

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 diversificate dal punto di vista ancestrale 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 di facile interpretazione

illumina®

Introduzione

La fibrosi cistica (FC) colpisce circa 70.000 bambini e adulti in tutto il mondo.¹ La patologia si presenta quando un individuo eredita due varianti che causano la malattia nel trans del gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (*CFTR*, Cystic Fibrosis Transmembrane - Conductance Regulator). 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 la mutazione ai loro figli. Nei soli Stati Uniti, la frequenza del portatore è stimata al 3% della popolazione.²

La FC colpisce una popolazione diversificata, con la più alta incidenza riconosciuta osservata nelle popolazioni europee.³ La diagnosi e il trattamento precoce della FC possono migliorare sia la sopravvivenza che la qualità della vita.⁴ Tuttavia, gli attuali metodi di test della FC si concentrano sulle varianti del gene *CFTR* più comunemente presenti in individui di discendenza europea 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 MiSeq™Dx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay e MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay. Questi saggi sono stati i primi test di sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) basati su test per diagnostica in vitro (IVD, In Vitro Diagnostic) 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 MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay e MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay 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 sul MiSeqDx Instrument 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:

- **TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay:** rileva in modo accurato 139 varianti *CFTR* rilevanti dal punto di vista clinico⁵ (Tabella 1).
- **TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay:** 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 di MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay e MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay. 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. Inoltre, TruSight Cystic Fibrosis utilizza MiSeqDx Reagent Kit v3 che offre una chimica di sequenziamento mediante sintesi (SBS, Sequencing By Synthesis) migliorata con conseguente aumento della densità dei cluster e delle lunghezze di lettura e fornisce una maggiore processività del campione.



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 TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay e Clinical Sequencing Assay.

* La durata della preparazione delle librerie dipende dalla processività del campione e potrebbe variare.

TruSight Cystic Fibrosis consente di utilizzare quattro volte lo stesso kit di preparazione delle librerie per elaborare 24 campioni per ogni corsa oppure una sola volta per elaborare 96 campioni in una sola corsa. Due configurazioni di kit di sequenziamento forniscono una maggiore flessibilità: MiSeqDx v3 Kit standard (24-96 campioni per cella a flusso) e il più economico MiSeqDx v3 Micro Kit (24-36 campioni per cella a flusso). Tutti i reagenti sono confezionati in un formato pronto all'uso, che permette di ridurre i tempi degli interventi manuali e aumentare l'uniformità di tutti i test.

Tabella 1: TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay 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 di TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay, visitate il sito Web www.illumina.com/TruSightCysticFibrosis.



Figura 3: Regioni del gene *CFTR* sequenziate con TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay: 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.

Una preparazione efficiente delle librerie aumenta la processività

La preparazione delle librerie inizia con 250 ng di DNA genomico (gDNA, Genomic DNA) 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).

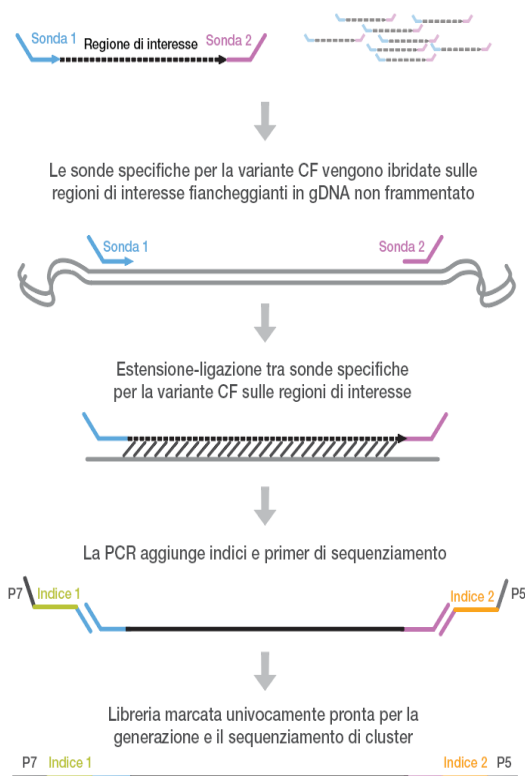


Figura 4: Chimica di TruSight Cystic Fibrosis: TruSight Cystic Fibrosis consente il multiplex di un massimo di 96 campioni in un'unica corsa. TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay e TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay utilizzano la stessa chimica per generare librerie di sequenziamento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

Per aumentare il numero di campioni analizzati in una singola corsa di sequenziamento, le singole librerie sono "marcate" con un identificatore unico, o indice. Questi indici unici 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 sul MiSeqDx Instrument. 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 raggruppare in pool 24-96 campioni utilizzando un MiSeqDx v3 Kit standard per TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay o Clinical Sequencing Assay in una singola corsa di sequenziamento. In alternativa, è possibile eseguire un batch di dimensioni più piccole di 24-36 campioni utilizzando MiSeqDx v3 Micro Kit per entrambi i saggi e con i rispettivi moduli del saggio Micro in Local Run Manager.

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 $\geq 99\%$). TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay 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

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

- La concordanza positiva (PA, Positive Agreement) 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.
- La concordanza negativa (NA, Negative Agreement) 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.
- La concordanza complessiva (OA, Overall Agreement) 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 TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay e TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay (precedentemente chiamati MiSeqDx CF Assay). TruSight Cystic Fibrosis utilizza lo stesso flusso di lavoro, le stesse specifiche del prodotto e la stessa qualità dei dati e delle prestazioni di MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay e Clinical Sequencing Assay. TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay unisce un pannello allargato di 139 varianti alla tecnologia NGS. Il saggio fornisce risultati accurati per una popolazione diversificata dal punto di vista ancestrale e migliora il rilevamento delle coppie che corrono il rischio di avere un figlio colpito da questa patologia. Per un esame più approfondito sulla FC, TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay consente il sequenziamento del gene *CFTR* così da offrire una panoramica genetica 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 maggiori informazioni su TruSight Cystic Fibrosis, visitate la pagina Web illumina.com/TruSightCysticFibrosis.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
TruSight Cystic Fibrosis Library Prep	20036925
MiSeqDx Instrument	DX-410-1001
MiSeqDx Reagent Kit v3	20037124
MiSeqDx Reagent Kit v3, Micro	20063860

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 il MiSeqDx Instrument:

- **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/. Consultato il 1 marzo 2022.
2. Strom CM, Crossley B, Buller-Buerkle A, et al. *Cystic fibrosis testing 8 years on: lessons learned from carrier screening and sequencing analysis*. *Genet Med*. 2011;13(2):166–172. doi:10.1097/GIM.0b013e3181fa24c4
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. doi:10.4103/bbrj.bbrj_81_17
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. doi:10.1002/ppul.21509
5. Clinical and Functional Translation of *CFTR*. www.cftr2.org. Consultato ad agosto 2013.
6. 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. doi:10.1097/01.gim.0000139506.11694.7c
7. 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. doi: 10.1097/AOG.0b013e31821922c2

Dichiarazioni di uso previsto

Uso previsto di TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay 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)⁶ e nel 2011 dall'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG).⁷ 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 il MiSeqDx Instrument di Illumina.

Uso previsto di TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay 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 il MiSeqDx Instrument di 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 fini 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

© 2022 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, può consultare www.illumina.com/company/legal.html.

M-GL-00145 ITA v2.0