

# 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 2300 Proben
- Zuverlässige Testperformance<sup>1</sup> mit hoher Genauigkeit, schnellen Ergebnissen und geringen Fehlerraten
- Einfache, skalierbare IVD-Lösung zur Analyse von 24, 48 oder 96 Proben pro Lauf



## Einleitung

Nichtinvasive pränatale Tests (NIPT) mit Sequenzierung der nächsten Generation (NGS) liefern zuverlässige Screening-Ergebnisse für fetale chromosomale Aneuploidien bereits in der 10. Schwangerschaftswoche – mit einem einzigen Probenröhrchen mütterlichen Bluts.<sup>2,3</sup> VeriSeq NIPT Solution v2 nutzt die Vorteile der leistungsstarken Illumina NGS-Technologie für einen Genomsequenzierungs-Ansatz in NIPT und erweitert die Testmenüoptionen durch Einbeziehung häufiger Aneuploidien (Chromosomen 21, 18 und 13), seltener autosomaler Aneuploidien (RAAs), ausgewählter Geschlechtschromosomen-Aneuploidien (SCAs) und partieller Duplikationen und Deletionen  $\geq 7$  Mb für alle Autosomen.

VeriSeq NIPT Solution v2 erlaubt ein umfassendes Screening der fetalen Chromosomen mit einem breiten Testmenü, genauen Ergebnissen und niedrigen Fehlerraten und ermöglicht fundierte, zeitnahe Entscheidungen zum Schwangerschaftsmanagement.<sup>1</sup> Mit Reagenzien, Instrumenten, Software, Installation und Schulung ist VeriSeq NIPT Solution v2 eine automatisierte, zuverlässige Lösung für hausinterne NIPT (siehe [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  $\geq 7$  Mb übersehen, die mit fetalen Anomalien und Entwicklungsverzögerungen in Verbindung gebracht werden können. Die Rate positiver Screening-Ergebnisse beim NIPT beträgt 0,12 %.<sup>4</sup> Bei diesen Tests werden auch Schwangerschaften übersehen, die positiv auf RAAs getestet wurden, was mit negativen Folgen wie Fehlgeburten, intrauteriner Wachstumsrestriktion (IUGR, Intrauterine Growth Restriction), uniparentaler Disomie (UPD), spontanen Frühgeburten und fetalen Anomalien verbunden sein kann.<sup>5</sup>

Tabelle 1: VeriSeq NIPT Solution v2, Übersicht

Parameter	Beschreibung
Methode	Genomsequenzierung
Bibliotheks-vorbereitung	ohne PCR
Chemie	Paired-End-Sequenzierung
Anzahl der Proben	24, 48 oder 96 je Batch
Dauer bis Bericht	ca. 26 h
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 für alle Autosomen $\geq 7$ Mb.

## Zuverlässige Testperformance

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

## Präzise Ergebnisse

VeriSeq NIPT Solution v2 wurde zur Ermittlung der klinischen Genauigkeit und Zuverlässigkeit getestet. Es wurde eine klinische Validierungsstudie mit Proben von betroffenen Schwangeren durchgeführt, die für den Test in Frage kamen, wenn klinische Ergebnisse vorlagen und die Einschlusskriterien für die Proben erfüllten. Die Kohorte umfasste ein Gestationsalter von mindestens 10 Wochen, Proben mit niedriger fetaler Fraktion sowie Zwillingsschwangerschaften. In der Studie wurden > 2300 mütterliche Proben mit bekannten Ergebnissen für Trisomie 21, Trisomie 18, Trisomie 13, RAAs, partielle Duplikationen und Deletionen  $\geq 7$  Mb für alle Autosomen und SCAs mit VeriSeq NIPT Solution v2 untersucht und die Ergebnisse mit klinischen Referenzwerten verglichen.



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 Datenanalyse-Software, die Berichten mit qualitativen Ergebnissen erstellen kann.

Tabelle 2: Klinische Performance von VeriSeq NIPT Solution v2<sup>1</sup>

	Trisomie 21 <sup>c</sup>	Trisomie 18	Trisomie 13	RAA <sup>d</sup>	Partielle Duplikationen und Deletionen ≥ 7 Mb	Beliebige Anomalie <sup>e</sup>
Sensitivität <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)
Zweiseitiges 95%-KI <sup>b</sup>	97,1 %, 100 %	91,4 %, 100 %	87,1 %, 100 %	82,3 %, 99,4 %	55,3 %, 86,8 %	92,7 %, 97,3 %
Spezifität	99,90 % (1982/1984)	99,90 % (1995/1997)	99,90 % (2000/2002)	99,80 % (2001/2005)	99,80 % (2000/2004)	99,34 % (1954/1967)
Zweiseitiges 95%-KI <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. 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 Zwillingschwangerschaften korrekt als T21 ermittelt, nicht in der Tabelle enthalten.
- d. RAA ohne die Chromosomen 21, 18 und 13.
- e. Beliebige Anomalie mit Proben aus grundlegenden und genomweiten SCA-Screenings.

Tabelle 3: Übereinstimmung der Ergebnisse von VeriSeq NIPT Solution v2 zur Klassifizierung des Fetusgeschlechts mit klinischer Referenz<sup>1</sup>

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

Die Ergebnisse zeigten eine hohe Sensitivität und Spezifität für häufige Trisomien, RAAs, partielle Duplikationen und Deletionen ≥ 7 Mb für alle Autosomen, hohe Übereinstimmung der fetalen Geschlechtsklassifizierung mit dem klinischen Ergebnis und eine niedrige Fehlerrate von 1,2 % beim ersten Durchgang (siehe [Tabelle 2](#) und [Tabelle 3](#)).<sup>1</sup>

### 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 manuellem Aufwand analysieren. Zielgerichtete Sequenzierung und arraybasierte 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 h	ca. 8 h
Sequenzierung	ca. 15 Minuten	ca. 14 h
Datenanalyse und Berichterstellung	n. z.	ca. 4 h
Gesamtdauer	ca. 2,25 h	ca. 26 h

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

### Geringe Testfehlerraten

Testfehler, d. h. Fälle, in denen kein Call für Disomie oder Aneuploidie erzeugt werden kann, sind ein wichtiger Faktor für 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 einer einzelnen polymorphen Methode sind die Raten für primäre Testfehler höher als bei NGS.<sup>6</sup> VeriSeq NIPT Solution v2 liefert dank Genomsequenzierung umfangreiche Daten zu allen Chromosomen, ohne die Genauigkeit zu beeinträchtigen oder die Fehler- oder Falsch-Positiv-Raten zu erhöhen. In der klinischen Validierungsstudie lag die Fehlerquote beim ersten Durchgang bei 1,2 %.<sup>1</sup> In der Laborpraxis steht aus der ersten Blutentnahme ausreichend Plasma zur Verfügung, um den VeriSeq-NIPT-Workflow bei Bedarf zu wiederholen.<sup>7</sup> Im Rahmen einer klinischen Validierungsstudie wurde festgestellt, dass die endgültige Fehlerquote bei einer zweiten Blutabnahme 0,4 % betrug.<sup>7</sup>

### 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 Marker zur Vorbereitung von Sequenzierungsbibliotheken aus cfDNA. Die Plasmatisolation, 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 Blutprobe der Mutter enthält cfDNA-Fragmente unterschiedlicher Länge; längere Reads sind für mütterliche DNA angereichert, kürzere Reads dagegen für fetale DNA (**Abbildung 2**).<sup>8</sup> VeriSeq NIPT Solution v2 identifiziert schnell und effizient die Längen aller cfDNA-Fragmente einer einzelnen Probe und gewichtet kürzere cfDNA im Analysealgorithmus stärker. Dies geschieht mit der Paired-End-Sequenzierung auf dem Illumina NextSeq™ 550Dx System, das die Leistung von NGS<sup>9</sup> mit hohem Durchsatz und die Erschwinglichkeit eines Tischsystems verbindet (siehe **Tabelle 5**).

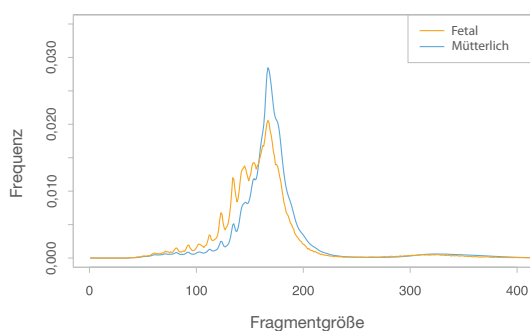


Abbildung 2: Größenvergleich zwischen den cfDNA-Fragmenten mütterlichen und fetalen Ursprungs: Die Paired-End-Sequenzierung unterscheidet cfDNA-Fragmente anhand ihrer Größe. Längere Fragmente sind für mütterliche DNA angereichert, kürzere dagegen für fetale DNA.

Tabelle 5: Voraussetzungen für die Performance des NGS-Geräts

Parameter	Spezifikation
Read-Länge	2 × 36 bp
Sequenzierungsdateityp	BCL-Datei
Sequenzierungsausgabe	ca. 400 Mio. Reads
Laufzeit	ca. 14 h
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.

Zur Gewährleistung niedriger Testfehlerraten enthält die VeriSeq NIPT Assay Software v2 den individualisierten fetalen Aneuploidie-Konfidenztest (individualized fetal aneuploidy confidence test, iFACT) zur Bewertung der Probenqualität. iFACT zeigt an, ob der Assay für die Schätzung der fetalen Fraktion jeder Probe eine ausreichende Sequenzierungscoverage generierte, um einen Aneuploidie- oder partiellen Duplikations- und Deletions-Call selbst für Proben mit niedriger fetaler Fraktion zu ermöglichen.<sup>10</sup> Durch diesen dynamischen Cutoff kann die VeriSeq NIPT Assay Software v2 auch Proben mit niedrigem fetalen Anteil erkennen, was die Anzahl der Testfehler reduziert.<sup>1</sup>

## 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 TAB-Datei ausgegeben, die in ein vorhandenes LIMS integriert werden kann. Mithilfe der Daten lässt sich ein individueller klinischer Bericht erstellen.

## Vollständig unterstützte Implementierung

Zur nahtlosen 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: Schulungen 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"> <li>• Anleitung zu Zusatzgeräten</li> <li>• Anleitung zu Verbrauchsmaterialien</li> <li>• Blutentnahmeprotokoll</li> <li>• Plasmaisolationsprotokoll</li> </ul>
Schulung zum Gerätebetrieb	Vor-Ort-Schulung <ul style="list-style-type: none"> <li>• Erfordert ein installiertes Gerät</li> </ul>
Standortbegehung	Prüfung vor Ort <ul style="list-style-type: none"> <li>• Installation von Zusatzgeräten</li> <li>• Benötigte Reagenzien</li> <li>• Konnektivität der Systemkomponenten</li> </ul>
Vor-Ort-Schulung	Assay-Durchführung durch einen Wissenschaftler von Illumina <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vorgetestete künstliche Plasmaproben mit bekannten Leistungsmerkmalen (von Illumina zur Verfügung gestellt)</li> <li>• Einweisung in die einzelnen Assay-Workflow-Schritte, von der Plasmaisolation bis zum Gerätebetrieb und zur Datenanalyse</li> <li>• Datenanalyseschulung</li> </ul>
Vor-Ort-Kompetenztest	Assay-Durchführung durch den Kunden <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vorgetestete künstliche Plasmaproben mit bekannten Leistungsmerkmalen (von Illumina zur Verfügung gestellt)</li> </ul>

## Zusammenfassung

VeriSeq NIPT Solution v2 revolutioniert die Anwenderfreundlichkeit, Zuverlässigkeit und Leistung von NIPT. Labore erhalten mithilfe von NGS schnelle, zuverlässige und hochgenaue NIPT-Ergebnisse mit geringen Fehlerraten.

## Weitere Informationen

VeriSeq NIPT Solution v2, [www.illumina.com/VeriSeqNIPT](http://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*-Diagnosteset und als Screeningtest für den Nachweis genomweiter fetaler genetischer Anomalien in mütterlichen peripheren Vollblutproben schwangerer Frauen vorgesehen, die sich mindestens in der 10. Schwangerschaftswoche befinden. 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 Grundlage 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. 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.



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

© 2022 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](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-01319 DEU v1.0