



THE 19th VIETNAM - FRANCE - ASIA - PACIFIC
CONFERENCE ON OBSTETRICS & GYNECOLOGY

NIPT – SÀNG LỌC TRƯỚC SINH KHÔNG XÂM LẤN

Quản lý chất lượng và sự tin cậy

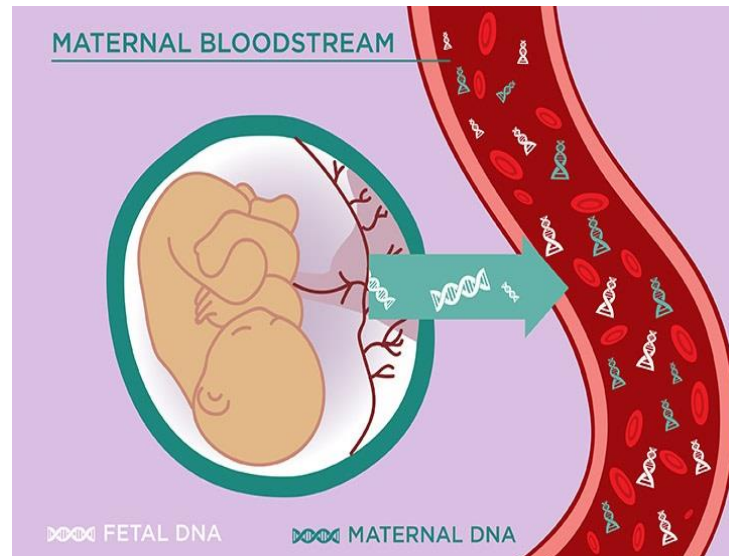
ThS.BS. Lê Thị Khánh Linh
Khoa Xét nghiệm Di truyền Y học
Bệnh viện Từ Dũ

Giới thiệu NIPT



Sàng lọc trước sinh không xâm lấn (NIPT)

Dựa vào phân tích DNA tự do
(cfDNA) trong máu mẹ.



- Nguồn gốc: nhau thai
- 5-7 tuần vô kinh- sau sinh 2 tiếng
- DNA trần
- cfDNA mẹ và con
- Fetal fraction

Công nghệ xét nghiệm NIPT



- MPS (massively parallel sequencing)
 - “counting method”
 - Chỉ số z-score
- Targeted sequencing
 - CSS (chromosome-selective sequence)
 - Điểm nguy cơ (risk score)
- SNPs sequencing
 - Phân tích tính đa hình
- Vanadis NIPT system biochemistry
 - Lai huỳnh quang

Công nghệ giải trình tự gen thể hệ mới ?



Thai bình thường

Chỉ **1.36%** cfDNA là Chr. 21



10% fetal fraction => chỉ có **0.136%** cf DNA thai

Thai bất thường

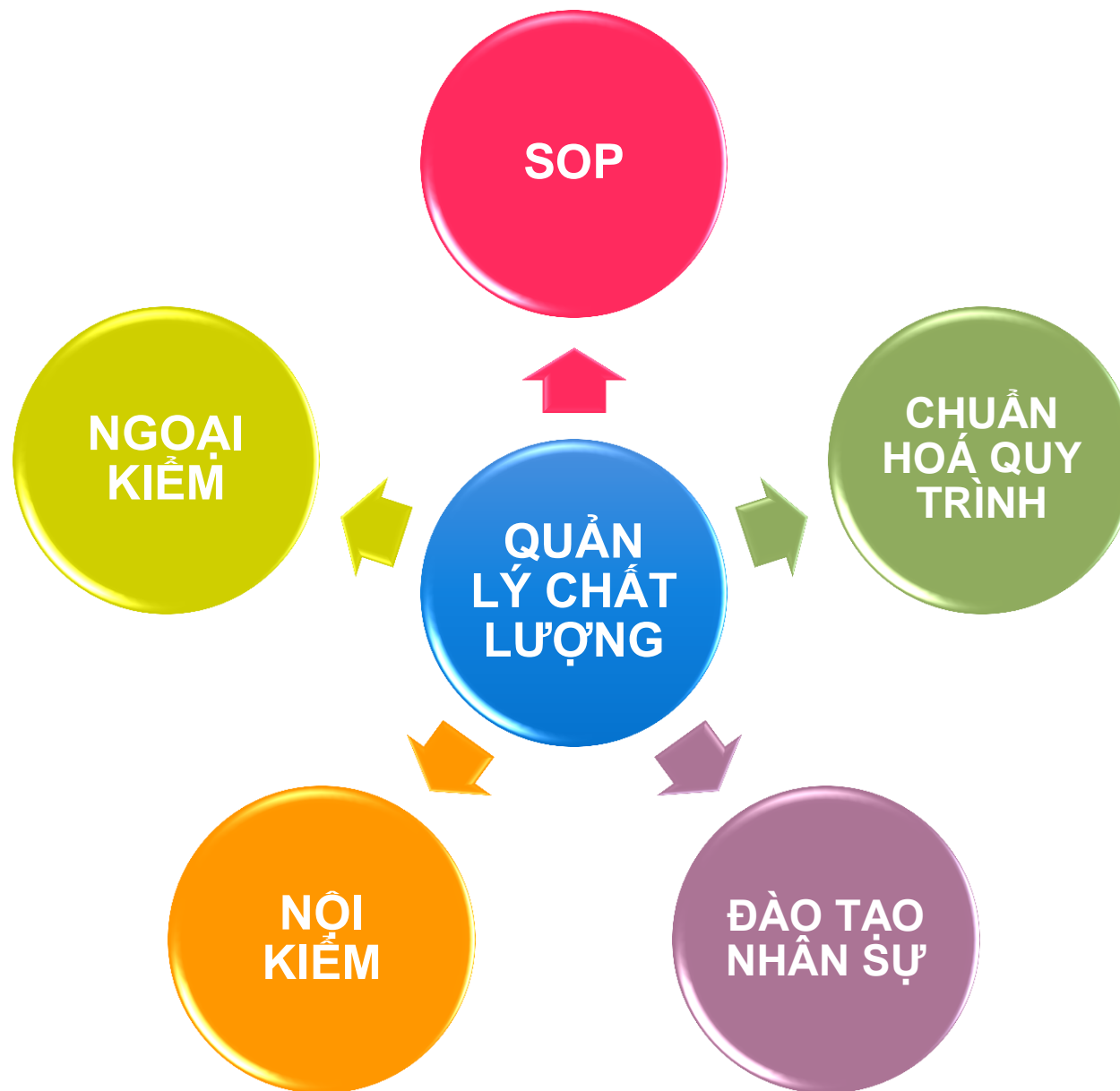


Chỉ **1.42%** cfDNA là Chr. 21



10% fetal fraction => chỉ có **0.142%** cf DNA thai

 Chỉ có **0.06% khác biệt !**





EUROPEAN COMMISSION
ENTERPRISE DIRECTORATE-GENERAL

Single Market : regulatory environment, standardisation and New Approach
Pressure equipment, medical devices, metrology

MEDDEV. 2.14/2 rev.1

February 2004

GUIDELINES ON MEDICAL DEVICES

IVD GUIDANCE : Research Use Only products

A GUIDE FOR MANUFACTURERS AND NOTIFIED BODIES

CE/IVD - RUO



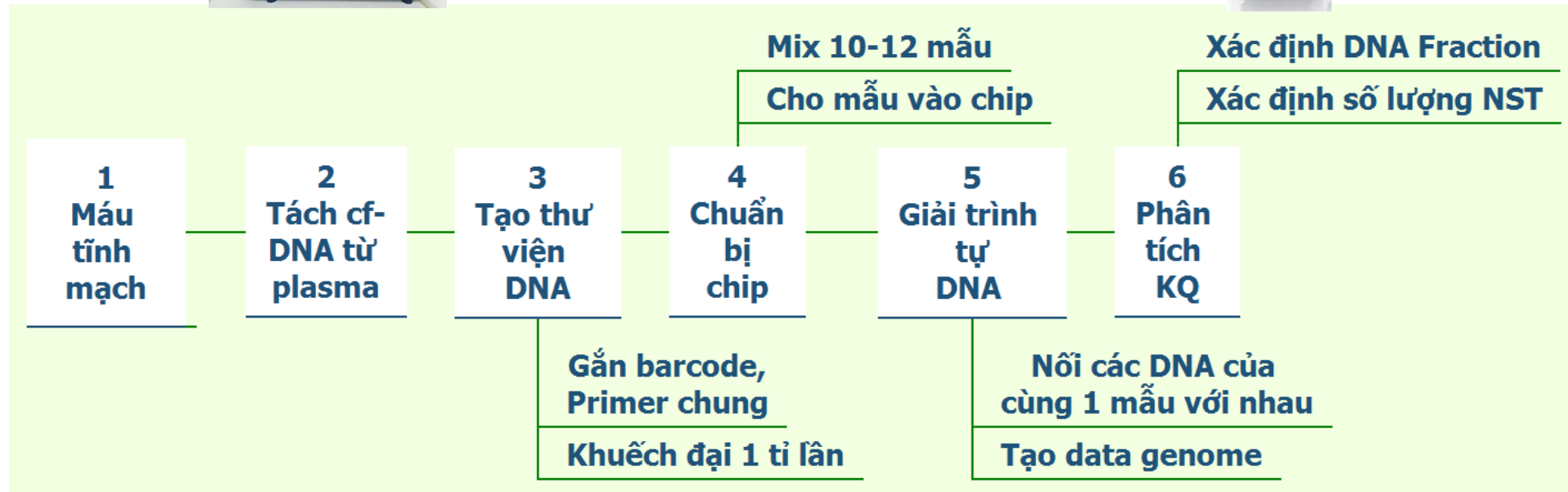
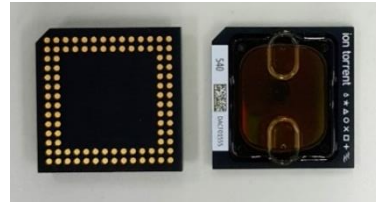
- **RUO (Research Use Only): chỉ sử dụng trong nghiên cứu**
- **CE-IVD (European Conformity In Vitro Diagnostic):
chẩn đoán trên người theo tiêu chuẩn của Châu Âu.**



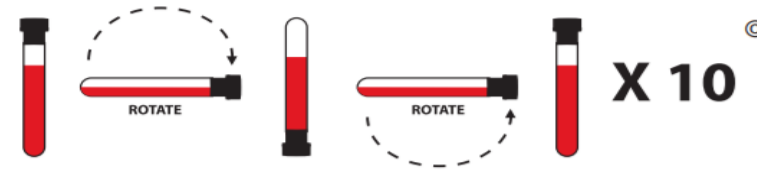


Chuẩn hoá Quy trình NIPT

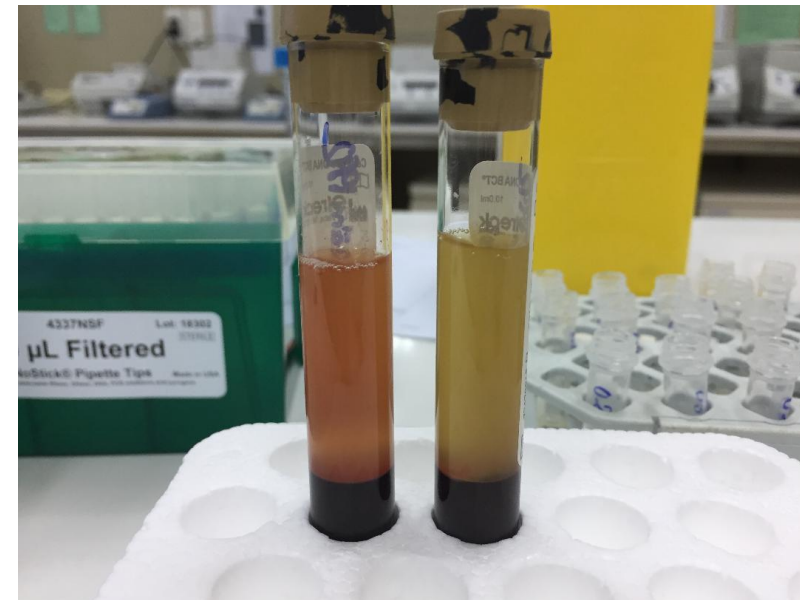
Quy trình NIPT tại BV Từ Dũ



Mẫu máu: thu nhận và bảo quản



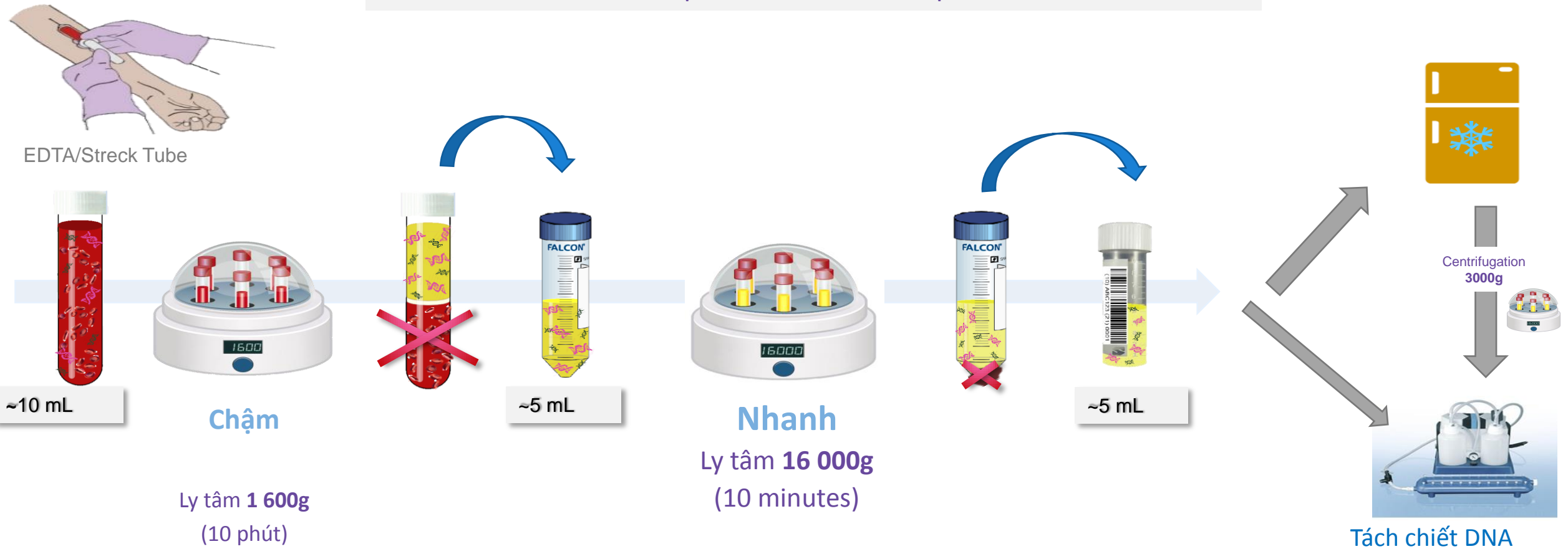
Chất kháng đông K_3EDTA



Tách plasma



Tách plasma từ máu toàn phần:



Tách chiết DNA tự do (cell-free DNA)



Plasma
+ Proteinase K
+ Buffer ACL



Ủ

60C trong 30 phút



Lyse

+ Buffer ACB



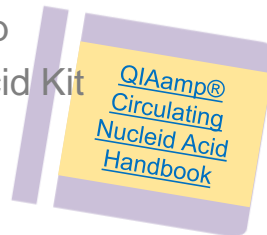
Ủ



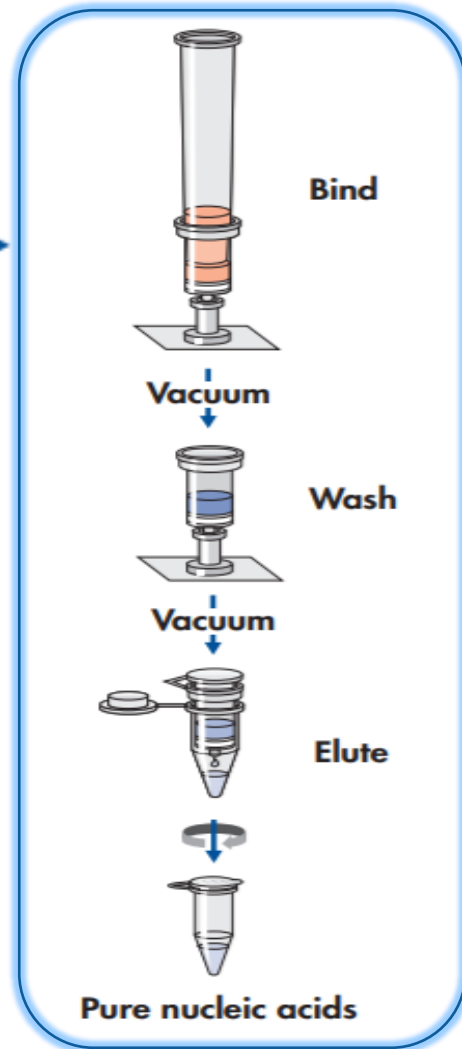
QIAvac 24



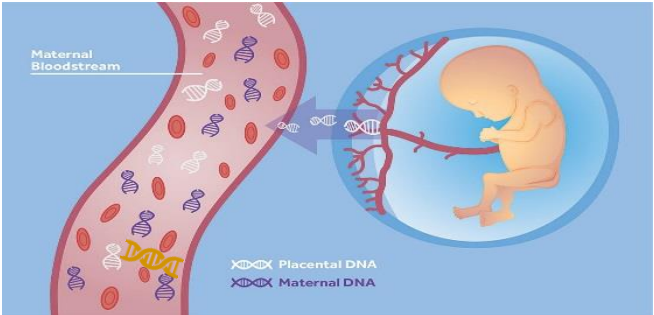
QIAGEN QIAamp
Circulating Nucleic Acid Kit
(cat 55114)



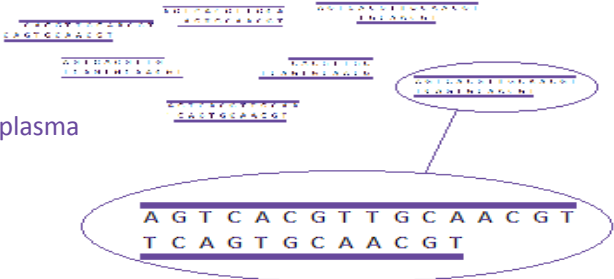
~ 2-3 giờ



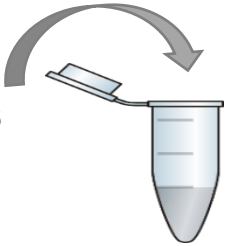
Chuẩn bị thư viện DNA



DNA fragments from plasma



+ Buffer
+ Enzymes



Temperature	Time
25°C	20 minutes
70°C	10 minutes
4°C	∞

Note: Ensure that the volume for the reaction is set to 30 µL.

Plate 1

1	2	3	4	5
BR 1107	BR 1108	ALB 1109	ALB 1104	ALB 1105
27 µL	27 µL	45 µL	27 µL	39 µL
Not used	Not used	Not used	Not used	Not used
E 27 µL	Not used	45 µL	27 µL	Not used
Not used	Not used	Not used	Not used	Not used
D 27 µL	Not used	45 µL	27 µL	Not used
Not used	Not used	Not used	Not used	Not used
F 27 µL	Not used	45 µL	27 µL	Not used
Not used	Not used	Not used	Not used	Not used
G 27 µL	Not used	45 µL	27 µL	Not used
Not used	Not used	Not used	Not used	Not used
H 27 µL	Not used	45 µL	27 µL	Not used
Not used	Not used	Not used	Not used	Not used

Reagent	Plate 1 Column for Reagent	Volume
Sample	-	25.5 µL
End Repair Buffer I	1	3 µL
End Repair Enzyme I	A2	1.5 µL
Total		30 µL

AGTCACGTTGCAACGT
TCAGTGCAACGTTGCA

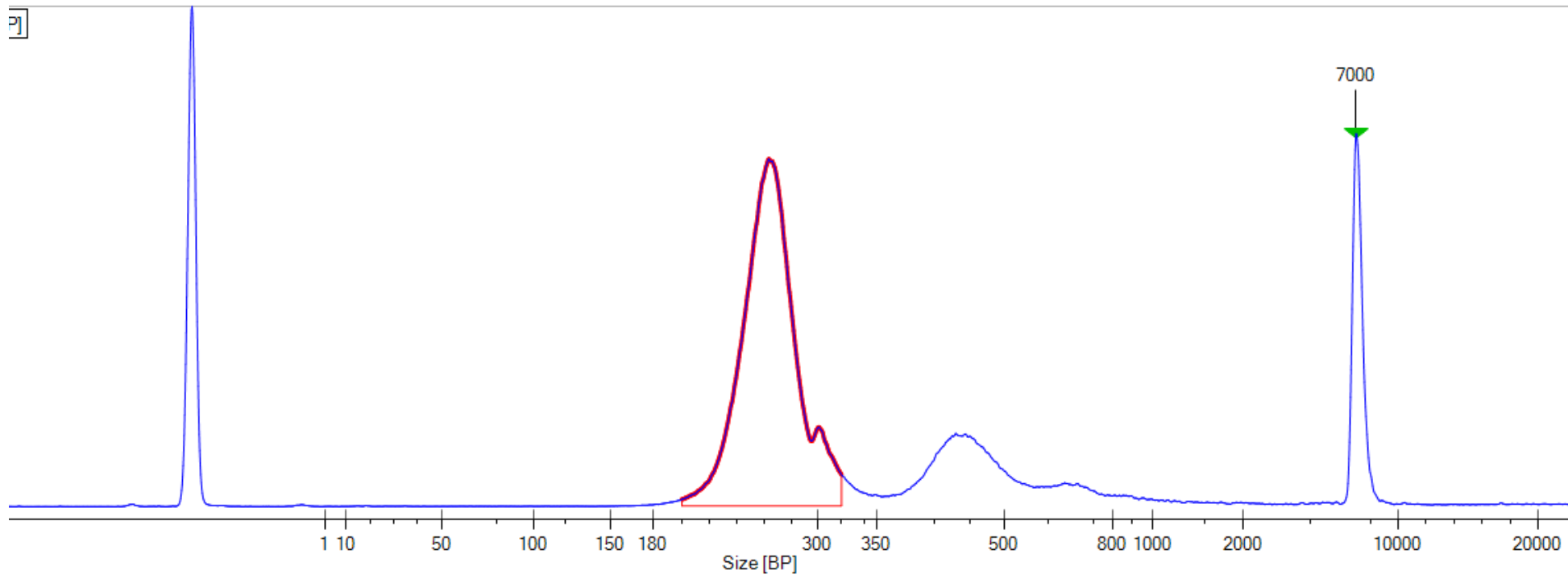


Định lượng cfDNA sau PCR



Kiểm tra
chất lượng

- ❑ **Chất lượng** : kiểm tra các đoạn DNA (kích thước, độ nhiễu..)
- ❑ **Số lượng** : Đo nồng độ DNA mỗi mẫu



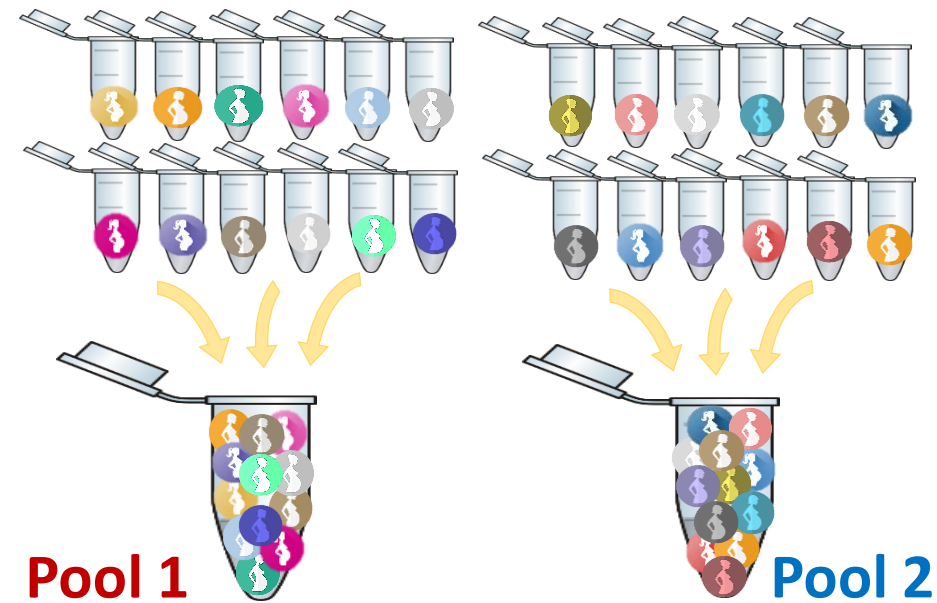
Tổ hợp DNA và đo kích thước DNA



DNA được:

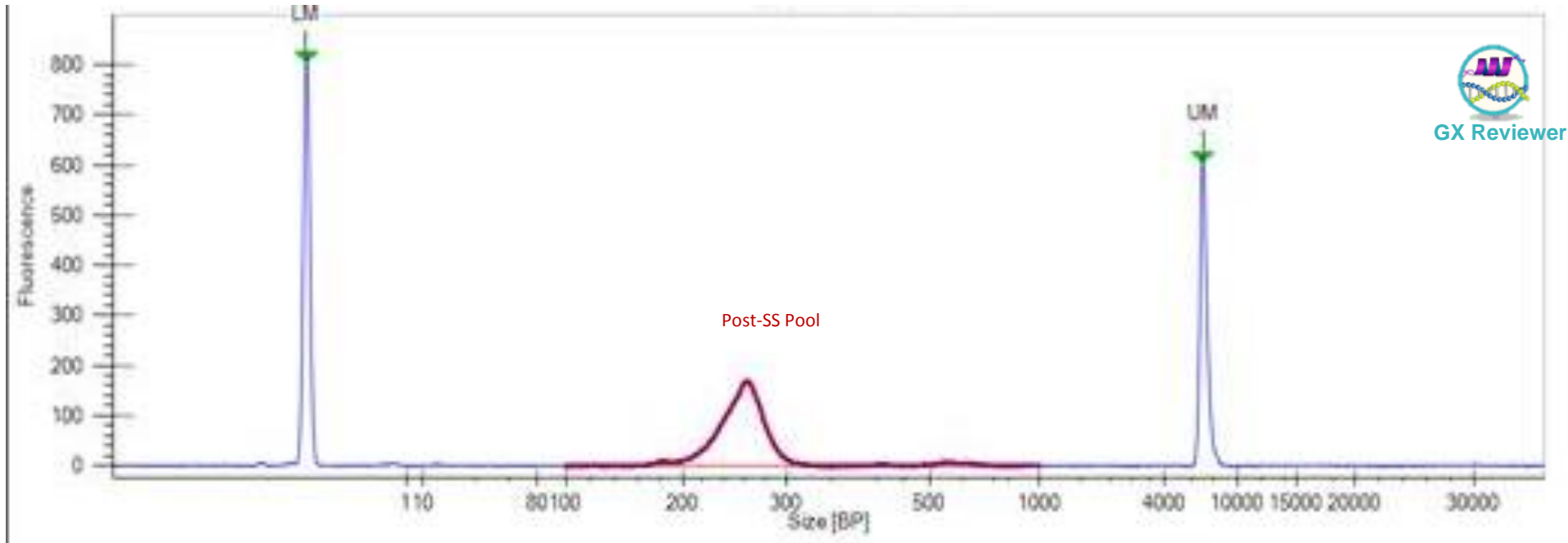
❖ Chuẩn hoá

❖ Kết hợp 12 mẫu



12 Mẫu/pool

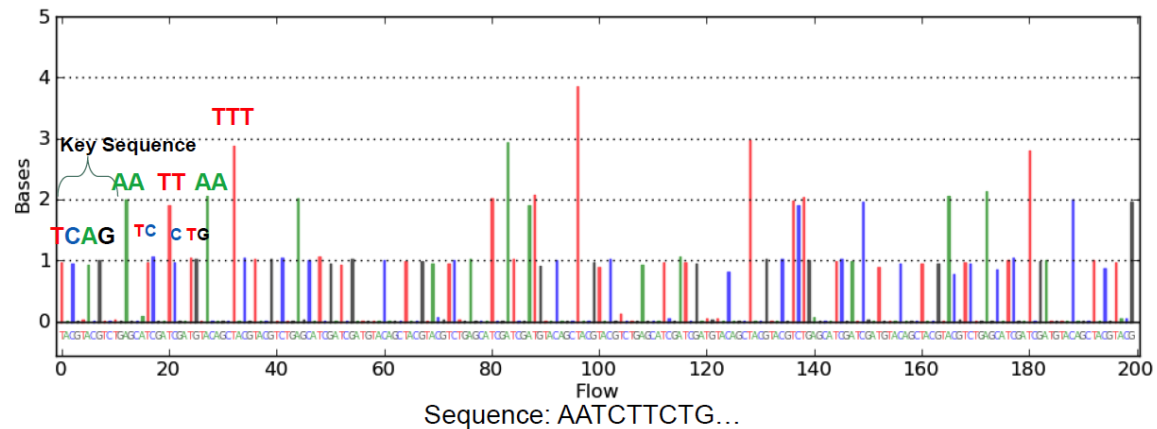
Định lượng DNA lần hai



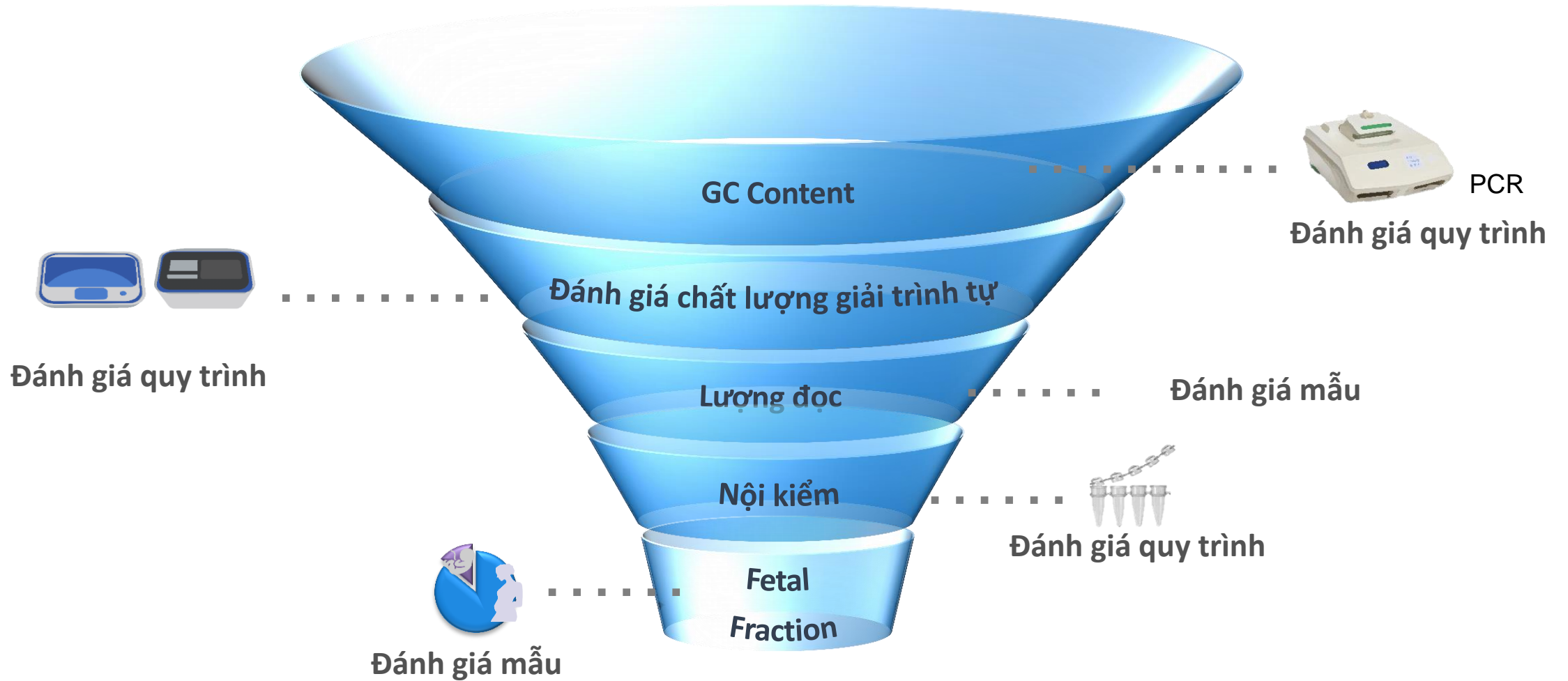
Đo nồng độ DNA bằng Labchip
GX Touch.



Chuẩn bị mẫu và Giải trình tự



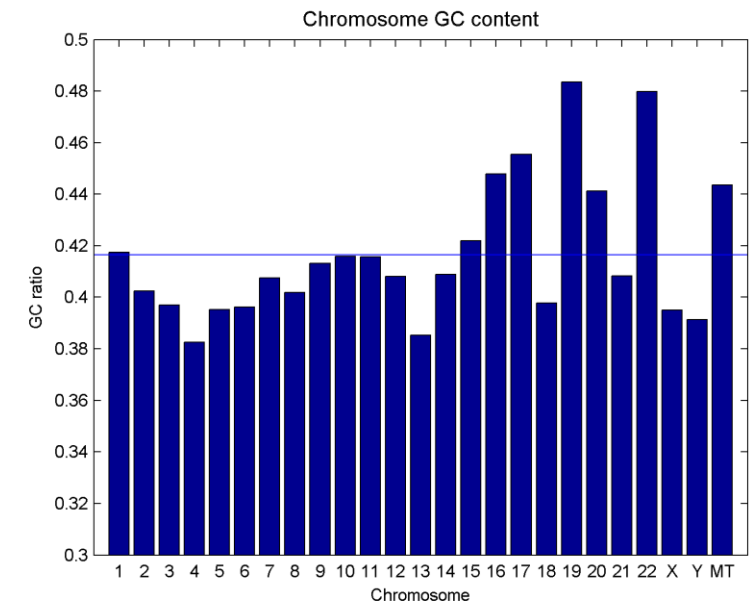
Kiểm soát chất lượng



GC content



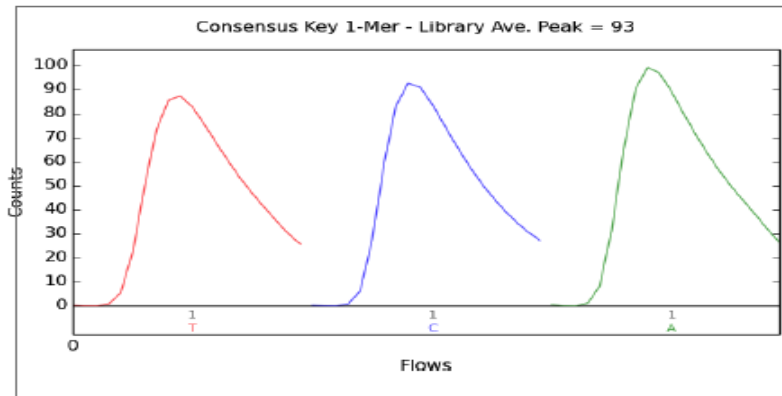
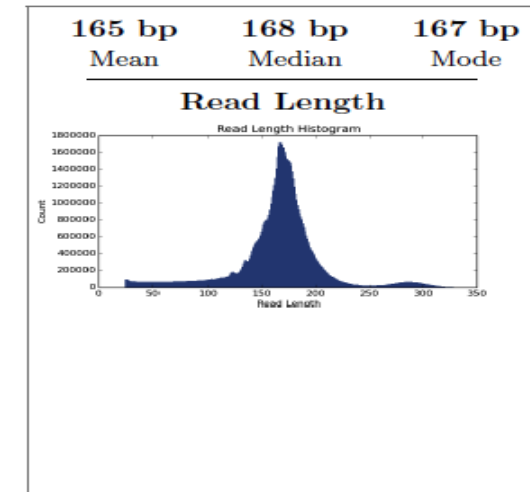
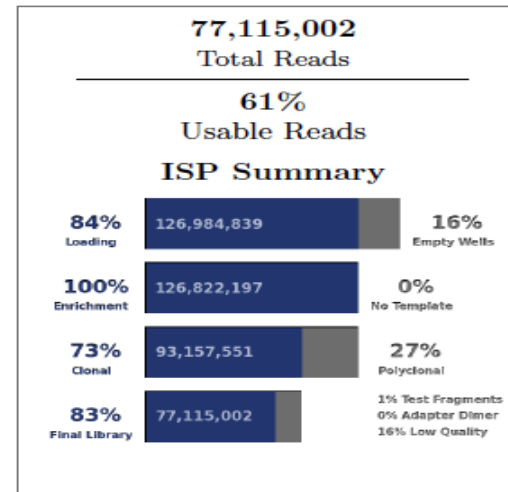
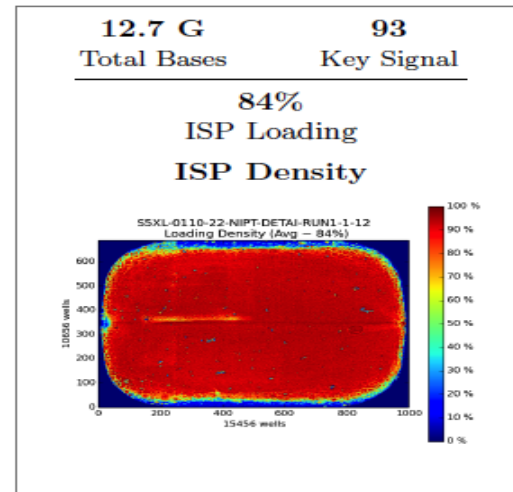
- Tỷ lệ Guanine-Cytosine trên NST
- Chiếm 40% DNA trong genome
- Thay đổi tỷ lệ trình tự đọc của NST cần phân tích và NST tham khảo
- Ảnh hưởng đến việc xác định sự khác biệt về số lượng trong trình tự đọc
- **GC correction:** loại bỏ ảnh hưởng của trình tự GC, cải thiện độ nhạy và độ đặc hiệu



Đánh giá chất lượng giải trình tự NGS



Run Summary



Addressable Wells	151,539,288	
With ISPs	126,984,839	83.8%
Live	126,822,197	99.9%
Test Fragment	569,754	00.4%
Library	126,252,443	99.6%
Library ISPs	126,252,443	
Filtered: Polyclonal	33,664,646	26.7%
Filtered: Low Quality	15,435,568	12.2%
Filtered: Adapter Dimer	37,227	00.0%
Final Library ISPs	77,115,002	61.1%

Số lượng đọc (read counts)



- Ion 540 Chip
- 150 triệu giếng
- 60-80 triệu đọc
- 200 bp
- **7-8 triệu đọc/ mẫu**



Nội kiểm (internal control)



Run control
RC01 PMH017
RC02 PMH018
RC03 PMH019
RC04 PMH022

- Nội kiểm: trisomy 21 dương tính
- 500,000 reads
- Đánh giá tiêu chuẩn đã được thiết lập

NỘI KIỂM KHÔNG ĐẠT: INVALID RUN

Thực hiện lại xét nghiệm

Fetal fraction



The American College of
Obstetricians and Gynecologists
WOMEN'S HEALTH CARE PHYSICIANS



Society for
Maternal-Fetal
Medicine

COMMITTEE OPINION

Number 640 • September 2015
(Reaffirmed 2017)

(This Committee Opinion Replaces Committee Opinion Number 545)

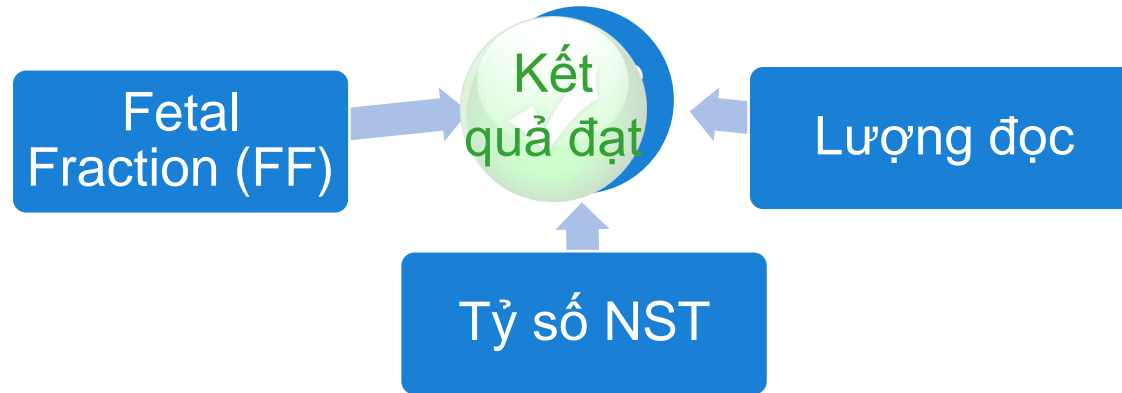
Committee on Genetics
Society for Maternal-Fetal Medicine

This document reflects emerging clinical and scientific advances as of the date issued and is subject to change. The information should not be construed as dictating an exclusive course of treatment or procedure to be followed.

Cell-free DNA Screening for Fetal Aneuploidy

- The fetal fraction is essential for accurate test results
- Fetal fraction of at least 4% for a reportable result
- Screen failure ranges from approximately 1% to 8%
- Results may not be obtained because of low fetal fraction...

Fetal fraction



Phát hiện bất thường nhiễm sắc thể với FF
 $\geq 2\%$ và $\leq 40\%$.

➤ $\geq 2\%$: QC **đạt**

➤ $< 2\%$: QC **không đạt**

Phân tích kết quả NIPT



- **IONA software (BS EN 62304, CE-IVD)**
 - Trisomy 21, 18, 13
 - Điểm nguy cơ $\geq 1:150$ là nguy cơ cao
 - Nguy cơ nền: combined test hoặc nguy cơ tuổi mẹ
- **DNAFolder (Patent US 20160026759A1)**
 - Các NST thường và NST giới tính
 - Z-score

Double check thông tin



Entry Validation Code Calculator
For use with the IONA® test Traceability Worksheet.

Revision 03, Mar. 2015.

Please enter/select the following:

Patient Date of Birth <i>Obtain from the Patient Data supplied with the test sample.</i>	<input type="text"/>
ION Proton chip barcode <i>Obtain from the IONA® Traceability Worksheet.</i>	<input type="text"/>
Sample Adaptor number (1-16) <i>Obtain from the IONA® Traceability Worksheet.</i>	<input type="text"/>
Test Instance ID <i>Obtain from the IONA® Traceability Worksheet.</i>	<input type="text"/>
Control Sample Configuration Pack ID <i>Please see the Software Configuration Sheet supplied with the IONA® Library Preparation Kit.</i>	<input type="text" value="PMH-CSC-0006RY"/>
IONA Configuration Pack ID <i>Please see the Software Configuration Sheet supplied with the IONA® Library Preparation Kit.</i>	<input type="text" value="PMH-ICP-141701RY"/>
Calculated Entry Validation Code <i>Please enter code on the 'Create Report' page in the IONA® Software.</i> <i>Note: Contains only characters A-Z and 0-9.</i>	<input type="text" value="#N/A"/>

Kết quả



PHIẾU KẾT QUẢ SÀNG LỌC TRƯỚC SINH KHÔNG XÂM LẤN

Họ tên: **HUÀ THỊ HUƠNG** (MSXN: NIPT-19-4003) Ngày sinh: 1983
Địa chỉ: Quận Tân Bình - TPHCM Điện thoại: 0975.448.469
Nơi gửi: Bệnh nhân tự đến Giới tính: Nữ
Chẩn đoán: Số thai: 1
Ngày, giờ LM: 02/05/2019 08:05 Ngày nhận: 02/05/2019 Loại mẫu: Máu Chất lượng: Đạt

Thiết bị: **ION S5 XL, ION Chef, IONA Software** Mã QT: **QTXN-DT.NIPT-01**
Phương pháp: DNA ngoại bào (cfDNA) được tách mẫu và được tạo thư viện DNA bằng kit IONA Test (CE-IVD, 98/79/EC) và giải trình tự bằng Chip 540 trên hệ thống ION Chef/ION S5 XL tự động. Tỷ lệ cfDNA thai và nguy cơ lệch bội nhiễm sắc thể của thai được tính bằng IONA Software (BS EN 62304, CE-IVD) kết hợp với DNAFolder (Patent US 20160026759A1).

Kết quả:

PHÂN TÍCH IONA (CE-IVD)

Tỷ lệ cfDNA thai: 13% (tiêu chuẩn $\geq 2,0\%$) Kiểm tra chất lượng: Đạt

Lệch bội	Nguy cơ nền	Điểm nguy cơ	Kết quả
Trisomy 21	1 : 238	< 1 : 1,000,000	Nguy cơ thấp
Trisomy 18	1 : 574	< 1 : 1,000,000	Nguy cơ thấp
Trisomy 13	1 : 1802	< 1 : 1,000,000	Nguy cơ thấp

Ghi chú:

- Đây là xét nghiệm sàng lọc số lượng nhiễm sắc thể của thai, KHÔNG có mục đích chẩn đoán, KHÔNG phát hiện bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể (xóa đoạn, đảo đoạn, chuyển đoạn).
- Âm tính giả, dương tính giả có thể xảy ra do: khảm nhiễm sắc thể ở thai hoặc mẹ, hoặc nguyên nhân khác.
- Đối với song thai chỉ khảo sát nhiễm sắc thể 31, 18, 13.
- Nguy cơ nền là nguy cơ theo Combined test (CT) hoặc tuổi mẹ. Ngưỡng nguy cơ cao của IONA là $\geq 1:150$ ($\sim 0,67\%$).
- Kết quả này chỉ áp dụng đối với nghiệm phẩm đã nhận như trên.
- TLTK: (1) Papageorgiou AT, et al (2016). Ultrasound Obstetrics Gynecology, 47:188-193. (2) Poon LC, et al. (2016) Ultrasound Obstet Gynecol, 47: 184-187. (3) Crea F, et al. (2017) Fetal Diagnosis and Therapy, 42:218-224.

IONA	Độ nhạy	(+) giả
T21	99%	0,03%
T18	92%	0,03%
T13	100%	0,02%

Đề nghị: Tham vấn với bác sĩ về kết quả xét nghiệm.

Người XN: CN. Nguyễn Thị Lan Anh

TP.HCM, ngày 10 tháng 5 năm 2019

Trưởng khoa

Người phân tích

TS. BS. Nguyễn Khắc Hán Hoan

ThS.BS. Lê Thị Khánh Linh

Năng lực IONA test



The IONA [®] test	Tỷ lệ phát hiện (độ nhạy)	Tỷ lệ dương tính giả (FPR)	Giá trị tiên đoán dương (PPV)
Trisomy 21	99%	0.03%	99%
Trisomy 18	92%	0.03%	93%
Trisomy 13	100%	0.02%	94%
NST giới tính	Tỷ lệ chính xác > 99%		

Hiệu quả lâm sàng IONA kit trên 20,000 mẫu lâm sàng

The IONA[®] test for first-trimester detection of trisomy 21, 18 and 13. Poon LC, Dumidrascu-Diris D, Francisco C, Fantasia I, Nicolaides KH



Sensitivity	Natera Panorama™	Sequenom Materni21™	Illumina Verifi	Ariosa Harmony™	Yourgene NIPT
False Positive Rate					
Trisomy 21 (Down Syndrome)	>99% 0.X%	99.1% 0.X%	>99.9% 0.2%	>99% <0.1%	>99% <0.03%
Trisomy 18 (Edwards Syndrome)	96.4% <0.1%	>99.9% 0.4%	97.4% 0.4%	>98% <0.1%	>99.9% <0.02%
Trisomy 13 (Patau Syndrome)	>99% 0%	91.7% 0.3%	87.5% 0.1%	80% <0.1%	99.9% <0.02%
Monosomy X (Turner Syndrome)	92.9% <0.1%	94.4% 0.6%	95% 1%	91.5% 0%	>93% <0.06%
Sex Chromosome Trisomies	>99%	96.2%	67-100%	99%	>93% <0.06%
Female	>99.9% 0%	99.1% 0.5%	97.6% 0.8%	99% 0%	>99.9% 0%
Male	>99.9% 0%	99.4% 0.9%	99.1% 1.1%	100% 1%	>99.9% 0%
PPV% (T21,T18,T13,XY)	91,93,38,50	99,97,93,NA	45,40,NA,NA	82-----	95,91,83,74
No call rate	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%

Đào tạo nhân sự

Certificate of Training

the **IONA** test

The first IVD product for non-invasive prenatal screening

Training commenced 28 Jan 19

Training completed 31 Jan 19

This is to certify that **Dr. Lê Thị Khánh Linh** of **Từ Dũ Hospital**
has successfully completed the **IONA**® test workflow training and is awarded this
certificate by **Premaitha Health**



Date Issued 31 Jan 19

Trained by **Melissa Berenger** and **Dayne Bromley**

Authorised Trainer Signature

TRN002-FRM001 Rev C

CERTIFICATE

Yourgene Bioscience Company
certifies that

Dr. Le Thi Khanh Linh

Department of Medical Genetics

Tu Du Hospital

284 Công Quỳnh, Phạm Ngũ Lão, Hồ Chí Minh,
Phạm Ngũ Lão Quận 1 Hồ Chí Minh, Vietnam

has completed
Yourgene NIPT solution validation
and qualified to offer Yourgene NIPT
as a Laboratory Developed
Screening Test.

The certificate is valid from **2017-Jul-21** Certificate No. P009 TWS

Instructor: Han-Chiang Chin

Certificate 認證證書

Ưu điểm NIPT thực hiện tại BVTD



- **Xét nghiệm NIPT đầu tiên trên thế giới có CE-IVD**
- Quy trình kiểm soát chất lượng chặt chẽ
- **Nội kiểm (run control)**
- Phân tích 24 nhiễm sắc thể bằng **hai phần mềm**
- **Chuẩn bị tự động hoá hoàn toàn quy trình**

