

# TruSight™ Cystic Fibrosis

Una soluzione di sequenziamento di nuova generazione per diagnostica *in vitro* autorizzata dalla FDA.

- Un singolo flusso di lavoro consente agli utenti di eseguire due saggi per testare la fibrosi cistica
- Un pannello di varianti etniche diversificate assieme al sequenziamento completo del gene *CFTR* forniscono una copertura completa
- L'efficace preparazione delle librerie fornisce una processività altamente flessibile di 24-96 campioni per corsa
- Report chiari e concisi che contengono risultati altamente accurati e facilmente interpretabili

illumina®

## 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 del portatore 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 del gene *CFTR* più comunemente presenti nella popolazione caucasica e pertanto rischiano potenzialmente di non rilevare le varianti causative 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 (Next-Generation Sequencing, NGS) basati su test per diagnostica in vitro (IVD) per la fibrosi cistica a essere stati autorizzati dalla Food and Drug Administration (FDA). Questi test pre-esistenti 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 Assay e TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay.



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.

## 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 prendere in considerazione quanto segue:

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

Per maggiori informazioni, vedere le [Dichiarazioni di uso previsto](#) o leggere l'[inserto 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 per la preparazione della libreria e reagenti per il sequenziamento venduti separatamente così da offrire la massima flessibilità nell'ordinazione dei componenti.

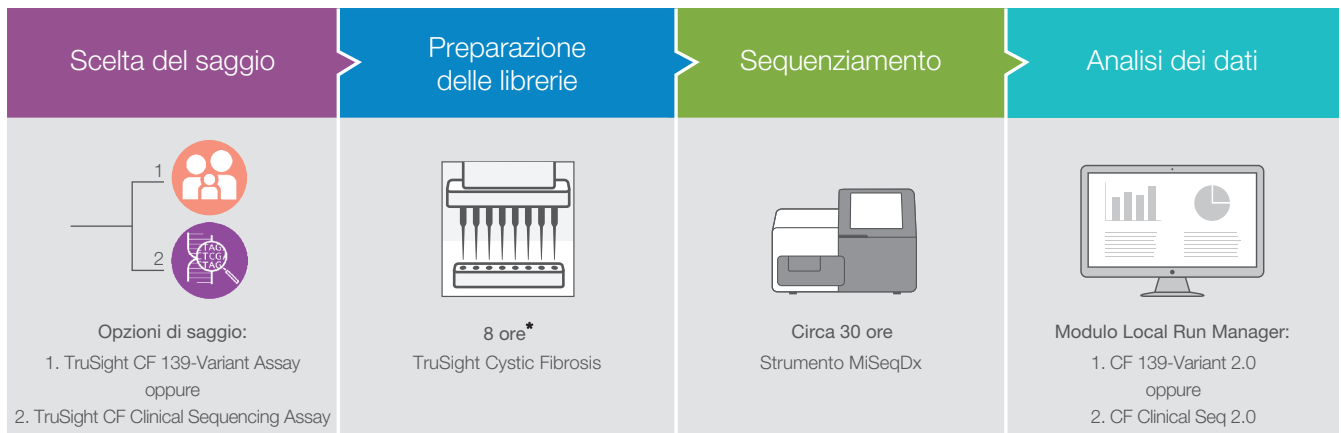


Figura 2: Flusso di lavoro TruSight Cystic Fibrosis: TruSight Cystic Fibrosis offre un flusso di lavoro semplificato e integrato che include la preparazione delle librerie, il sequenziamento e l'analisi dei dati e la creazione dei report per i saggi TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant e Clinical Sequencing.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

Inoltre, TruSight Cystic Fibrosis utilizza MiSeqDx Reagent Kit v3 che offre una chimica di sequenziamento mediante sintesi (Sequenziamento Mediante Synthesis, SBS) migliorata con conseguente aumento della densità dei cluster e delle lunghezze di lettura e fornisce una maggiore processività del campione. Grazie alla sua flessibilità, TruSight Cystic Fibrosis Kit 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.

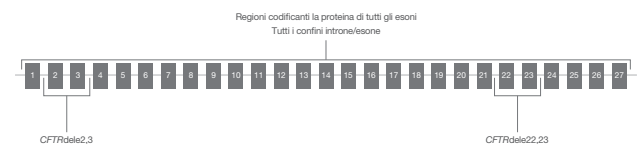


Figura 3: Regioni del gene CFTR sequenziate con il saggio TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing: le regioni del gene CFTR sequenziate con il saggio includono le regioni codificanti la proteina su tutti gli esoni, confini introne/esone, circa 100 nt di sequenze fiancheggianti le regioni UTR 5' e 3', due mutazioni introniche profonde (1811+1.6kbA>G, 3489+10kbC>T), due ampie delezioni (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23) e la regione PolyTG/PolyT.

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

Mutazione nell'elenco ACMG-23 per lo screening della fibrosi cistica		
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, visitate il sito Web [www.illumina.com/TruSightCysticFibrosis](http://www.illumina.com/TruSightCysticFibrosis).

### 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 per la cattura di oligonucleotidi. Ciascuna sonda include una sequenza progettata per catturare la variante designata 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 del gene CFTR (Figura 4). Una reazione estensione-ligazione di proprietà 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).

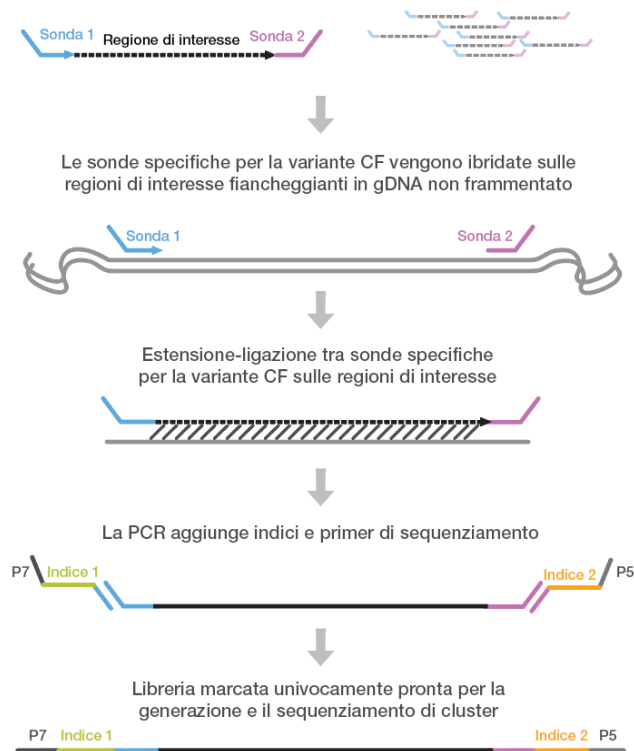


Figura 4: Chimica di TruSight Cystic Fibrosis: TruSight Cystic Fibrosis consente il multiplex di un massimo di 96 campioni in un'unica corsa. Il saggio TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant e il saggio TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing utilizzano la stessa chimica per produrre librerie di sequenziamento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

Per aumentare il numero di campioni analizzati in una singola corsa di sequenziamento, le singole librerie sono "marcate" con un identificatore univoco, o 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 del gene *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 marcato 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 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 esperto 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%

a. La concordanza positiva (Positive Agreement, PA) rappresenta il numero di campioni con identificazioni di varianti concordanti diviso per il numero totale di campioni con detta variante come identificato dal metodo di riferimento.

b. La concordanza negativa (Negative Agreement, NA) calcolata su tutte le posizioni wild type (WT) dividendo il numero di posizioni WT concordanti per il numero totale di posizioni WT come definito dai metodi di riferimento.

c. La concordanza complessiva (Overall Agreement, OA) calcolata su tutte le posizioni riportate dividendo il numero di posizioni WT e delle varianti concordanti per il numero totale di posizioni riportate determinato in base ai 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 intriniche 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 maggiori informazioni su TruSight Cystic Fibrosis, visitate la pagina Web [illumina.com/TruSightCysticFibrosis](http://illumina.com/TruSightCysticFibrosis).

### Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
TruSight Cystic Fibrosis	20036925
Strumento MiSeqDx	DX-410-1001
MiSeqDx Reagent Kit v3	20037124

## Piattaforma NGS flessibile per test IVD

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

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

## 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.

## Dichiarazioni di uso previsto

### Uso previsto del saggio TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant

Il saggio TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina è un sistema per diagnostica in vitro usato per rilevare 139 mutazioni e varianti clinicamente rilevanti che causano la fibrosi cistica 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 negli 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 sono previsti per essere interpretati da un esperto certificato in genetica molecolare o esperto equivalente e dovrebbero 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 è previsto per l'uso con lo strumento MiSeqDx Illumina.

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

Il saggio TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina è un sistema per diagnostica in vitro per il sequenziamento mirato che sottopone a risequenziamento le regioni codificanti la proteina e i limiti introne/esone del gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (*CFTR*) nel DNA genomico isolato da campioni di sangue intero 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 è previsto per l'uso con lo strumento MiSeqDx Illumina.

Questo test è previsto per contribuire alla diagnosi in individui con sospetta fibrosi cistica (FC). 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 l'uso per scopi diagnostici indipendenti, test diagnostici fetali, test preimpianto, screening del portatore, screening neonatale o screening della popolazione.

# illumina®

Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2021 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari.

Per specifiche informazioni sui marchi, consultate

[www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

M-GL-00145 v1.0 ITA

illumina®

Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2021 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari.

Per specifiche informazioni sui marchi, consultate  
[www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

M-GL-00145 v1.0 ITA

illumina®

Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2021 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari.

Per specifiche informazioni sui marchi, consultate  
[www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

M-GL-00145 v1.0 ITA



illumina®

Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2021 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica  
sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari.

Per specifiche informazioni sui marchi, consultate  
[www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

M-GL-00145 v1.0 ITA