

VeriSeq™ NIPT Solution v2

Доступный комплексный
анализ с полногеномным
секвенированием

- Комплексный анализ хромосом плода с расширенным меню тестирования, валидированный в исследовании с оценкой клинической достоверности, проведенном на > 2300 образцах
- Надежный высокоточный метод¹, быстрое получение результатов и низкая частота ошибок
- Простое адаптивное решение для диагностики *in vitro* с возможностью анализа 24, 48 или 96 образцов за один запуск

illumina®

Введение

Неинвазивное пренатальное тестирование (НИПТ) с секвенированием нового поколения (next-generation sequencing, NGS) позволяет получать надежные результаты при скрининге на хромосомные анеуплоидии плода уже на 10-й неделе гестации. Необходимый для тестирования объем материнской крови — всего одна пробирка^{2,3}. Опираясь на преимущества эффективной технологии NGS компании Illumina, метод VeriSeq NIPT Solution v2 позволяет применять в ходе НИПТ полногеномное секвенирование (whole-genome sequencing, WGS), при этом в качестве вариантов в меню тестирования включены распространенные анеуплоидии (по хромосомам 21, 18 и 13), редкие аутосомные анеуплоидии (rare autosomal aneuploidies, RAA), определенные анеуплоидии по половым хромосомам (sex chromosome aneuploidies, SCA), а также частичные дупликации и делеции размером ≥ 7 Мб.

Благодаря расширенному меню тестирования, точности результатов и низкой частоте ошибок метод VeriSeq NIPT Solution v2 позволяет выполнять комплексный скрининг хромосом плода, а также принимать взвешенные и своевременные решения при ведении беременности¹. При наличии реагентов, приборов, программного обеспечения, установленного оборудования и надлежащей подготовке персонала анализ VeriSeq NIPT Solution v2 является надежным автоматизированным методом при проведении НИПТ в медицинских учреждениях (рисунок 1 и таблица 1).

Комплексный анализ хромосом плода

Многие лабораторные методы НИПТ предназначены для скрининга на трисомию по хромосомам 21, 18 и 13, однако эти случаи представляют лишь часть возможных нарушений. Эти тесты не позволяют обнаруживать частичные дупликации и делеции размером ≥ 7 Мб, которые могут быть связаны с аномалиями плода и задержками развития, а при использовании НИПТ частота положительных результатов скрининга на эти нарушения составляет 0,12 %⁴. При выполнении таких тестов также не выявляются случаи беременности с RAA, которые обнаруживаются при проведении скрининга описываемым методом. Такие случаи могут быть ассоциированы с неблагоприятными исходами беременности, включая, помимо прочего, выкидыш, задержку внутриутробного развития (ЗВУР), однородительскую дисомию (ОРД), самопроизвольные

преждевременные роды и аномалии плода⁵. Совокупная частота положительных результатов скрининга на RAA составляет 0,34 %⁵ по сравнению с 0,30 % для трисомии по хромосоме 21^{6,7}.

Таблица 1. Основные характеристики анализа VeriSeq NIPT Solution v2

Параметр	Описание
Метод	Полногеномное секвенирование
Подготовка библиотеки	Без ПЦР
Химический метод	Секвенирование методом парных прочтений
Число образцов	24, 48 или 96 на серию
Время до создания отчета	~26 часов
Число лаборантов	1
Образец	7–10 мл (одна пробирка) материнской крови
Выполняемый анализ	Статус анеуплоидии для всех аутосом и половых хромосом; частичные дупликации и делеции ≥ 7 Мб

Достоверность тестирования

Метод VeriSeq NIPT Solution v2 отличается превосходными показателями достоверности результатов, скорости их получения и частоты ошибок.

Высокая точность

Для определения клинической достоверности и надежности результатов проведена валидация метода VeriSeq NIPT Solution v2. Для тестирования отбирали соответствующие критериям исследования образцы, полученные у беременных женщин с клинически подтвержденными искомыми аномалиями плода. В эту группу включали женщин после достижения по меньшей мере 10 недель гестации. Образцы отличались низкой фетальной фракцией свободно циркулирующей ДНК или были получены у женщин с дуплодной беременностью. В ходе этого исследования метод VeriSeq NIPT Solution v2 использовали для скрининга > 2300 образцов матерей с известными исходами беременности, такими как трисомии по хромосомам 21, 18 и 13, RAA, частичные



Рисунок 1. Полный рабочий процесс НИПТ для диагностики *in vitro*: при проведении тестирования с использованием метода VeriSeq NIPT Solution v2 предусмотрено все необходимое для НИПТ с использованием NSG, включая реагенты для выделения ДНК, подготовки библиотек и секвенирования; средства для автоматизации подготовки библиотек и секвенирования с помощью программного диспетчера рабочих процессов; локальный сервер для надежного хранения и анализа данных; а также программное обеспечение анализа данных с возможностью создания отчетов, представляющих качественные результаты

Таблица 2. Показатели клинической эффективности метода VeriSeq NIPT Solution v2¹

	Трисомия по хромосоме 21 ^c	Трисомия по хромосоме 18	Трисомия по хромосоме 13	Редкие аутосомные анеуплоидии ^d	Частичные дупликации и делеции ≥ 7 Мб	Любая аномалия ^e
Чувствительность ^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)
2-сторонний 95 % ДИ ^b	97,1 %, 100 %	91,4 %, 100 %	87,1 %, 100 %	82,3 %, 99,4 %	55,3 %, 86,8 %	92,7 %, 97,3 %
Специфичность	99,90 % (1982/1984)	99,90 % (1995/1997)	99,90 % (2000/2002)	99,80 % (2001/2005)	99,80 % (2000/2004)	99,34 % (1954/1967)
2-сторонний 95 % ДИ ^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. Данные об эффективности базового скрининга представлены для таких аномалий, как трисомии (Т) Т21, Т18 и Т13, и не включают данные 16 образцов с подтвержденным мозаицизмом и 49 образцов с аномалиями, выявляемыми только при полногеномном скрининге; результаты полногеномного скрининга представлены для RAA и частичных дупликаций и делеций.
- b. Доверительный интервал (ДИ), рассчитанный по методу Уилсона.
- c. В таблицу не включены данные семи случаев двуплодной беременности, для которых аномалия была правильно определена как Т21.
- d. В категорию RAA не включены аномалии по хромосомам 21, 18 и 13.
- e. В категорию любых аномалий включены данные образцов базового и полногеномного скрининга на анеуплоидии по половым хромосомам

Таблица 3. Соответствие результатов определения пола плода, полученных при использовании метода VeriSeq NIPT Solution v2, эталонным клиническим результатам¹

Результаты, полученные с помощью метода VeriSeq NIPT Solution v2	Физически наблюдаемый пол новорожденного		Результаты цитогенетического анализа					
	Женский	Мужской	XX	XY	XO	XXX	XXY	XYY
Процент соответствия	100 %	100 %	100 %	100 %	90,5 %	100 %	100 %	91,7 %

дупликации и делеции размером ≥ 7 Мб и SCA, а для определения достоверности результатов провели сравнение с клиническими данными. Высокая чувствительность и специфичность результатов продемонстрирована в отношении распространенных трисомий, RAA, а также частичных дупликаций и делеций размером ≥ 7 Мб. Показана высокая степень совпадения пола плода, определенного во время тестирования и наблюдаемого клинически, а также низкая частота ошибок при первом тестировании образца — 1,2 % (таблица 2 и таблица 3)¹.

Быстрый результат

Метод VeriSeq NIPT Solution v2 позволяет проводить НИПТ с использованием быстрого трехэтапного рабочего процесса, который обеспечивает получение точных результатов примерно за сутки (таблица 4). Благодаря простому автоматизированному рабочему процессу один лаборант может проанализировать 24–96 образцов менее чем за 8 часов, при этом время работы, требующей непосредственного участия человека, будет минимальным. Для таргетного секвенирования и методов на основе массивов, как правило, используются более масштабные лабораторные протоколы, для выполнения которых требуется больше ручной работы.

Таблица 4. Выполнение НИПТ при помощи VeriSeq занимает чуть больше суток

Этап	Время, затрачиваемое персоналом	Общее время выполнения
Подготовка образца и подготовка библиотеки	~2 часа	~8 часов
Секвенирование	~15 минут	~14 часов
Анализ данных и создание отчета	Н/П	~4 часа
Общее время	~2,25 часа	~26 часов

Фактическое время может отличаться в зависимости от процедур конкретной лаборатории. Н/П — неприменимо

Низкая частота ошибок тестирования

Ошибки тестирования, при которых невозможно распознать дисомии или анеуплоидии, — важный фактор, влияющий на достоверность и клиническую ценность НИПТ. Частота ошибок тестирования при проведении НИПТ существенно различается в зависимости от используемого теста. В случае тестов с применением целевого подхода или одного полиморфного метода наблюдается более высокая частота первичных ошибок тестирования по сравнению с NGS⁸. При использовании метода VeriSeq NIPT Solution v2 проводится полногеномное секвенирование, что позволяет получить достаточное количество данных для всех хромосом; при этом сохраняется точность и не увеличивается частота ошибок или ложноположительных результатов.

В клиническом исследовании валидации метода частота ошибок при первом тестировании образца составляла 1,2 %. В лабораторной практике один образец крови позволяет получить достаточное количество плазмы, чтобы, при необходимости, повторить рабочий процесс НИПТ методом VeriSeq[®]. При повторном выполнении тестирования частота первичных ошибок для одного и того же образца снижалась с 2 % до 1,3 %⁹.

Простое адаптивное решение для диагностики *in vitro*

Интегрированный метод VeriSeq NIPT Solution v2 обеспечивает все необходимое для запуска анализа. Автоматизированный рабочий процесс легко адаптируется для анализа 24, 48 или 96 образцов за один запуск, позволяя эффективно и гибко использовать ресурсы в ходе анализа. В зависимости от образца лаборатория может выбрать базовый или полногеномный скрининг.

Автоматизированный рабочий процесс

При проведении полностью автоматизированного анализа методом VeriSeq NIPT используется простой рабочий процесс, который минимизирует время, затрачиваемое лаборантом, и снижает вероятность ошибок. Для выполнения протокола необходимо 7–10 мл материнской периферической цельной крови, собранной в рекомендованную пробирку для получения крови (Blood Collect Tube, BCT) Streck. Оптимизированные наборы для подготовки образца для анализа методом VeriSeq NIPT содержат реагенты и этикетки для подготовки библиотек секвенирования свободно циркулирующей ДНК (сцДНК). Такие этапы, как отделение плазмы, выделение сцДНК и подготовка библиотеки без ПЦР, включая создание планшетов для количественного анализа, количественный анализ библиотек и объединение библиотек, автоматизированы при использовании лабораторной рабочей станции VeriSeq NIPT Microlab STAR (система Microlab STAR компании Hamilton, настроенная специально для использования с рабочим процессом VeriSeq NIPT). Удобный диспетчер рабочих процессов VeriSeq NIPT Workflow Manager контролирует все аспекты подготовки образца, включая отслеживание образцов.

Секвенирование

Образец материнской крови содержит фрагменты сцДНК разной длины. Как правило, источником более длинных фрагментов является мать, а более коротких — плод (рисунок 2)¹⁰. Метод VeriSeq NIPT Solution v2 позволяет быстро и эффективно определить длину всех фрагментов сцДНК в одном образце и сосредоточиться на анализе более коротких фрагментов сцДНК методом парных прочтений. Это возможно благодаря системе Illumina NextSeq[™] 550Dx System, которая выполняет высокопроизводительное NGS-секвенирование¹¹ и сопоставима по цене с настольной системой (таблица 5).

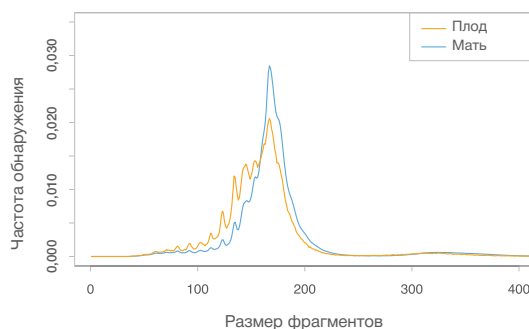


Рисунок 2. Сравнение размера фрагментов сцДНК матери и плода: при секвенировании методом парных прочтений выполняется дифференциация фрагментов сцДНК по размеру. Как правило, источником более длинных фрагментов является мать, а более коротких — плод

Таблица 5. Технические характеристики прибора для NGS

Параметр	Спецификация
Длина прочтения	2 × 36 п. о.
Тип файла секвенирования	Файл в формате BCL
Выходные данные секвенирования	400 млн прочтений
Время выполнения запуска	~14 часов
Мультиплексирование	24 или 48 образцов на запуск

Анализ на рабочем месте

Анализ данных выполняется на специальном сервере VeriSeq Onsite Server v2 с помощью программного обеспечения для диагностики *in vitro* VeriSeq NIPT Assay Software v2. Сервер автоматически обрабатывает данные секвенирования. В очередь для анализа на одном сервере можно добавить несколько партий образцов. Отсутствие необходимости в отправке данных для анализа экономит время и позволяет не идентифицировать образцы.

Программное обеспечение VeriSeq NIPT Assay Software v2

Программное обеспечение VeriSeq NIPT Assay Software v2 выполняет фильтрацию и картирование прочтений на референсный геном. Усовершенствованный алгоритм определяет плотность прочтений на хромосому (сегмент) и помогает определять и дифференцировать анеуплоидию и частичные дупликации и делеции. Программное обеспечение также проводит оценку фетальной фракции для каждого образца и создает соответствующий отчет. Для оценки статуса анеуплоидии данные о фетальной фракции объединяются с данными об охвате секвенирования и другими статистическими исходными данными, полученными во время секвенирования.

Для обеспечения низкой частоты ошибок при тестировании программное обеспечение VeriSeq NIPT Assay Software v2 оснащено таким показателем оценки качества образца, как индивидуализированный критерий достоверности выявленной анеуплоидии плода (individualized fetal aneuploidy confidence test, iFACT). Критерий iFACT показывает, обеспечил ли анализ достаточный охват секвенирования для распознавания анеуплоидии или частичной дупликации и делеции, учитывая оценку фетальной фракции для каждого образца, даже в случае образцов с низкой фетальной фракцией¹². Благодаря такому динамическому разделению программное обеспечение VeriSeq NIPT Assay Software v2 может сообщать об образцах с низкой фетальной фракцией, что позволяет обеспечивать низкую частоту ошибок при тестировании¹.

Создание отчетов

После анализа данных программное обеспечение VeriSeq NIPT Assay Software создает отчет о положительном или отрицательном результате обнаружения анеуплоидии — Aneuploidy Detected (Анеуплоидия выявлена) или No Aneuploidy Detected (Анеуплоидия не выявлена) — для хромосом, протестированных в каждом образце. В случае обнаружения частичных делеций или дупликаций в отчете представлены точные координаты таких изменений в геноме. Информация сохраняется в виде файла в формате CSV с возможностью интеграции в имеющуюся систему управления лабораторной информацией (Laboratory Information Management System, LIMS). Данные можно использовать для создания пользовательского клинического отчета.

Полная поддержка при применении

Для беспрепятственной интеграции метода VeriSeq NIPT Solution v2 в среду лаборатории предусмотрена установка всей системы квалифицированным сервисным инженером компании Illumina и обучение персонала на рабочем месте. Компетентные научные сотрудники компании Illumina вместе с персоналом лаборатории поэтапно выполняют выделение ДНК из образца, подготовку библиотеки, секвенирование и анализ (таблица 6). После завершения подготовки и начала использования данного метода в лаборатории сотрудники службы технической поддержки компании Illumina предоставляют постоянную поддержку.

Таблица 6. Обучение методу VeriSeq NIPT Solution v2

Тема	Подробная информация
Ознакомление с методом VeriSeq NIPT Solution v2	На семинаре рассматривается рабочий процесс и анализ <ul style="list-style-type: none"> Руководство по вспомогательному оборудованию Руководство по расходным материалам Протокол получения образца крови Протокол отделения плазмы
Обучение работе с прибором	Обучение на рабочем месте <ul style="list-style-type: none"> Необходим установленный прибор
Проверка рабочего места	Требуется подтверждение на рабочем месте <ul style="list-style-type: none"> Установки вспомогательного оборудования Наличия необходимых реагентов Подключения компонентов системы
Обучение на рабочем месте	Выполнение анализа научным сотрудником компании Illumina <ul style="list-style-type: none"> Предварительно протестированные образцы плазмы с известными рабочими характеристиками (предоставляются компанией Illumina) Поэтапное выполнение анализа, начиная с отделения плазмы до работы с прибором и анализа данных Обучение анализу данных
Проверка полученных знаний на рабочем месте	Выполнение анализа персоналом лаборатории <ul style="list-style-type: none"> Предварительно протестированные образцы плазмы с известными рабочими характеристиками (предоставляются компанией Illumina)

Резюме

Метод VeriSeq NIPT Solution v2 вывел доступность, надежность и возможности НИПТ на новый уровень. Теперь лаборатории могут использовать технологию NGS, чтобы получать быстрые, надежные и высокоточные результаты НИПТ с низкой частотой ошибок.

Дополнительная информация

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

Информация для заказа

Изделие	Номер по каталогу
Набор для подготовки образцов VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (24 samples)	20025895
Набор для подготовки образцов VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (48 samples)	15066801
Набор для подготовки образцов VeriSeq NIPT Sample Prep Kit (96 samples)	15066802
Программное обеспечение VeriSeq NIPT Assay Software v2	20047024
Сервер VeriSeq Onsite Server v2	20028403 20047000
Пробирка для выделения свободно циркулирующей ДНК Streck BCT (CE)	15073345
Прибор NextSeq 550Dx Instrument	20005715
Набор реагентов NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5, 75 cycles	20028870

Заявление о целевом использовании

VeriSeq NIPT Solution v2 представляет собой метод диагностического анализа *in vitro*, предназначенный для скринингового тестирования беременных женщин со сроком гестации не менее 10 недель для выявления генетических аномалий всех хромосом плода в образцах материнской цельной периферической крови. Метод VeriSeq NIPT Solution v2 предусматривает полногеномное секвенирование для выявления частичных дупликаций и делеций для всех аутосом и статуса анеуплоидии для всех хромосом. Тестирование позволяет получать отчеты о анеуплоидии по половым хромосомам (SCA). Результаты, полученные с помощью данного метода, нельзя использовать в качестве единственного основания для постановки диагноза или принятия других решений в отношении ведения беременности.

illumina®

Тел.: +1 800 809 45 66 (бесплатно для США) | +1 858 202 45 66
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© Illumina, Inc., 2021. Все права защищены. Все товарные знаки являются собственностью компании Illumina, Inc. или их соответствующих владельцев. Дополнительная информация об определенных товарных знаках представлена на сайте www.illumina.com/company/legal.html.
M-APJ-00036 RUS v2.0

Источники

- 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, 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
- 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 feto-placental disease.](#) *Sci Transl Med.* 2017;9(405)
- 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
- 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
- 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
- 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, Nicolaidis 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.