

TruSight™ Cystic Fibrosis

Una solución de secuenciación de nueva generación autorizada por la FDA para diagnóstico *in vitro*

- Un único flujo de trabajo permite a los usuarios realizar dos ensayos para pruebas de fibrosis quística
- El panel de variantes étnicamente diversas combinado con la secuenciación completa del gen *CFTR* proporciona una cobertura completa
- La preparación eficiente de bibliotecas aporta una productividad muy flexible de 24 a 96 muestras por experimento
- Resultados muy precisos y de fácil interpretación presentados en un informe claro y conciso

illumina®

Introducción

La fibrosis quística (FQ) afecta aproximadamente a 70 000 niños y adultos en todo el mundo.¹

La enfermedad aparece cuando una persona hereda dos variantes que causan la enfermedad en trans del gen del receptor transmembrana de la fibrosis quística (*CFTR*, cystic fibrosis transmembrane receptor). Millones de personas son portadoras de un solo gen mutado y no presentan ningún síntoma. Muchas de estas personas, a las que se denomina portadores, desconocen su mutación y el riesgo de transmitir el gen de la fibrosis quística (FQ) a su descendencia. Solo en Estados Unidos, se calcula que la frecuencia de portadores es del 3 % de la población.²

La FQ afecta a una población diversa y la mayor incidencia se observa en las personas de ascendencia caucásica.³ El diagnóstico y el tratamiento precoces de la FQ pueden mejorar la supervivencia y la calidad de vida.⁴ Sin embargo, los métodos actuales de prueba de la FQ se centran en las variantes del gen *CFTR* que se encuentran con mayor frecuencia en personas de origen caucásico, con lo que pueden pasar desapercibidas variantes causantes de FQ de otros espectros demográficos de posible relevancia clínica. El resultado es que las familias tienen que soportar largos periodos de pruebas genéticas adicionales y que los pacientes pueden recibir con retraso el tratamiento que necesitan.

Para afrontar estos desafíos, Illumina proporcionaba los ensayos MiSeq™ Dx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay y MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay. Estos ensayos fueron las primeras pruebas de diagnóstico *in vitro* (DIV) para la fibrosis quística basadas en la secuenciación de nueva generación (NGS, next-generation sequencing) autorizadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, Food and Drug Administration). Estos ensayos previos se han reunido en una única solución de NGS para las pruebas de fibrosis quística: TruSight Cystic Fibrosis (figura 1).

TruSight Cystic Fibrosis unifica los ensayos existentes para la FQ

TruSight Cystic Fibrosis combina los ensayos MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay y MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay en un único kit para mejorar la versatilidad y la productividad de muestras con reactivos de secuenciación actualizados, a la vez que mantiene el mismo flujo de trabajo, las especificaciones del producto y el rendimiento de los ensayos originales. Como parte de la integración en TruSight Cystic Fibrosis, los nombres de los ensayos se han cambiado a TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay y TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay.



Figura 1: TruSight Cystic Fibrosis. TruSight Cystic Fibrosis combina ensayos previos en un único kit para mejorar la versatilidad y la productividad de muestras.

Flujo de trabajo integrado

TruSight Cystic Fibrosis integra ambos ensayos en un único flujo de trabajo de pruebas para la FQ (figura 2). Los clientes deciden qué ensayo realizar al principio de la prueba seleccionando el módulo de análisis correspondiente en Local Run Manager (LRM). A continuación, los usuarios preparan las bibliotecas de muestras, las cargan en el instrumento MiSeqDx para la secuenciación y analizan los datos con el software adecuado.

Para determinar mejor qué ensayo es el más adecuado para los objetivos de la prueba, los usuarios deben tener en cuenta lo siguiente:

- **TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay:** detecta con precisión 139 variantes de *CFTR*⁵ clínicamente relevantes (tabla 1).
- **TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay:** secuencia todas las regiones de codificación de proteínas y los límites de intrones/exones (figura 3), para ofrecer una visión completa del gen *CFTR*.

Para obtener más información, consulte las [Declaraciones de uso previsto](#) o lea el [prospecto](#).

Configuración optimizada del kit

TruSight Cystic Fibrosis conserva los mismos flujos de trabajo, las mismas especificaciones del producto y la misma calidad de los datos y el rendimiento que los ensayos MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay y MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay. TruSight Cystic Fibrosis tiene una configuración modular y reactivos de preparación de bibliotecas y reactivos de secuenciación que se venden por separado, para poder seleccionar en el pedido los componentes necesarios. Asimismo, TruSight Cystic Fibrosis utiliza el MiSeqDx Reagent Kit v3, que mejora la química de secuenciación por síntesis (SBS, sequencing by synthesis), con lo que

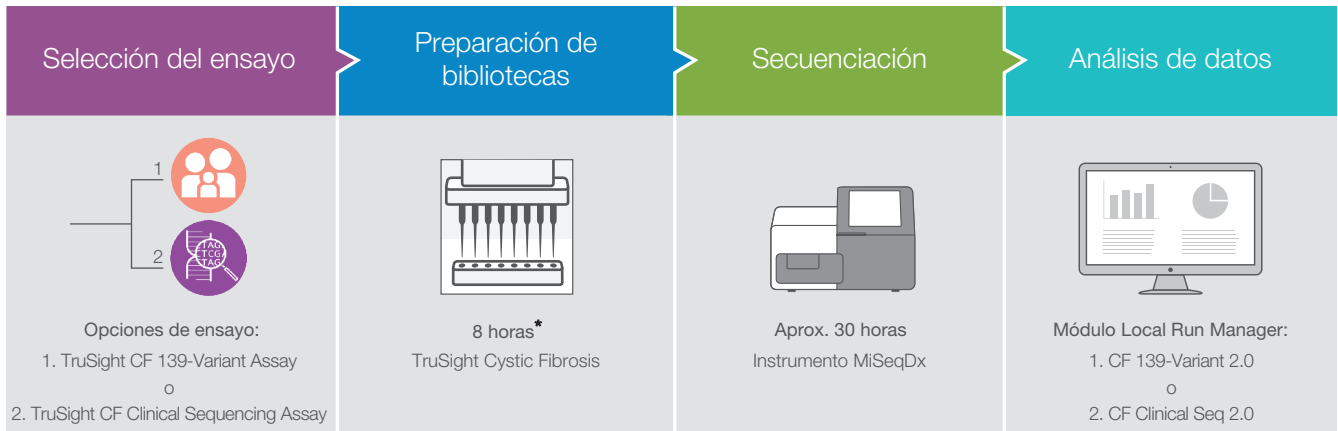


Figura 2: flujo de trabajo de TruSight Cystic Fibrosis. TruSight Cystic Fibrosis proporciona un flujo de trabajo optimizado e integrado que incluye la preparación de la biblioteca, la secuenciación y análisis de datos, además de la creación de informes de los ensayos TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant y TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay. *El tiempo de preparación de la biblioteca depende de la productividad de muestras y puede ser distinto.

se aumentan la densidad de grupos y las longitudes de lectura y se obtiene una mayor productividad de muestras. TruSight Cystic Fibrosis ofrece flexibilidad ya que el mismo kit se puede utilizar cuatro veces para procesar 24 muestras por experimento, o una vez para procesar 96 muestras en un experimento único. Todos los reactivos están envasados en un cómodo formato listo para usar que minimiza el tiempo de participación activa a la par que aumenta la uniformidad en todas las pruebas.

Tabla 1: TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay ofrece un panel de variantes del gen *CFTR* clínicamente relevantes

Mutaciones en la lista ACMG-23 para el cribado de la FQ		
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	

En la lista solo se incluye un subconjunto de las variantes incluidas en el ensayo. Para ver la lista completa de variantes del TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay, visite www.illumina.com/TruSightCysticFibrosis.

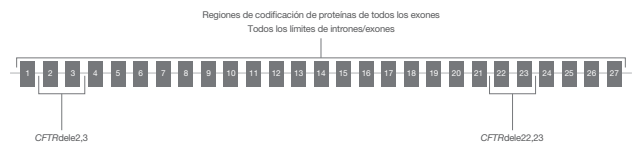


Figura 3: regiones del gen *CFTR* secuenciadas con TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay. Las regiones del gen *CFTR* secuenciadas mediante el ensayo incluyen regiones de codificación de proteínas en todos los exones, límites de intrones/exones, secuencia adyacente de aproximadamente 100 nt en las UTR 5' y 3', dos mutaciones intrónicas profundas (1811+1.6kbA>G, 3489+10kbC>T), dos deleciones de gran tamaño (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23) y la región Poli-TG/Poli-T.

La preparación de bibliotecas eficiente aumenta la productividad

La preparación de bibliotecas comienza con 250 ng de ADN genómico (ADNg) aislado de una muestra de sangre. El ADN se mezcla con un grupo de sondas de oligonucleótidos. Cada sonda incluye secuencias diseñadas para capturar la variante designada y una secuencia del adaptador utilizada en una reacción de amplificación posterior. Las sondas se hibridan en el ADN, una en sentido ascendente y otra en sentido descendente de las variantes de *CFTR* específicas (figura 4). Una reacción de extensión-ligadura exclusiva se extiende por la región de interés, seguida de la ligadura para unir ambas sondas. De esta forma, se crea una hebra de cadena molde y se otorga al ensayo una excelente especificidad (tabla 2).

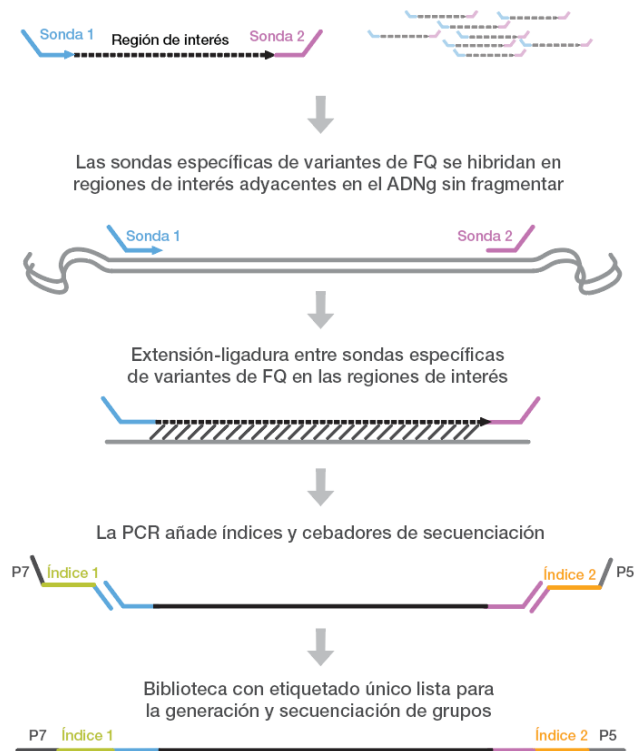


Figura 4: química de TruSight Cystic Fibrosis. TruSight Cystic Fibrosis permite el multiplexado de hasta 96 muestras en un experimento único. Tanto TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay como TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay utilizan el mismo proceso químico para crear bibliotecas de secuenciación de alta calidad.

Para aumentar el número de muestras analizadas en un único experimento de secuenciación, las bibliotecas individuales se “etiquetan” con un identificador o índice exclusivos. Estos índices exclusivos específicos de la muestra se añaden a cada cadena molde de extensión-ligadura en un paso de amplificación PCR. El producto de la reacción final incluye las variantes del gen *CFTR* junto con los adaptadores de secuenciación e índices necesarios para secuenciar con el instrumento MiSeqDx. Mediante una estrategia de secuenciación automatizada de cuatro lecturas, se identifican todas las muestra marcadas para análisis individuales sucesivos. Con este enfoque, la identificación de la muestra es muy precisa y se conserva la alta integridad del ensayo. En el caso de TruSight Cystic Fibrosis, se pueden agrupar de 24 a 96 muestras y analizarlas en una celda de flujo MiSeqDx v3, tanto para TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay como para TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay en un único experimento de secuenciación.

Resultados muy precisos y de fácil interpretación

Los resultados de TruSight Cystic Fibrosis se presentan de una forma fácil de leer para que un genetista molecular acreditado o un homólogo puedan interpretarlos con facilidad. Los informes de ambos ensayos incluyen el nombre del ensayo, el ID de muestra, la identificación de la variante, los genotipos y la tasa de llamadas de cada muestra (para que una muestra se considere válida, $\geq 99\%$ de las posiciones deben tener llamadas). TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay también proporciona el tipo de variante, la frecuencia alélica, las coordenadas genómicas y la profundidad de secuenciación de cada variante identificada. Aparte de los informes generados por el software Local Run Manager, los usuarios pueden acceder a archivos de incidencia para almacenarlos como proceda.

Tabla 2: rendimiento de TruSight Cystic Fibrosis

TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay			
Característica	PA ^a	NA ^b	OA ^c
Exactitud	100 %	>99,99 %	>99,99 %
Reproducibilidad	99,77 %	99,88 %	99,88 %
TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay			
Característica	PA ^a	NA ^b	OA ^c
Exactitud	99,66 %	>99,99 %	>99,99 %
Reproducibilidad	99,22 %	99,70 %	99,70 %

- La coincidencia positiva (PA, Positive Agreement) es el número de muestras con llamadas coincidentes dividido entre el número total de muestras con dicha variante identificada mediante el método de referencia.
- La coincidencia negativa (NA, Negative Agreement) se calcula para todas las posiciones de cepa salvaje dividiendo el número de posiciones de cepa salvaje coincidentes entre el número total de posiciones de cepa salvaje definidas mediante los métodos de referencia.
- La coincidencia total (OA, Overall Agreement) se calcula para todas las posiciones notificadas dividiendo el número de posiciones de cepa salvaje y de variantes entre el número total de posiciones notificadas determinadas mediante los métodos de referencia.

Resumen

TruSight Cystic Fibrosis ofrece un kit de nueva configuración que combina el TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay y el TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay (anteriormente denominados ensayos MiSeqDx CF) en una única solución. TruSight Cystic Fibrosis conserva los mismos flujos de trabajo, las mismas especificaciones del producto y la misma calidad de los datos y el rendimiento que los ensayos MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay y Clinical Sequencing Assays. TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay combina un panel ampliado de 139 variantes con la avanzada tecnología de NGS. El ensayo proporciona resultados precisos para una población étnicamente diversa y mejora la detección de las parejas en riesgo de tener descendencia afectada por la enfermedad. Si se desea una perspectiva más amplia de la FQ, TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay permite secuenciar el gen *CFTR* y tener una visión genética integral que no pueden proporcionar los paneles de genotipado molecular estándar. Los datos adicionales evitan el sesgo demográfico y permiten detectar de forma precisa dos delecciones de gran tamaño, dos mutaciones intrónicas profundas e indels en las regiones homopoliméricas. TruSight Cystic Fibrosis proporciona una solución integrada para realizar la prueba de FQ que permite a los médicos detectar variantes conocidas antes de analizar el gen *CFTR* en búsqueda de nuevas mutaciones.

Información adicional

Si desea información adicional sobre TruSight Cystic Fibrosis, visite illumina.com/TruSightCysticFibrosis

Datos para realizar pedidos

Producto	N.º de referencia
TruSight Cystic Fibrosis	20036925
Instrumento MiSeqDx	DX-410-1001
MiSeqDx Reagent Kit v3	20037124

Plataforma flexible de NGS para pruebas de DIV

Además, aparte de TruSight Cystic Fibrosis, hay disponible una creciente gama de soluciones de ensayos de DIV aprobadas y autorizadas por la FDA para su uso con el instrumento MiSeqDx:

- **TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx:** un kit validado, autorizado por la FDA y con la certificación CE-IVD para uso diagnóstico *in vitro*, que permite a los laboratorios clínicos diseñar sus propios ensayos de NGS.
- **Praxis™ Extended RAS Panel:** el primer diagnóstico *in vitro* de NGS aprobado por la FDA para evaluar mutaciones en RAS en el cáncer colorrectal y determinar la idoneidad del paciente para el tratamiento con Vectibix.

Referencias

1. Cystic Fibrosis Foundation. www.cff.org/What-is-CF/About-Cystic-Fibrosis/. Consultado el 10 de noviembre de 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. Consultado el 10 de noviembre de 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.

Declaraciones de uso previsto

Uso previsto del TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay de Illumina es un sistema cualitativo de diagnóstico *in vitro* utilizado para detectar de 139 mutaciones y variantes de interés clínico que provocan la enfermedad de la fibrosis quística en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (*CFTR*) en el ADN genómico aislado de muestras de sangre humana completa periférica. Las variantes incluyen las recomendadas en 2004 por el American College of Medical Genetics (ACMG)⁶ y las recomendadas en 2011 por el American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)⁷. La prueba está diseñada para el cribado de portadores en adultos en edad reproductiva, en pruebas diagnósticas de confirmación de recién nacidos y niños y como prueba inicial para ayudar en el diagnóstico de personas con posibles síntomas de fibrosis quística. Los resultados de esta prueba pueden interpretarlos tanto un genetista molecular clínico acreditado como un homólogo y deben utilizarlos junto con el resto de la información clínica y de laboratorio disponible. Esta prueba no está indicada para el cribado de recién nacidos, pruebas diagnósticas fetales, pruebas previas a implantaciones o fines de diagnóstico independientes. La prueba está diseñada para su uso en el instrumento MiSeqDx de Illumina.

Uso previsto del TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay de Illumina es un sistema de diagnóstico *in vitro* de secuenciación selectiva que resecuencia las regiones codificantes de proteínas y los límites de intrones/exones del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (*CFTR*) en el ADN genómico aislado a partir de muestras de sangre humana completa periférica recogidas en K2EDTA. La prueba detecta variantes de nucleótido único, así como pequeñas inserciones y deleciones en la región secuenciada, e identifica asimismo dos mutaciones intrónicas profundas y dos deleciones de gran tamaño. La prueba está diseñada para su uso en el instrumento MiSeqDx de Illumina.

La prueba se ha diseñado para utilizarla como ayuda en el diagnóstico de personas con síntomas de fibrosis quística. Este ensayo resulta más apropiado cuando el paciente presenta una fibrosis quística atípica o no clásica, o cuando otros paneles de mutaciones no han podido identificar las mutaciones causantes. Los resultados de la prueba los debe interpretar un especialista certificado en genética molecular clínica o un homólogo, y se deben utilizar junto con otra información disponible como, por ejemplo, los síntomas clínicos, otras pruebas diagnósticas y los antecedentes familiares. Esta prueba no está indicada para fines de diagnóstico independiente, pruebas diagnósticas fetales, pruebas previas a implantaciones, el cribado de portadores, el cribado de recién nacidos o el cribado de la población.



1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | tel.: +1 858 202 4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2021 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, visite www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-00145 v1.0 ESP