mütterliche Blutprobe enthält cfDNA-Fragmente unterschiedlicher Längen. Dabei sind die größeren Längen in der Regel mütterlichen Ursprungs und die kürzeren Längen fetalen Ursprungs (Abbildung 2).¹⁰ VeriSeq NIPT Solution v2 bestimmt schnell und effizient die Länge sämtlicher cfDNA-Fragmente in einer einzelnen Probe und konzentriert die Analyse auf kürzere cfDNA-Fragmente. Die Paired-End-Sequenzierung wird auf dem Illumina NextSeq™ 550Dx System durchgeführt, das als günstiges Tischsystem NGS¹¹ mit hohem Durchsatz ermöglicht (Tabelle 5).

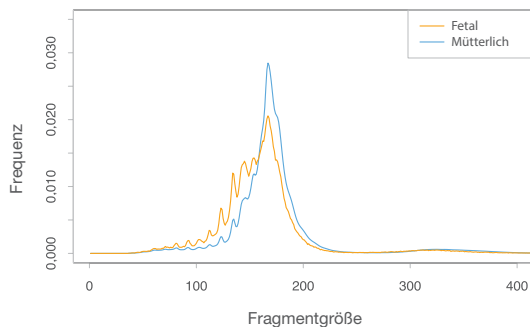


Abbildung 2: Größenvergleich zwischen den cfDNA-Fragmenten mütterlichen und fetalen Ursprungs: Die Paired-End-Sequenzierung unterscheidet cfDNA-Fragmente basierend auf ihrer Größe. Längere Fragmente sind in der Regel mütterlichen Ursprungs und kürzere Fragmente fetalen Ursprungs.

Tabelle 5: Anforderungen hinsichtlich der Geräteleistung für die NGS

Parameter	Spezifikation
Read-Länge	2 × 36 bp
Sequenzierungsdateityp	BCL-Datei
Sequenzierungsausgabe	400 Mio. Reads
Laufzeit	ca. 14 Stunden
Multiplexing	24 oder 48 Proben pro Lauf

Vor-Ort-Analyse

Die Datenanalyse erfolgt auf einem dedizierten VeriSeq v2 Onsite Server mit der IVD VeriSeq NIPT Assay Software v2. Der Server verarbeitet die Sequenzierungsdaten automatisch. Auf einem einzelnen Server können mehrere Probenbatches für die Analyse in die Warteschlange gestellt werden. Daten müssen nicht an externe Stellen gesendet werden, was Zeit spart und die Identität der Probe schützt.

VeriSeq NIPT Assay Software v2

Die VeriSeq NIPT Assay Software v2 filtert und aligniert die Reads mit einem Referenzgenom. Ein erweiterter Algorithmus bestimmt die Read-Dichte pro Chromosom (Segment) und unterstützt die Erkennung und Unterscheidung von Aneuploidien sowie partiellen Duplikationen und Deletionen. Außerdem ermittelt die Software für jede Probe den Schätzwert für die fetale Fraktion und gibt diesen aus. Mithilfe der Daten zur fetalen Fraktion sowie der Coverage und anderen während der Sequenzierung generierten statistischen Angaben wird der Aneuploidiestatus beurteilt.

Um niedrige Testfehlerraten zu gewährleisten, enthält die VeriSeq NIPT Assay Software v2 die iFACT-Kennzahl zur Probenqualitätsbewertung (individualized Fetal Aneuploidy Confidence Test, individualisierter Zuverlässigkeitstest zur fetalen Aneuploidie). iFACT zeigt an, ob der Assay bei gegebener geschätzter fetaler Fraktion für jede Probe eine ausreichende Sequenzierungs-Coverage generiert hat, sodass selbst für Proben mit niedriger fetaler Fraktion Aneuploidie-Calls oder Calls für partielle Duplikationen und Deletionen möglich sind.¹² Dieser dynamische Cutoff ermöglicht es der VeriSeq NIPT Assay Software v2, Proben mit niedriger fetaler Fraktion zu verarbeiten, sodass weniger Tests fehlschlagen.¹

Berichterstellung

Nach der Datenanalyse generiert die VeriSeq NIPT Assay Software für die in den einzelnen Proben getesteten Chromosomen das Ergebnis „Aneuploidy Detected“ (Aneuploidie festgestellt) oder „No Aneuploidy Detected“ (Keine Aneuploidie festgestellt). Wenn partielle Duplikationen und Deletionen erkannt werden, enthält der Bericht die genauen Koordinaten aus dem Genom. Die Informationen werden in einer CSV-Datei ausgegeben, die in ein vorhandenes LIMS integriert werden kann. Mithilfe der Daten lässt sich ein individueller klinischer Bericht erstellen.

Vollständig unterstützte Implementierung

Für eine nahtlose Laborintegration beinhaltet VeriSeq NIPT Solution v2 eine Komplettinstallation des Systems durch einen speziell ausgebildeten Servicetechniker von Illumina sowie eine Praxisschulung. Sachkundige Wissenschaftler von Illumina weisen das Laborpersonal Schritt für Schritt in die Probenextraktion, Bibliotheksvorbereitung, Sequenzierung und Analyse ein (Tabelle 6). Sobald die Labore bereit sind, stellt der technische Support von Illumina weitere Unterstützung bereit.

Tabelle 6: Schulung zu VeriSeq NIPT Solution v2

Thema	Details
Einführung in VeriSeq NIPT Solution v2	Seminarübersicht zum Workflow und zur Analyse <ul style="list-style-type: none"> • Anleitung zu Zusatzgeräten • Anleitung zu Verbrauchsmaterialien • Blutentnahmeprotokoll • Plasmaisolationsprotokoll
Schulung zum Gerätebetrieb	Vor-Ort-Schulung <ul style="list-style-type: none"> • Erfordert ein installiertes Gerät
Betriebsbegehung	Prüfung vor Ort <ul style="list-style-type: none"> • Installation von Zusatzgeräten • Benötigte Reagenzien • Konnektivität der Systemkomponenten
Vor-Ort-Schulung	Assay-Durchführung durch einen Wissenschaftler von Illumina <ul style="list-style-type: none"> • Vorgetestete Plasmaproben mit bekannten Leistungsmerkmalen (von Illumina zur Verfügung gestellt) • Einweisung in die einzelnen Assay-Workflow-Schritte, von der Plasmaisolation bis zum Gerätebetrieb und zur Datenanalyse • Datenanalyseschulung
Vor-Ort-Kompetenztest	Assay-Durchführung durch den Kunden <ul style="list-style-type: none"> • Vorgetestete Plasmaproben mit bekannten Leistungsmerkmalen (von Illumina zur Verfügung gestellt)

Zusammenfassung

VeriSeq NIPT Solution v2 revolutioniert die Anwenderfreundlichkeit, Zuverlässigkeit und Leistung von NIPT. Labore erhalten jetzt mithilfe von NGS schnelle, zuverlässige und hochgradig genaue NIPT-Ergebnisse bei nur geringen Fehlerraten.

Weitere Informationen

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

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
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

Erklärung zur bestimmungsgemäßen Verwendung

VeriSeq NIPT Solution v2 ist ein *In-vitro*-Diagnostest und als Screeningtest für den Nachweis genomweiter fetaler genetischer Anomalien in mütterlichen peripheren Vollblutproben von schwangeren Frauen, die sich mindestens in der 10. Schwangerschaftswoche befinden, bestimmt. VeriSeq NIPT Solution v2 erkennt mithilfe der Sequenzierung des Gesamtgenoms partielle Duplikationen und Deletionen für alle Autosomen sowie den Aneuploidiestatus für alle Chromosomen. Der Test bietet eine Option für die Protokollierung von Aneuploidien der Geschlechtschromosomen (Sex Chromosome Aneuploidy, SCA). Dieses Produkt darf nicht als alleinige Quelle für eine Diagnose oder die Entscheidung über einen Schwangerschaftsabbruch verwendet werden.

Quellen

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, 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®

1.800.809.4566 (USA, gebührenfrei) | +1.858.202.4566 (Tel. außerhalb der USA)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2021 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Eigentümer. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
M-APJ-00036 DEU v2.0