

# TruSight™ Cystic Fibrosis

Una soluzione di sequenziamento di nuova generazione per diagnostica *in vitro* autorizzato dall'FDA, che unisce un ampio pannello di varianti di fibrosi cistica funzionalmente valido e rilevante dal punto di vista clinico a una panoramica completa del gene *CFTR*.

## Punti principali

- **Due saggi consolidati in un solo flusso di lavoro**  
Un flusso di lavoro di preparazione delle librerie consente agli utenti di eseguire due saggi pre-esistenti di test CF
- **Copertura completa delle varianti *CFTR***  
Il pannello di varianti etniche e il sequenziamento dei geni *CFTR* completo permettono di coprire le varianti rilevanti dal punto di vista clinico
- **Processività flessibile**  
L'efficiente preparazione delle librerie fornisce una processività altamente flessibile di 24-96 campioni per corsa
- **Risultati accurati e di facile interpretazione**  
Risultati accurati e riproducibili presentati in un report chiaro e conciso



**Figura 1: TruSight Cystic Fibrosis**—TruSight Cystic Fibrosis unisce i saggi pre-esistenti in un unico kit per aumentare la versatilità e la processività del campione.

## Introduzione

La fibrosi cistica (FC) colpisce circa 70.000 bambini e adulti in tutto il mondo.<sup>1</sup> La malattia si presenta quando un individuo eredita due varianti che causano la malattia nel trans del gene del recettore della membrana della fibrosi cistica (*CFTR*). Milioni di persone sono portatori di un singolo gene mutato e non presentano alcun sintomo. Molte di queste persone, dette portatori, non sono consapevoli della loro mutazione e del rischio di trasmettere il gene della fibrosi cistica ai loro figli. Nei soli Stati Uniti, la frequenza dei portatori è stimata al 3% della popolazione.<sup>2</sup>

La FC colpisce una popolazione diversificata, con la più alta incidenza riconosciuta osservata in individui di origine caucasica.<sup>3</sup> La diagnosi e il trattamento precoce della FC possono migliorare sia la sopravvivenza che la qualità della vita.<sup>4</sup> Tuttavia, gli attuali metodi di test della FC si concentrano sulle varianti *CFTR* più comunemente presenti nella popolazione caucasica e pertanto rischiano potenzialmente di non rilevare le varianti causali della FC in altri segmenti demografici che potrebbero avere rilevanza clinica. Di conseguenza, le famiglie possono subire lunghi periodi di test genetici aggiuntivi e i pazienti potrebbero subire un ritardo nel ricevere le cure necessarie.

Per affrontare queste sfide, Illumina offre il saggio MiSeq™Dx Cystic Fibrosis 139-Variant e il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing. Questi saggi sono stati i primi test di sequenziamento di nuova generazione (NGS) basati su test diagnostici *in vitro* (IVD) per la fibrosi cistica a essere stati autorizzati dalla Food and Drug Administration (FDA). Questi test preesistenti sono stati consolidati in un'unica soluzione NGS per il test della fibrosi cistica: TruSight Cystic Fibrosis (Figura 1).

## TruSight Cystic Fibrosis consolida i saggi FC pre-esistenti

TruSight Cystic Fibrosis unisce il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant e il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing in un unico kit al fine di aumentare la versatilità e la processività del campione

con reagenti per il sequenziamento aggiornati mantenendo lo stesso flusso di lavoro, le stesse specifiche del prodotto e le stesse prestazioni dei saggi originali. Nell'integrazione in TruSight Cystic Fibrosis, i nomi dei saggi sono stati modificati in TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant e TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing.

## Flusso di lavoro integrato

TruSight Cystic Fibrosis integra i due saggi in un solo flusso di lavoro di test per FC (Figura 2). I clienti scelgono quale saggio eseguire all'inizio del test selezionando il modulo di analisi appropriato in Local Run Manager (LRM). Gli utenti quindi preparano le librerie dei campioni, le caricano sullo strumento MiSeqDx per il sequenziamento e analizzano i dati con il software appropriato.

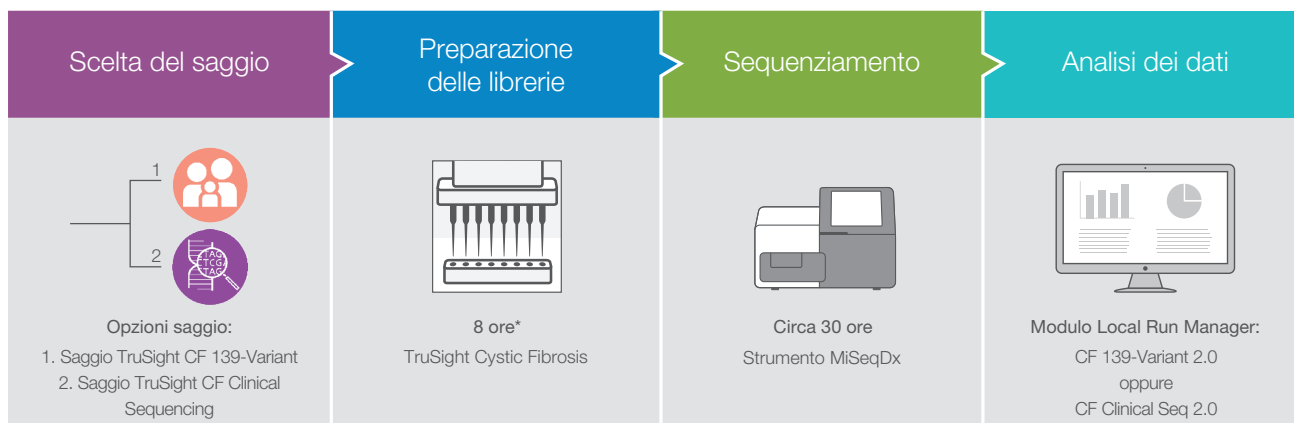
Per determinare quale saggio può essere più adatto agli obiettivi del test, gli utenti devono considerare quanto segue:

- Il saggio **TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant** rileva in modo accurato 139 varianti *CFTR* rilevanti dal punto di vista clinico<sup>5</sup> (Tabella 1).
- Il saggio **TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing** effettua il sequenziamento di tutte le regioni codificanti le proteine e i confini introne/esone (Figura 3) e fornisce una panoramica completa del gene *CFTR*.

Per ulteriori informazioni, consultare le [Dichiarazioni di uso previsto](#) oppure leggere l'insero della confezione.

## Configurazione del kit ottimizzata

TruSight Cystic Fibrosis utilizza lo stesso flusso di lavoro, le stesse specifiche del prodotto e la stessa qualità dei dati e delle prestazioni dei saggi MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant e MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing. TruSight Cystic Fibrosis presenta una configurazione modulare con reagenti di preparazione della libreria e reagenti per il sequenziamento venduti separatamente così da offrire la massima flessibilità nell'ordinazione dei componenti. Inoltre TruSight Cystic Fibrosis utilizza il kit di reagenti MiSeqDx v3, che offre un migliore sequenziamento mediante chimica di sintesi (SBS) con conseguente aumento della densità dei cluster e della



**Figura 2: Flusso di lavoro TruSight Cystic Fibrosis.** TruSight Cystic Fibrosis offre un flusso di lavoro semplificato e integrato che include la preparazione delle librerie, il sequenziamento e l'analisi dei dati e la creazione dei report per i saggi TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant e Clinical Sequencing. \*Il tempo di preparazione delle librerie dipende dalla processività del campione e potrebbe variare.

lunghezza di lettura, e fornisce una maggiore processività del campione. Grazie alla sua flessibilità, il kit TruSight Cystic Fibrosis può essere utilizzato quattro volte per elaborare 24 campioni per ogni corsa oppure una sola volta per elaborare 96 campioni in una sola corsa. Tutti i reagenti sono confezionati in un comodo formato pronto all'uso, che permette di ridurre i tempi degli interventi manuali e aumentare l'uniformità di tutti i test.

**Tabella 1: Il saggio TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant presenta un pannello completo di varianti CFTR rilevanti dal punto di vista clinico**

Mutazioni nella lista ACMG-23 raccomandate per lo screening FC		
R347P	1717-1G>A	3849+10kbC>T
G85E	G542X	W1282X
R117H	G551D	711+1G>T
621+1G>T	R553X	R560T
R334W	2184delA	1898+1G>A
A455E	2789+5G>A	N1303K
I507del	3120+1G>A	R1162X
F508del	3659delC	

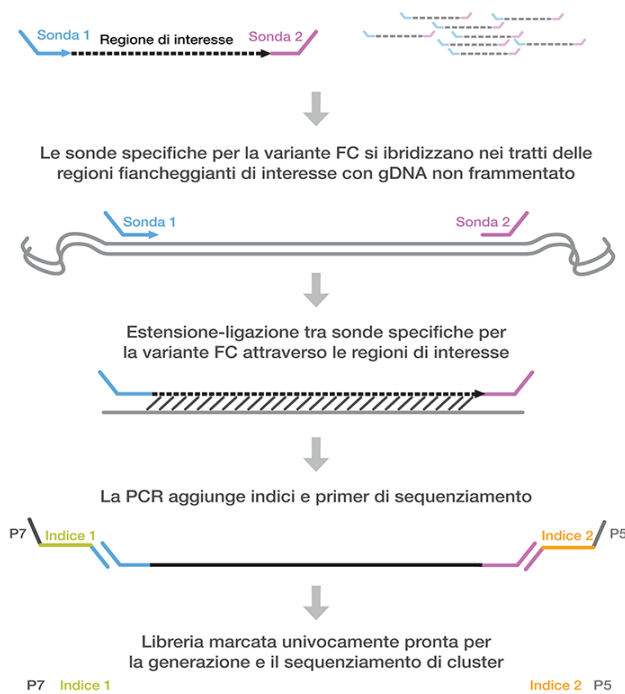
Viene elencato solo un sottoinsieme di varianti incluse nel saggio. Per visualizzare l'elenco completo delle varianti del saggio TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant, visitare il sito [www.illumina.com/TruSightCysticFibrosis](http://www.illumina.com/TruSightCysticFibrosis).



**Figura 3: regioni CFTR sequenziate con il saggio TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing:** le regioni CFTR sequenziate dal saggio includono regioni codificanti le proteine su tutti gli esoni, i limiti introne-esone, circa 100 nt di sequenza intronica fiancheggiante le regioni UTR 5' e 3', due mutazioni introniche profonde (1811+1,6 kbA>G, 3489+10 kbC>T), due grandi delezioni (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23) e la regione PolyTG/PolyT.

### Una preparazione efficiente delle librerie aumenta la processività

La preparazione delle librerie inizia con 250 ng di DNA genomico (gDNA) isolato da un campione di sangue. Il campione di DNA viene miscelato con un pool di sonde di oligonucleotidi. Ogni sonda include sequenze progettate per catturare le varianti designate e una sequenza adattatore utilizzata in una successiva reazione di amplificazione. Le sonde vengono ibridate rispetto al DNA, una a monte e una a valle di specifiche varianti CFTR (Figura 4). Una reazione estensione-ligazione brevettata esegue un'estensione sulla regione di interesse, seguita da una ligazione, per unire le due sonde. Questa reazione crea un filamento templato e dà al saggio un'eccellente specificità (Tabella 2).



**Figura 4: Chimica di TruSight Cystic Fibrosis.** TruSight Cystic Fibrosis consente il multiplex di un massimo di 96 campioni in un'unica corsa. Il saggio TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant e il saggio TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing utilizzano la stessa chimica per produrre librerie di sequenziamento di alta qualità.

Per aumentare il numero di campioni analizzati in una singola corsa di sequenziamento, le singole librerie sono "etichettate" con un identificatore univoco o un indice. Questi indici univoci e specifici per il campione vengono aggiunti a ogni template di estensione-ligazione in una fase di amplificazione mediante PCR. Il prodotto di reazione finale contiene le varianti *CFTR* con gli adattatori di sequenziamento e gli indici necessari per il sequenziamento sullo strumento MiSeqDx. Una strategia di sequenziamento automatico a quattro letture identifica ogni campione etichettato per le singole analisi a valle. Grazie a questo approccio, l'identificazione del campione è altamente accurata e permette di mantenere un'elevata integrità del saggio. Per TruSight Cystic Fibrosis, è possibile eseguire dei pool di 24-96 campioni ed elaborarli su una cella a flusso MiSeqDx v3 utilizzando il saggio TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant o il saggio TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing in una singola corsa di sequenziamento.

## Risultati altamente accurati e di facile interpretazione

I risultati di TruSight Cystic Fibrosis vengono presentati in un formato di facile lettura e possono essere interpretati rapidamente da un genetista molecolare certificato o da un professionista equivalente. I report dei due saggi includono il nome del saggio, l'ID del campione, l'identificazione della variante, i genotipi e la percentuale di identificazione per ogni campione (perché un campione sia considerato valido, il numero di posizioni identificate deve essere  $\geq 99\%$ ). Il saggio TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing indica inoltre il tipo di variante, la frequenza allelica, le coordinate genomiche e la profondità di sequenziamento di ogni variante identificata. Oltre ai report generati dal software Local Run Manager, gli utenti hanno accesso ai file dei dati non elaborati che possono così essere archiviati comodamente.

Tabella 2: Prestazioni di TruSight Cystic Fibrosis

Saggio TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant			
Caratteristica	PA <sup>a</sup>	NA <sup>b</sup>	OA <sup>c</sup>
Accuratezza	100%	> 99,99%	> 99,99%
Riproducibilità	99,77%	99,88%	99,88%
Saggio TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing			
Caratteristica	PA <sup>a</sup>	NA <sup>b</sup>	OA <sup>c</sup>
Accuratezza	99,66%	> 99,99%	> 99,99%
Riproducibilità	99,22%	99,70%	99,70%

- La concordanza positiva (PA) indica il numero di campioni con identificazioni positive della variante diviso per il numero totale di campioni con detta variante così come identificata dal metodo di riferimento.
- La concordanza negativa (Negative Agreement, NA) è stata calcolata su tutte le posizioni wild type (WT) dividendo il numero di posizioni WT concordanti per il numero totale di posizioni WT così come definito dai metodi di riferimento.
- La concordanza complessiva (Overall Agreement, OA) è stata calcolata su tutte le posizioni riportate, dividendo il numero di posizioni wild-type e delle posizioni delle varianti per il numero totale di posizioni riportate così come definito dai metodi di riferimento.

## Riepilogo

TruSight Cystic Fibrosis offre una nuova configurazione del kit che unisce in un'unica soluzione il saggio TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant e il saggio TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing (precedentemente chiamati saggi MiSeqDx CF). TruSight Cystic Fibrosis utilizza lo stesso flusso di lavoro, le stesse specifiche del prodotto e la stessa qualità dei dati e delle prestazioni dei saggi MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant e Clinical Sequencing. Il saggio TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant unisce un pannello allargato di 139 varianti alla tecnologia NGS. Il saggio fornisce risultati accurati per una popolazione etnicamente diversificata e migliora l'individuazione delle coppie che corrono il rischio di avere un figlio colpito da questa patologia. Per un esame più approfondito sulla FC, il saggio TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing consente il sequenziamento del gene *CFTR* così da offrire una panoramica completa non disponibile con i pannelli di genotipizzazione molecolare standard. I dati aggiuntivi eliminano le distorsioni demografiche e consentono di rilevare con precisione due grandi delezioni, due mutazioni introniche profonde e le indel nelle regioni omopolimeriche. TruSight Cystic Fibrosis fornisce una soluzione integrata per il test della fibrosi cistica che permette ai medici di effettuare lo screening di varianti note prima di analizzare il gene *CFTR* per individuare nuove mutazioni.

## Maggiori informazioni

Per ulteriori informazioni su TruSight Cystic Fibrosis, vedere la pagina [www.illumina.com/TruSightCysticFibrosis.html](http://www.illumina.com/TruSightCysticFibrosis.html).

## Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
TruSight Cystic Fibrosis	20036925
Strumento MiSeqDx	DX-410-1001
MiSeqDx Reagent Kit v3	20012552

## Piattaforma NGS flessibile per test IVD

Oltre a TruSight Cystic Fibrosis, inoltre, è disponibile una gamma in continua evoluzione di test IVD approvati dalla FDA per lo strumento MiSeqDx:

- TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx:** un kit convalidato, con approvazione FDA e con marchio CE-IVD che permette ai laboratori clinici di progettare saggi NGS personalizzati.
- Praxis™ Extended RAS Panel:** il primo sistema diagnostico *in vitro* NGS approvato dalla FDA per la valutazione delle mutazioni RAS nel cancro coloretale per determinare l'idoneità del paziente al trattamento con Vectibix.

## Dichiarazioni di uso previsto

### Uso previsto per il saggio TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant

Il saggio Illumina TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant è un sistema diagnostico *in vitro* usato per rilevare 139 mutazioni e varianti clinicamente rilevanti che causano la fibrosi cistica e simultaneamente le varianti del gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (*CFTR*) in DNA genomico isolato da campioni di sangue intero periferico umano. Le varianti comprendono quelle raccomandate nel 2004 dall'American College of Medical Genetics (ACMG)<sup>6</sup> e nel 2011 dall'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)<sup>7</sup>. Il test è previsto per lo screening dei portatori in adulti in età riproduttiva, in test diagnostici di conferma di neonati e bambini e come test iniziale per contribuire alla diagnosi in individui con sospetta fibrosi cistica. I risultati di questo test devono essere interpretati da un esperto certificato in genetica molecolare o equivalente e devono essere usati assieme ad altre informazioni di laboratorio e cliniche disponibili. Questo test non è indicato per l'uso nello screening neonatale, in test diagnostici prenatali, in test preimpianto o per fini diagnostici indipendenti. Il test deve essere utilizzato con lo strumento MiSeqDx Illumina.

### Uso previsto del saggio TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Il saggio Illumina TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina è un sistema diagnostico *in vitro* per il sequenziamento mirato che sottopone a rifequenziamento le regioni codificanti la proteina e i limiti introne/esone del gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (*CFTR*) in DNA genomico isolato da campioni di sangue periferico umano raccolti in K2EDTA. Il test rileva varianti di singolo nucleotide e piccole Indel nella regione sottoposta a sequenziamento e riporta inoltre due mutazioni introniche profonde e due ampie delezioni. Il test deve essere utilizzato con lo strumento MiSeqDx Illumina.

Il test contribuisce alla diagnosi in individui con sospetta fibrosi cistica (CF). Questo saggio è più appropriato quando il paziente presenta una fibrosi cistica atipica o non classica o quando altri pannelli di mutazioni non sono riusciti a identificare entrambe le mutazioni causanti la malattia. I risultati del test devono essere interpretati da un gruppo di genetisti molecolari certificati o da un esperto equivalente e devono essere usati assieme ad altre informazioni inclusi sintomi clinici, altri test diagnostici e anamnesi familiare. Questo test non è indicato per fini diagnostici indipendenti, test diagnostici fetali, test preimpianto, screening del portatore, screening neonatale o screening della popolazione.

## Bibliografia

1. Cystic Fibrosis Foundation. [www.cff.org/What-is-CF/About-Cystic-Fibrosis/](http://www.cff.org/What-is-CF/About-Cystic-Fibrosis/). Consultato il 10 novembre 2019.
2. Strom CM, Crossley B, Buller-Buerkle A, et al. Cystic fibrosis testing 8 years on: lessons learned from carrier screening and sequencign analysis. *Genet Med*. 2011;13(2):166–172.
3. Mirtajani SB, Farnia P, Hassanzad M, et al. Geographical distribution of cystic fibrosis; the past 70 years of data analysis. *Biomed and Biotech Res J*. 2017;1(2):105–112.
4. Rock MJ, Levy H, Zaleski C, Farrell PM. Factors accounting for a missed diagnosis after newborn screening. *Pediatr Pulmonol*. 2011;46(12):1166–1174.
5. Clinical and Functional Translation of CFTR. [www.cftr2.org](http://www.cftr2.org). Consultato il 10 novembre 2019.
6. Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, et al. Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat Genet*. 2013;45:1160–1167.
7. Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, et al. Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genet Med* 2004;6(5):387–391.
8. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. ACOG Committee Opinion No. 486: Update on carrier screening for cystic fibrosis. *Obstet Gynecol*. 2011;117(4):1028–1031.

Illumina • 1.800.809.4566 Numero verde (USA) • +1.858.202.4566 tel • techsupport@illumina.com • [www.illumina.com](http://www.illumina.com)

© 2020 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitate la pagina Web [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html). Doc # 1000000121534 v00 ITA QB9188

**illumina**<sup>®</sup>