

Inserito per il medico: saggio Cystic Fibrosis 139-Variant

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

Test genetici e fibrosi cistica

La fibrosi cistica (FC) è una malattia cronica che colpisce i sistemi di più organi, in particolare il sistema polmonare e digestivo. È il più comune disturbo autosomico recessivo con rischio di morte negli Stati Uniti e dipende dall'ereditarietà di una copia difettosa del gene del recettore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (*CFTR*) di ciascun genitore portatore del gene con mutazioni genetiche^{1,2}. Solitamente la diagnosi degli individui affetti da FC viene effettuata attraverso programmi di screening neonatale e confermati con test della quantità di cloro nel sudore all'età di due anni³. Ad oggi, sono state identificate oltre 1.900 varianti del gene *CFTR*; tuttavia, solo un sottoinsieme relativamente piccolo di queste varianti è stato clinicamente e funzionalmente verificato e determinato quale causa della fibrosi cistica⁴. Una variante (a volte chiamata "mutazione" quando causa una malattia) è un cambiamento genetico identificato come diverso rispetto alla normale sequenza di riferimento (detta anche "selvatica") con la quale viene confrontata. Le varianti di *CFTR* possono essere causa di malattia, avere varie conseguenze cliniche, essere benigne o avere un significato sconosciuto. Quelle che hanno conseguenze cliniche diverse possono causare la FC solo in determinate circostanze o essere associate a condizioni correlate alla FC.

Qual è l'aspettativa di vita dei pazienti con fibrosi cistica negli Stati Uniti?

La durata e la qualità della vita di un individuo affetto da FC dipendono da molti fattori diversi, tra cui la gravità della malattia e il momento di inizio della cura. È importante notare che non tutte le mutazioni di *CFTR* causano una malattia grave. Molte persone hanno un caso lieve di FC, mentre altre possono avere casi moderati o gravi. I dati del registro dei pazienti della CF Foundation, che tiene traccia delle statistiche sanitarie dei pazienti trattati presso i centri di cura accreditati dalla CF Foundation, mostrano che oltre il 47% di tutte le persone affette da FC negli Stati Uniti ha più di 18 anni e che l'attuale sopravvivenza mediana complessiva è di 38,3 anni⁵.

Epidemiologia della fibrosi cistica

La fibrosi cistica è una delle più comuni malattie genetiche autosomiche recessive^{6,7}. Ha un'incidenza di malattia stimata pari a un caso ogni 2.000-4.000 nati vivi e una prevalenza di circa 30.000 individui nella popolazione statunitense⁸. Si presenta in tutte le etnie e popolazioni con frequenze diverse: un caso su 3.000 caucasici; uno su 9.200 ispano-americani; uno su 10.900 nativi americani; uno su 15.000 afroamericani; uno su 31.000 asioamericani^{8,9}.

Test genetici e screening dei portatori della fibrosi cistica

Il test del portatore può essere usato per determinare se qualcuno ha una variante genetica nel suo gene *CFTR*. I test sono limitati alle varianti note per essere causa della malattia. Se entrambi i genitori hanno una variante che causa la malattia, allora il bambino ha una possibilità su quattro di ereditare entrambi i geni e quindi di sviluppare la malattia. I tassi di rilevamento portatori dipendono dall'etnia dell'individuo, in quanto molte mutazioni vengono osservate solo in determinati gruppi etnici. Oltre 10 milioni di americani sono portatori di una mutazione del gene della FC. La [Tabella 1](#) riporta le stime attuali della frequenza dei portatori della mutazione del gene *CFTR* in base all'etnia negli Stati Uniti, basate su una coorte di 364.890 individui testati per il portatore senza anamnesi familiare di fibrosi cistica.

Tabella 1 Frequenza generale dei portatori di mutazione della fibrosi cistica in diversi gruppi etnici negli Stati Uniti¹⁰

Gruppo etnico	Frequenza dei portatori osservata
Afroamericano	1 su 84
Ebreo ashkenazita	1 su 29
Asiatica	1 su 242
Caucasico	1 su 28
Ispanico	1 su 59
Ebreo	1 su 32
Medio orientale	1 su 91
Nativo americano	1 su 70
Sud asiatico	1 su 118
Altra etnia	1 su 111
Altra etnia: > 1 etnia	1 su 34
Altra etnia: in parte afroamericano	1 su 56
Altra etnia: in parte caucasico	1 su 32
Altra etnia: in parte ispanico	1 su 51
Non indicato	1 su 37
Tutti gli individui	1 su 38

Pannelli per test genetici

I test per la ricerca di mutazioni genetiche della FC possono variare molto da un laboratorio all'altro e dipendono dal test specifico utilizzato dal laboratorio. Alcuni limitano la loro copertura alle 23 varianti panetniche della FC raccomandate dall'American College of Medical Genetics (ACMG)¹¹ del 2004 e dall'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)¹² del 2011, mentre altri includono altre varianti comuni e rare, rilevate in popolazioni con maggiore variabilità etnica^{2,5,10,13}. Le varianti incluse nel pannello raccomandato dall'ACMG sono state originariamente selezionate in base alla loro prevalenza nella popolazione generale degli Stati Uniti e alla nota associazione con malattie da moderate a gravi.

La validità clinica delle varianti incluse nel saggio Cystic Fibrosis 139-Variant si basa sulle informazioni raccolte e pubblicate dal Progetto CFTR^{14,15}. Il progetto CFTR2 è collegato al database originale delle mutazioni della fibrosi cistica (ora chiamato CFTR1) dedicato alla raccolta di varianti identificate nel gene *CFTR* dalla comunità internazionale di ricerca sulla fibrosi cistica. CFTR2 è un progetto di collaborazione internazionale che riunisce ricercatori, medici e registri sulla fibrosi cistica il cui obiettivo è categorizzare tutte le varianti presenti in un database di 39.696 pazienti affetti da fibrosi cistica in base al loro stato patologico: mutazioni che causano la malattia, mutazioni con diverse conseguenze cliniche (MVCC), mutazioni di significato sconosciuto e non-FC (cioè benigne o neutre)^{14,15}. La classificazione di queste varianti si basa su dati clinici (ad esempio, livelli di cloruro di sodio, funzione polmonare e funzione pancreatica), studi funzionali in vitro (sintesi proteica del CFTR, maturazione, espressione, funzione e conduttanza del cloro) e studi di penetrazione (utilizzando padri apparentemente sani e fertili di pazienti affetti da FC per studiare le varianti *CFTR* che si verificano sull'allele non trasmesso ai loro figli affetti)¹⁴. A settembre 2013, il Progetto CFTR2 ha identificato oltre 160 varianti che si verificano con una frequenza > 0,01% negli individui con FC, di cui 134 varianti uniche (basate su cambiamenti a livello nucleotideo e corrispondenti a 129 varianti nel database CFTR2) sono state classificate causa di FC^{14,15}.

Caratteristiche del saggio Cystic Fibrosis 139-Variant

Il test con il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant viene eseguito sul DNA estratto da un campione di sangue intero. Il saggio effettua dei test per: 134 varianti che causano la FC; una variante di pannello raccomandata da ACMG (R117H, classificata come mutazione di varie conseguenze cliniche, MVCC, da CFTR2); una variante di

modifica condizionata (PolyTG/PolyT); tre varianti benigne riportate condizionatamente (I506V, I507V, F508C)¹⁶; per un totale di 139 varianti segnalate.

Le 134 varianti che causano la fibrosi cistica corrispondono a 129 varianti che causano la fibrosi cistica contenute nel database CFTR2. Il database CFTR2 include cinque varianti che causano la fibrosi cistica per le quali lo stesso cambiamento nel livello della proteina può verificarsi a partire da due cambiamenti distinti del nucleotide [ad es., S466X(C>A) e S466X(C>G)]. Queste cinque varianti sono elencate in base al codone di aminoacido nel database CFTR2 (ad es., S466X) mentre il saggio riporta ciascuna singola variante [ad es., S466X(C>A) e S466X(C>G)]. L'elenco delle 139 varianti riportate dal saggio Cystic Fibrosis 139-Variant è riportato nella **Tabella 2**.

Tabella 2 Riepilogo delle varianti del saggio Cystic Fibrosis 139-Variant

[Ordinato in base alle coordinate genomiche; **Grassetto**=ACMG-23; *Corsivo*=riportata condizionatamente;

**=convalidata con campioni sintetici]

M1V**	T338I**	Q552X	3121-1G>A**
CFTR dele2,3	1154insTC	R553X	3272-26A>G
Q39X**	S341P**	A559T	L1065P**
E60X	R347H	R560T	R1066C
P67L	R347P	R560K**	R1066H
R75X	R352Q	1811+1.6kb A>G**	L1077P**
G85E	1213delT**	1812-1 G>A	W1089X
394delTT	1248+1G>A**	E585X**	Y1092X(C>A)
405+1 G>A**	1259insA**	1898+1G>A	Y1092X(C>G)**
406-1G>A	W401X (c.1202G>A)**	1898+3A>G**	M1101K
E92X	W401X (c.1203G>A)**	2143delT	E1104X**
E92K**	1341+1G>A**	R709X	R1158X
Q98X**	<i>PolyTG/PolyT</i>	K710X	R1162X
457TAT>G**	1461ins4**	2183delAA>G	3659delC
D110H	A455E	2184insA	S1196X
R117C	1525-1G>A**	2184delA	W1204X (c.3611G>A)**
R117H	S466X (C>A)**	2307insA	W1204X (c.3612G>A)**
Y122X	S466X (C>G)	L732X**	3791delC
574delA**	L467P**	2347delG**	3849+10kbC>T
621+1G>T	1548delG [†]	R764X	G1244E**
663delT	S489X**	2585delT**	3876delA
G178R	S492F**	E822X**	S1251N
711+1G>T	Q493X	2622+1G>A**	3905insT
711+3A>G**	I507del	E831X**	W1282X
711+5 G>A**	F508del	W846X	4005+1G>A**
712-1 G>T**	1677delTA	R851X**	N1303K
H199Y**	V520F	2711delT**	4016insT**
P205S	Q525X ^{††}	2789+5G>A	Q1313X**
L206W	1717-8G>A	Q890X	4209TGTT>AA**

Q220X**	1717-1G>A	L927P**	CFTRdele22,23
852del22**	G542X	S945L**	4382delA**
1078delT	S549R(c.1645A>C)	3007delG**	I506V
G330X	S549R (c.1647T>G)	G970R**	I507V
R334W	S549N	3120G>A	F508C
I336K	G551D	3120+1G>A	

† Classificato nel database CFTR2¹⁵ come una variante che causa la fibrosi cistica, mentre Sosnay¹⁴ classifica la variante come indeterminata. La classificazione in base al database è più attuale e riflette l'analisi funzionale completa, che non era disponibile all'epoca della pubblicazione di Sosnay.

L'uso di un test che rileva tutte queste varianti dovrebbe rilevare almeno il 95,4% degli alleli che causano la FC nei pazienti affetti da FC nella coorte di pazienti del Progetto CFTR2. Inoltre, con l'uso di questo pannello, il tasso di rilevamento delle coppie a rischio di avere un figlio con fibrosi cistica dovrebbe aumentare fino a circa il 91% delle coppie, rispetto al 72% delle coppie con l'uso del pannello ACMG con 23 varianti raccomandato¹⁴. Queste stime, tuttavia, dipendono dalla distribuzione delle varianti e dalla frequenza in base alla variabilità geografica ed etnica.

Indicazioni del test

- ▶ Questo test è destinato alla valutazione dello stato di portatore di 139 varianti clinicamente rilevanti del gene regolatore della conduttanza della membrana della fibrosi cistica (*CFTR*), comprese le varianti raccomandate nel 2004 da ACMG¹¹ e nel 2011 da ACOG¹².
- ▶ Questo test è destinato agli adulti in età riproduttiva.
- ▶ Questo test è destinato ai test diagnostici di conferma dei neonati e dei bambini.
- ▶ Questo test è inteso come test iniziale da utilizzare nel contesto della diagnosi di individui con sospetta fibrosi cistica.



ATTENZIONE

Questo test non è indicato per lo screening neonatale, per test diagnostici del feto, per i test preimpianto o per fini diagnostici indipendenti.

- ▶ Il saggio Cystic Fibrosis 139-Variant può essere utilizzato solo su prescrizione medica.

Caratteristiche delle prestazioni del test

Le prestazioni del test si basano sul confronto rispetto a due metodi di riferimento, il sequenziamento bidirezionale Sanger e un saggio PCR convalidato, con il fine di verificare l'accuratezza del saggio per il rilevamento delle 139 varianti. A causa della rarità di molte delle varianti incluse nel saggio, non è stato possibile ottenere campioni clinici per tutte le varianti. Pertanto, l'accuratezza di rilevamento di alcune varianti è stata stabilita utilizzando campioni sintetici costituiti da complessi costrutti plasmidici misti con DNA di tipo selvatico, al fine di simulare campioni eterozigoti. Il saggio è stato in grado di identificare accuratamente le varianti presenti in tutti i campioni con un'accuratezza complessiva > 99,99%. La riproducibilità del saggio è stata dimostrata sia per il rilevamento della variante positiva (99,77%) che per il rilevamento della variante negativa (99,88%), attraverso uno studio di riproducibilità condotto in tre siti di utenza.

Guida all'interpretazione dei risultati

I risultati dei test devono essere interpretati nel contesto dei risultati clinici, della storia familiare e di altri dati di laboratorio. I test molecolari potrebbero non rilevare tutte le possibili mutazioni che portano alla fibrosi cistica. Un risultato negativo non esclude la possibilità che l'individuo abbia una mutazione non identificata nel gene *CFTR*. Questo test deve essere utilizzato con altre informazioni cliniche e di laboratorio disponibili. Tutte le

interpretazioni cliniche delle varianti rilevate devono essere effettuate da un patologo molecolare, da un genetista molecolare clinico o da una figura equivalente certificata dal consiglio direttivo. Si consiglia un consulto tra il medico che ordina il test e un medico genetista o un consulente genetico clinico certificato dal consiglio direttivo. Si consiglia inoltre ai pazienti di rivolgersi a un consulente genetico. Ulteriori informazioni possono essere richieste alla Cystic Fibrosis Foundation (www.cff.org), alla Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) (www.cftr2.org) e all'American College of Medical Genetics (www.acmg.net).

Limitazioni del test

- ▶ I risultati ottenuti devono essere usati e interpretati nel contesto di una valutazione clinica completa.
- ▶ Il saggio è progettato per identificare uno specifico sottogruppo di varianti note nel gene *CFTR*, ma non include tutte le varianti identificate nel gene *CFTR*. Pertanto, se non viene identificata alcuna variante, ciò non esclude la presenza di eventuali altre varianti del gene *CFTR* all'interno dei campioni analizzati.
- ▶ ACMG/ACOG raccomanda il report condizionale per quattro varianti che presentano problemi di interpretazione a causa della complessità della loro associazione con altre varianti. Le varianti con report condizionale del saggio Cystic Fibrosis 139-Variant sono costituite dalla regione polyTG/polyT (segnalata quando viene identificata la variante R117H) e dalle varianti benigne I506V, I507V e F508C¹⁶ (segnalate quando viene identificata una variante I507del o F508del omozigote).



NOTA

Poiché questo è un saggio basato sul sequenziamento, non ci sono interferenze nel riportare F508del o I507del dovute ai tre polimorfismi benigni. Pertanto, non verranno eseguite correzioni sul risultato rilevato.

- ▶ Il saggio non può determinare se l'orientamento della variante PolyTG/PolyT si trova in cis/trans sulla variante R117H. Per i pazienti con una variante R117H, vengono eseguiti ulteriori test per determinare se una variante PolyTG/PolyT, che può incidere sul fenotipo clinico [ad. es., 12-13 (TG) o 5T] è in orientamento cis/trans sulla variante R117H.
- ▶ La frequenza delle varianti identificate mediante questo saggio varia fra le diverse popolazioni.
- ▶ Mentre per alcune varianti si sa molto sulla gravità della malattia, per altre le informazioni sono limitate e si basano su un numero limitato di casi clinici segnalati.
- ▶ Per le varianti convalidate solo attraverso campioni sintetici (Tabella 2), si raccomanda che il laboratorio verifichi la presenza di tali varianti attraverso un altro metodo convalidato prima di riportare i risultati. Per stabilire la procedura di test utilizzata, contattare il laboratorio che effettua il test.
- ▶ Gli errori di laboratorio sono rari, ma possono comunque verificarsi. Le differenze sottostanti nel DNA del paziente o altri fattori analitici possono influenzare le prestazioni del saggio e, di conseguenza, causare rilevamenti effettuati o mancati.

Bibliografia

- 1 Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, et al. (2008) Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr.* 153(2): S4-S14
- 2 Moskowitz SM, Chmiel JF, Stemen DL, Cheng E, Cutting GR. (2008) CFTR-related disorders. *Gene Reviews.* Seattle (WA): University of Washington; 2008. Disponibile all'indirizzo www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250. Aggiornamento 19 febbraio 2008.
- 3 U.S. National Newborn Screening Status Report genes-r-us.uthscsa.edu/sites/genes-r-us/files/nbsdisorders.pdf Aggiornamento 6 gennaio 2013.
- 4 Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). www.genet.sickkids.on.ca/app. [Online] Settembre 2013.
- 5 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2010.
- 6 www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/002052.html.
- 7 www.nlm.nih.gov/medlineplus/geneticdisorders.html.

- 8 Moskowitz SM, Chmiel JF, Stemen DL, Cheng E, Gibson RL, et al. (2008) Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genet Med.* 10(12): 851–868.
- 9 Katkin JP. (2012) Cystic fibrosis: Clinical manifestations and diagnosis. www.uptodate.com [Online] Dicembre 2012.
- 10 Rohlfs EM, Zhou Z, Heim R, Nagan N, Rosenblum L, et al. (2011) Cystic Fibrosis Carrier Testing in an Ethnically Diverse US Population. *Clin Chem.* 57(6): 841–848.
- 11 Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, et al. (2004) Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genet Med.* 6(5): 387–391.
- 12 American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) Committee on Genetics. (2011) The ACOG Committee Opinion No. 486: Update on Carrier Screening for Cystic Fibrosis. *Obstet Gynecol.* 117(4): 1028-31.
- 13 Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP, Farrell PM. (2002) Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations—Correlation with Incidence Data and Application to Screening. *Human Mutation* 19:575–606.
- 14 Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, et al. (2013) Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat Genet.* 2013 Oct; 45(10): 1160-7.
- 15 Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). www.cftr2.org. [Online] Settembre 2013.
- 16 Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ. (March/April 2001) Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. *Genetics in Medicine* 3(2): 149–154.

Brevetti e marchi di fabbrica

Questo documento e il suo contenuto sono di proprietà di Illumina, Inc. e delle aziende ad essa affiliate ("Illumina") e sono destinati esclusivamente ad uso contrattuale da parte dei clienti di Illumina, per quanto concerne l'utilizzo dei prodotti qui descritti, con esclusione di qualsiasi altro scopo. Questo documento e il suo contenuto non possono essere usati o distribuiti per altri scopi e/o in altro modo diffusi, resi pubblici o riprodotti, senza previa approvazione scritta da parte di Illumina. Mediante questo documento, Illumina non trasferisce a terzi alcuna licenza ai sensi dei suoi brevetti, marchi, copyright, o diritti riconosciuti dal diritto consuetudinario, né diritti simili di alcun genere.

Al fine di assicurare un uso sicuro e corretto dei prodotti qui descritti, le istruzioni riportate in questo documento devono essere scrupolosamente ed esplicitamente seguite da personale qualificato e adeguatamente addestrato. Leggere e comprendere a fondo tutto il contenuto di questo documento prima di usare tali prodotti.

LA LETTURA INCOMPLETA DEL CONTENUTO DEL PRESENTE DOCUMENTO E IL MANCATO RISPETTO DI TUTTE LE ISTRUZIONI IVI CONTENUTE POSSONO CAUSARE DANNI AL/ PRODOTTO/I, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI E RENDERANNO NULLA QUALSIASI GARANZIA APPLICABILE AL/ PRODOTTO/I.

ILLUMINA NON SI ASSUME ALCUNA RESPONSABILITÀ DERIVANTE DALL'USO IMPROPRIO DEL/DEI PRODOTTO/I QUI DESCRITTI (INCLUSI SOFTWARE O PARTI DI ESSO).

© 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, visitare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.

AMPure, Beckman e Beckman Coulter sono marchi di fabbrica o marchi registrati di Beckman Coulter, Inc.

Informazioni di contatto



Illumina

5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Paesi Bassi

Sponsor Australiano

Illumina Australia Pty Ltd
Nursing Association Building
Level 3, 535 Elizabeth Street
Melbourne, VIC 3000
Australia