

Foglio per il medico: Saggio MiSeqDx® Cystic Fibrosis 139-Variant

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

Test genetici e fibrosi cistica

La fibrosi cistica (CF) è una malattia cronica multisistemica e multiorgano, che incide in particolare sui sistemi polmonare e digestivo. È la malattia autosomica recessiva potenzialmente letale più comune negli Stati Uniti e risulta dall'aver ereditato da ciascun genitore una copia difettosa del gene regolatore di conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (*CFTR*) contenente le mutazioni genetiche^{1,2}. Di solito gli individui affetti da fibrosi cistica sono diagnosticati mediante programmi di screening neonatale e confermati dal test del cloro nel sudore a due anni³. Ad oggi, sono state identificate più di 1.900 varianti nel gene *CFTR*; tuttavia, solo un sottogruppo relativamente piccolo di queste varianti sono state verificate clinicamente e funzionalmente e determinate come causanti la fibrosi cistica⁴. Una variante (a volte chiamata una "mutazione" quando causa la malattia) è un cambiamento genetico che viene identificato come diverso dalla normale sequenza di riferimento (o "wild type") sulla quale viene confrontato. Le varianti del gene *CFTR* possono causare la malattia, presentare varie conseguenze cliniche, essere benigne o con significato sconosciuto. Le varianti che presentano varie conseguenze cliniche possono causare la fibrosi cistica solo in determinate circostanze o essere associate a condizioni relative alla fibrosi cistica.

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

L'aspettativa di vita e la qualità della vita di un individuo affetto da fibrosi cistica dipendono molto da diversi fattori inclusi la severità della malattia e con quale tempestività è stato iniziato il trattamento. È importante notare che non tutte le mutazioni del gene *CFTR* comporteranno una malattia severa. Molte persone presentano casi lievi di fibrosi cistica, mentre altri possono presentare casi moderati o severi. I dati dell'archivio CF Foundation Patient Registry, che esegue il monitoraggio delle statistiche sulla salute dei pazienti trattati da centri di cura accreditati dall'archivio, mostrano che più del 47% delle persone affette da fibrosi cistica negli Stati Uniti hanno più di 18 anni e che attualmente la sopravvivenza mediana complessiva è di 38,3 anni⁵.

Epidemiologia della fibrosi cistica

La fibrosi cistica è la malattia genetica autosomica recessiva più comune^{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. La fibrosi cistica si verifica in etnie e razze con frequenze diverse: un caso ogni 3.000 caucasici, un caso ogni 9.200 ispano-americani, un caso ogni 10.900 nativi americani, un caso ogni 15.000 afroamericani, e un caso ogni 31.000 asioamericani^{8,9}.

Test genetici e screening del portatore per la fibrosi cistica

I test del portatore possono essere usati per determinare se un individuo ha una variante genetica nel gene *CFTR*. I test sono limitati a quelle varianti note per essere la causa della malattia. Se entrambi i genitori hanno una variante che causa la malattia, il bambino avrà quindi una possibilità su quattro di ereditare entrambi i geni e così sviluppare la malattia. Le percentuali di rilevamento del portatore dipendono dalla razza e dall'etnicità dell'individuo perché queste mutazioni si osservano solo in determinati gruppi etnici. Più di 10 milioni di americani sono portatori di una mutazione del gene CF. 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 sono fornite nella [Tabella 1](#).

Tabella 1 Frequenza generale dei portatori della 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
Asiatico	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
> 1 etnia	1 su 34
Parte afroamericano	1 su 56
Parte caucasico	1 su 32
Parte ispanico	1 su 51
Non fornito	1 su 37
Tutti gli individui	1 su 38

Pannelli dei test genetici

I test della fibrosi cistica per identificare le mutazioni genetiche variano enormemente tra laboratori diversi e dipendono dal test specifico usato nel laboratorio. Alcuni laboratori limitano la copertura alle 23 varianti pan-etniche della fibrosi cistica raccomandate nel 2004 dall'American College of Medical Genetics (ACMG)¹¹ e nel 2011 dall'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)¹², mentre altri includono varianti comuni o rare, che si trovano in popolazioni più diverse dal punto di vista etnico^{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 in base all'associazione nota con la malattia da moderata a severa.

La validità clinica di queste varianti incluse nel saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant sono state basate sulle informazioni raccolte e pubblicate dal progetto CFTR2^{14,15}. Il progetto CFTR2 si collega al database originale delle mutazioni della fibrosi cistica (ora chiamato CFTR1) che ha lo scopo di raccogliere le varianti identificate nel gene *CFTR* e metterle a disposizione della comunità internazionale di ricerca sulla fibrosi cistica. CFTR2 è una collaborazione internazionale tra ricercatori sulla fibrosi cistica, medici e archivi che mirano a categorizzare tutte le varianti che si trovano in un database di 39.696 pazienti con fibrosi cistica in base allo stato causante la malattia: che causa la malattia, mutazioni di varie conseguenze cliniche (MVCC), mutazioni di significato sconosciuto e non causanti la fibrosi cistica (cioè benigne o neutre)^{14,15}. La classificazione di queste varianti si basa su dati clinici (livelli di cloruro di sodio, funzione polmonare e funzione pancreaticata), su studi funzionali in vitro (sintesi della proteina CFTR, maturazione, espressione, funzione e conduttanza del cloro) e su studi di penetrazione (usando padri apparentemente in salute e fertile di pazienti con fibrosi cistica per studiare qualsiasi variazione del gene *CFTR* sull'allele non trasmesso ai figli che hanno la malattia)¹⁴. Al settembre 2013, il progetto CFTR2 ha identificato 160 varianti che si presentano con una frequenza di più dello 0,01% in individui affetti da fibrosi cistica, di queste varianti 134 varianti univoche (in base ai cambiamenti a livello di nucleotide e corrispondenti a 129 varianti nel database CFTR2) sono state classificate come causanti la fibrosi cistica^{14,15}.

Caratteristiche del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant

I test con il Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant sono eseguiti su DNA estratto da campioni di sangue intero. Il saggio testa: 134 varianti che causano la fibrosi cistica; una variante del pannello raccomandata dall'ACMG (R117H, classificata come mutazione di varie conseguenze cliniche, MVCC, da CFTR2); una variante modificante riportata

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

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 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 riportate da Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant sono fornite nella [Tabella 2](#).

Tabella 2 Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Riepilogo delle varianti Riepilogo delle varianti

[Elencate in base alle coordinate genomiche; Grassetto=ACMG-23; Corsivo=riportate condizionatamente; **=convalidate 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	4209TGT>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 al tempo della pubblicazione di Sosnay.

L'uso di un test che rileva tutte queste varianti prevede che il test rilevi almeno il 95,4% degli alleli che causano la fibrosi cistica in pazienti con CF nella coorte di pazienti del progetto CFTR2. Inoltre, la percentuale di rilevamento di coppie a rischio di avere un bambino affetto da fibrosi cistica dovrebbe aumentare a circa il 91% nelle coppie che usano questo pannello rispetto al 72% nelle coppie che usano il pannello di 23 varianti raccomandato dall'ACMG¹⁴. Queste stime tuttavia dipendono dalla distribuzione e dalla frequenza delle varianti in base alla variabilità geografica ed etnica.

Indicazioni del test

- Questo test è previsto per la valutazione dello stato del portatore per 139 varianti rilevanti dal punto di vista clinico del gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (*CFTR*), incluse le varianti raccomandate nel 2004 dall'ACMG¹¹ e nel 2011 dall'ACOG¹².
- Questo test è previsto per l'uso in adulti in età riproduttiva.
- Questo test è previsto per l'analisi diagnostica di conferma in neonati e bambini.
- Questo test è previsto come test iniziale per contribuire alla diagnosi in individui con sospetta fibrosi cistica.



ATTENZIONE

Questo test non è indicato per la diagnosi neonatale, la diagnosi prenatale, l'analisi pre-impianto o per fini diagnostici indipendenti.

- Il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant è da usarsi solo dietro prescrizione.

Caratteristiche delle prestazioni del test

Le prestazioni del test si basavano sul confronto di due metodi di riferimento, il sequenziamento bidirezionale Sanger e un saggio di PCR convalidato, per verificare l'accuratezza del test 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. Quindi, l'accuratezza del rilevamento per determinate varianti è stata stabilita usando campioni sintetici formati da complessi costruiti di plasmidi miscelati con DNA wild type per simulare i campioni eterozigoti. Il saggio è stato in grado di identificare accuratamente le varianti presenti in tutti i campioni con un'accuratezza complessiva di più del 99,99%. Mediante uno studio di riproducibilità condotto presso i tre centri, è stato dimostrato che il saggio era riproducibile per l'identificazione sia della variante positiva (99,77%) che della variante negativa (99,88%).

Guida all'interpretazione dei risultati

I risultati del test devono essere interpretati nel contesto di informazioni cliniche, anamnesi familiare e altri dati di laboratorio. I test molecolari potrebbero non rilevare tutte le mutazioni possibili che portano alla fibrosi cistica. Un risultato negativo non esclude la possibilità che l'individuo presenti una mutazione non identificata nel gene *CFTR*. Questo test deve essere usato assieme ad altre informazioni cliniche e di laboratorio disponibili. Tutte le interpretazioni cliniche delle varianti rilevate devono essere eseguite da un gruppo di genetisti molecolari certificati, un esperto in genetica molecolare clinica o da un esperto equivalente. Si raccomanda al medico che ordina il test di consultare un gruppo di genetisti molecolari certificati o un consulente genetico. Si consiglia inoltre ai pazienti di rivolgersi a un consulente genetico per ottenere maggiori informazioni. Per ulteriori informazioni rivolgersi 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 dovrebbero essere usati e interpretati nel contesto di una valutazione clinica completa.
- Il prodotto è progettato per identificare uno specifico sottogruppo di varianti note nel gene *CFTR*, ma non include tutte le varianti identificate nel gene *CFTR*. Quindi, se una variante non viene identificata, questo non garantisce che altre varianti del gene *CFTR* non siano presenti nei campioni analizzati.
- Il report condizionale è stato raccomandato dall'ACMG/ACOG per quattro varianti che sono considerate problematiche nell'interpretazione a causa della complessità della loro associazione con altre varianti. Le varianti riportate condizionatamente nel saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant consistono nella regione

PolyTG/PolyT (che viene riportata quando viene identificata la variante R117H) e le varianti benigne I506V, I507V e F508C¹⁶ (riportate quando vengono identificate F508del o I507del omozigoti).



NOTA

Poiché questo è un saggio basato sul sequenziamento, non ci sono interferenze nel riportare F508del o I507del dovute ai tre polimorfismi benigni. Quindi, 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, dovrebbero essere 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 sulla severità della malattia per alcune varianti sono a disposizione molte informazioni, per altre, le informazioni sono limitate e si basano su un numero limitato di casi clinici riportati.
- Per le varianti convalidate solo mediante campioni sintetici (Tabella 2), si raccomanda al laboratorio di verificare la presenza di tali varianti mediante un altro metodo convalidato prima di riportare i risultati. Contattare il laboratorio di analisi per stabilire le loro procedure di analisi.
- Gli errori di laboratorio sono rari ma possono verificarsi. Le differenze sottese in un DNA del paziente o altri fattori analitici possono incidere sulle prestazioni del saggio e conseguentemente causare identificazioni o mancate identificazioni.

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, Stern DL, Cheng E, Cutting GR. (2008) CFTR-related disorders. *Gene Reviews.* Seattle (WA): University of Washington; 2008. Disponibile alla pagina Web www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250. Aggiornato al 19 febbraio 2008.
- 3 Report sullo stato dello screening neonatale nazionale degli Stati Uniti genes-r-us.uthscsa.edu/sites/genes-r-us/files/nbsdisorders.pdf Aggiornato al 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, Stern 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 a essa affiliate ("Illumina") e sono destinati esclusivamente a 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 in alcun modo, senza preventiva approvazione scritta da parte di Illumina. Mediante questo documento Illumina non trasferisce alcuna licenza sui propri diritti su brevetti, marchi di fabbrica, copyright, o diritti secondo il diritto consuetudinario, né alcun diritto similare di alcun terzo.

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 PUÒ CAUSARE DANNI AL PRODOTTO, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI.

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

© 2017 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

Illumina, Genetic Energy, MiSeqDx, Powered by Illumina, la tonalità di arancione e la grafica del fluire delle basi sono marchi di Illumina, Inc e/o delle sue affiliate negli Stati Uniti e/o in altri paesi. Tutti gli altri nomi, loghi e altri marchi di fabbrica sono di proprietà dei rispettivi titolari.

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 Cambridge Limited

Chesterford Research Park, Little Chesterford

Saffron Walden, CB10 1XL

REGNO UNITO