

Vedlegg for lege: MiSeqDx® 139-varianters analyse for cystisk fibrose

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK

Genetisk testing og cystisk fibrose

Cystisk fibrose (CF) er en kronisk sykdom som rammer flere organsystemer, spesielt lunge- og fordøyelsessystemene. Det er den mest vanlige livstruende autosomale recessive lidelsen i USA og er et resultat av arv av en defekt kopi av cystisk fibrose transmembran konduktivitetsregulator-genet (*CFTR*) fra hver forelder som har genetiske mutasjoner^{1,2}. CF-personer blir vanligvis diagnostisert gjennom screeningsprogrammer for nyfødte og bekreftet med svettekloridtesting i toårsalderen³. Per i dag har over 1900 varianter i *CFTR*-genet blitt identifisert, men bare en forholdsvis liten delmengde av disse variantene har blitt klinisk og funksjonelt verifisert og fastslått å forårsake cystisk fibrose⁴. En variant (iblant kalt en "mutasjon" når den fremkaller sykdom) er en genetisk endring som identifiseres som forskjellig fra den normale (eller "villtype-") referansesekvensen den blir sammenlignet med. *CFTR*-varianter kan være sykdomsfremkallende, av varierende klinisk konsekvens, godartet, eller av ukjent betydning. De som har varierende klinisk konsekvens kan fremkalle CF bare under visse forhold eller bli assosiert med CF-relaterte tilstander.

Hva er forventet levealder for pasienter med cystisk fibrose i USA?

Varigheten og livskvaliteten en person kan leve med CF er svært avhengig av mange ulike faktorer, inkludert sykdommens alvorlighetsgrad og tidspunktet da behandlingen begynte. Det er viktig å merke seg at ikke alle *CFTR*-mutasjoner vil resultere i alvorlig sykdom. Mange personer har et mildt tilfelle av CF, mens andre kan ha moderate til alvorlige tilfeller. Data fra CF Foundation Patient Registry, som sporer helsestatistikk fra pasienter som behandles ved CF Foundation-godkjente behandlingssentre, viser at over 47 % av alle personene med CF i USA er 18 år eller eldre og den gjeldende generelle medianoverlevelsen er 38,3 år⁵.

Epidemiologi av cystisk fibrose

CF er en av de vanligste autosomale recessive lidelsene^{6,7}. Den har en sykdomsinsidens anslått å være én i 2000 til 4000 levendefødte og en prevalens på omtrent 30.000 personer i USAs befolkning⁸. CF forekommer i ulike etniske og rasemessige populasjoner med ulike frekvenser: én av 3000 kaukasiere; én av 9200 latinamerikanere; én av 10 900 innfødte amerikanere; én av 15 000 afrikanske amerikanere og én av 31 000 asiatiske amerikanere^{8,9}

Genetisk testing og carrierscreening for cystisk fibrose

Carriertesting kan brukes til å bestemme om noen har en genetisk variant i sitt *CFTR*-gen. Testingen er begrenset til de variantene som er kjent for å være sykdomsfremkallende. Hvis begge foreldrene har en sykdomsfremkallende variant, har barnet en sjanse på 1 til 4 for å arve begge genene og dermed utvikle sykdommen. Carrierdeteksjonsfrekvensen er avhengig av personens rase og etnisitet, fordi mange mutasjoner er observert hos bare visse etniske grupper. Over 10 millioner amerikanere er bærere av 1 mutasjon av *CF*-genet. Gjeldende estimater av *CFTR* mutasjonsbærerfrekvens etter etnisitet i USA, basert på en kohort på 364.890 personer som var henvist for bærertesting uten familiehistorie med CF, finnes i [Tabell 1](#).

Tabell 1 Generell mutasjonscarrierfrekvens for cystisk fibrose i ulike etniske grupper i USA¹⁰

Etnisk gruppe	Observert carrierfrekvens
Afroamerikanere	1 av 84
Ashkenazi-jøder	1 av 29
Asiatisk	1 av 242
Kaukasiere	1 av 28
Latinamerikanere	1 av 59
Jøder	1 av 32
Fra Midt-Østen	1 av 91
Indianere	1 av 70
Fra Sør-Asia	1 av 118
Annen etnisitet	1 av 111
> 1 Etnisitet	1 av 34
Delvis afroamerikanere	1 av 56
Delvis kaukasisk	1 av 32
Delvis latinamerikansk	1 av 51
Ikke oppgitt	1 av 37
Alle personer	1 av 38

Genetiske testingspaneler

CF-testing for genetiske mutasjoner kan variere sterkt mellom ulike laboratorier og avhenger av den spesifikke testen som brukes av laboratoriet. Dekningen til enkelte er begrenset av anbefalingen om 23 CF pan-etniske varianter fra 2004 American College of Medical Genetics (ACMG)¹¹ og 2011 American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)¹², mens andre inkluderer flere vanlige og sjeldnere varianter, som er påvist i populasjoner med mer etnisk mangfold^{2,5,10,13}. Variantene inkludert i det ACMG-anbefalte panelet, ble opprinnelig valgt basert på deres forekomst i den amerikanske allmennbefolkningen og kjent forbindelse med moderat til alvorlig sykdom.

Den kliniske validiteten til disse variantene inkludert i MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse var basert på informasjon samlet inn og utgitt av CFTR2-prosjektet^{14,15}. CFTR2-prosjektet er knyttet til den opprinnelige cystisk fibrose-mutasjonsdatabasen (nå kalt CFTR1) som er viet til innsamlingen av varianter identifisert i *CFTR*-genet for det internasjonale CF-forskningssamfunnet. CFTR2 er et internasjonalt samarbeid mellom forskere, klinikere og registre innen cystisk fibrose som arbeider mot målet med å kategorisere alle varianter påvist i en database med 39 696 pasienter med CF i henhold til deres sykdomshelbredende status: sykdomsfremkallende, mutasjoner med varierende klinisk konsekvens (MVCC), mutasjoner med ukjent signifikans og ikke-CF-fremkallende (dvs. godartede eller nøytrale)^{14,15}. Klassifikasjonen til disse variantene er basert på kliniske data (dvs. natriumkloridnivåer, lungefunksjon og bukspyttkjertelfunksjon), funksjonsstudier in vitro (dvs. CFTR-proteinsyntese, modning, ekspresjon, funksjon og kloridledning), og penetransstudier (ved bruk av tilsynelatende friske og fertile fedre av CF-pasienter) for å studere eventuelle *CFTR*-varianter som forekommer på allelen som ikke overføres til deres affiserte sønner)¹⁴. Fra og med september 2013 har CFTR2-prosjektet identifisert over 160 varianter som forekommer med en frekvens på > 0,01 % hos personer med CF, hvorav 134 unike varianter (basert på endringer av nukleotidnivå, og tilsvarende 129 varianter i CFR2-databasen) er klassifisert som CF-fremkallende^{14,15}.

Funksjoner for MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse

Testing med MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse utføres på DNA som er ekstrahert fra en fullblodsprøve. Analysen tester for: 134 CF-fremkallende varianter, én ACMG-anbefalt panelvariant (R117H, klassifisert som en mutasjon med varierende klinisk konsekvens, MVCC, av CFTR2), én betinget rapportert modifierende variant (PolyTG/PolyT) og tre betinget rapporterte godartede varianter (I506V, I507V, F508C)¹⁶ med en total på 139 rapporterte varianter.

The 134 CF-fremkallende variantene tilsvarer 129 CF-fremkallende varianter i CFTR2-databasen. CFTR2-databasen inkluderer fem CF-fremkallende varianter, der de samme proteinnivåendringene kan oppstå fra to distinkte nukleotideendringer [dvs. S466X(C>A) og S466X(C>G)]. Disse fem variantene er oppført i samsvar med aminosyrekodonet i CFTR2-databasen (dvs. S466X), mens analysen rapporterer hver individuelle variant [dvs. S466X(C>A) og S466X(C>G)]. Listen over 139 varianter, rapportert av MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse finnes i [Tabell 2](#).

Tabell 2 MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse Sammendrag av varianter

[Oppført i genomisk koordinatrekkefølge; Fet skrift=ACMG-23; Kursiv=Betinget rapportert; **=Validert med syntetiske prøver]

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**	<i>I506V</i>
G330X	S549R (c.1647T>G)	G970R**	<i>I507V</i>
R334W	S549N	3120G>A	<i>F508C</i>
I336K	G551D	3120+1G>A	

[†] Klassifisert i CFTR2-database¹⁵ som en CF-fremkallende variant, mens Sosnay-avhandlingen¹⁴ klassifiserer varianten som ubestemt.

Databaseklassifiseringen er mer aktuell og avspeiler den fullførte funksjonelle testingen, som ikke var tilgjengelig da Sosnay-publiseringen fant sted.

Bruk av en test som detekterer alle disse variantene forventes å detektere minst 95,4 % av CF-fremkallende alleler hos pasienter med CF i CFTR2-prosjektpasientkohortet. Dessuten bør frekvensen for deteksjon av par som er i fare for å få et barn med cystisk fibrose, øke til ~91 % av parene ved bruk av dette panelet, sammenlignet med 72 % av parene med bruk av ACMG-anbefalt panel på 23 varianter¹⁴. Disse estimatene er imidlertid avhengig av variantfordistribusjon og frekvens i henhold til variasjon i geografi og etnisitet.

Testindikasjon

- Denne testen er beregnet på evaluering av carrierstatus for 139 klinisk relevante varianter av cystisk fibrose transmembran konduktivitetsregulator-genet (*CFTR*), inkludert varianter som var anbefalt i ACMG¹¹ av 2004 og av ACOG¹² av 2011.
- Denne testen er beregnet brukt på voksne i reproduktiv alder.
- Denne testen er beregnet på bekreftende diagnostisk testing av nyfødte og barn.
- Denne testen er ment å være en innledende test som bistår i diagnosen av personer med mistenkt cystisk fibrose.



FORSIKTIG

Denne testen er ikke beregnet brukt som screening av nyfødte, føtal diagnostisk testing, preimplantasjonstesting eller for enkeltstående diagnostiske formål.

- MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse er kun til reseptbruk.

Testytelseskarakteristikker

Testytelsen var basert på sammenligninger med to referansemeter, toveis Sanger-sekvensering og en validert PCR-analyse med formål å verifisere nøyaktigheten i analysen for detektering av de 139 variantene. Siden mange av variantene inkludert i analysen var sjeldne, var det ikke mulig å oppnå kliniske prøver for alle variantene. Nøyaktigheten ved deteksjon av visse varianter ble derfor etablert med syntetiske prøver som bestod av komplekse plasmidkonstruksjoner, blandet med villtype-DNA for å simulere heteozygote prøver. Analysen var i stand til å identifisere nøyaktige varianter tilstede i alle prøvene med generell nøyaktighet på > 99,99 %. I en reproduktibilitetsstudie utført på tre brukersteder, viste analysen seg å være reproduktibel for både positiv variantdeteksjon (99,77 %) og negativ variantdeteksjon (99,88 %).

Veiledning for tolking av resultater

Testresultatene bør tolkes i sammenheng med kliniske funn, familiehistorie og andre laboratoriedata. Molekylær testing påviser ikke nødvendigvis alle mulige mutasjoner som fører til CF. Et negativt resultat utelukker ikke muligheten for at personen har en uidentifisert mutasjon i *CFTR*-gene. Denne testen bør brukes med annen tilgjengelig laboratorieinformasjon og klinisk informasjon. Alle kliniske tolkninger av varianter som detekteres bør gjøres av en molekylær patolog som er sertifisert av styret, en klinisk molekylær genetiker eller tilsvarende. Vi anbefaler at legen som bestiller testen konsulterer en klinisk medisinsk genetiker som er sertifisert av styret, eller en genetisk rådgiver. Pasientene tilrådes også å søke råd fra en genetisk rådgiver. Mer informasjon kan fås fra Cystic Fibrosis Foundation (www.cff.org), Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) (www.cftr2.org) og American College of Medical Genetics (www.acmg.net).

Testbegrensninger

- Resultatene som ble oppnådd, bør brukes og tolkes i sammenheng med en full klinisk evaluering.
- Produktet er utformet for å identifisere en spesifikk delmengde med kjente varianter i *CFTR*-genet, men inkluderer ikke alle variantene som er identifisert i *CFTR*-genet. Selv om en variant ikke har blitt identifisert, garanterer derfor ikke dette at andre *CFTR*-varianter ikke er tilstede i prøvene som analyseres.
- Betinget rapportering har blitt anbefalt av ACMG/ACOG for fire varianter som anses å være problematiske i tolkningen på grunn av kompleksiteten forbundet med andre varianter. De betinget rapporterte variantene i MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant assay består av polyTG/polyT-regionen som blir rapportert når R117H-varianten er identifisert) og de godartede variantene I506V, I507V og F508C¹⁶ (rapportert når en homozygot F508del eller I507del blir identifisert).

**MERK**

Siden dette er en sekvenseringsbasert analyse, er det ingen interferens med F508del- eller I507del-rapporteringen på grunn av de tre godartede polymorfismene. Det gjøres derfor ingen korreksjoner for å detektere resultatene.

- Analysen kan ikke bestemme om orienteringen til PolyTG/PolyT-varianten er i cis/trans mot R117H-varianten. For pasienter med en R117H-variant bør det utføres ytterligere testing for å bestemme om en PolyTG/PolyT-variant som kan påvirke den kliniske fenotypen [det vil si 12-13 (TG) eller 5T] er i cis/trans-orientering i forhold til R117H-varianten.
- Varianter identifisert av denne analysen varierer i frekvens blant ulike befolkninger.
- Selv om mye er kjent om alvorlighetsgraden for sykdommen for noen av variantene, er informasjonen om andre begrenset og basert på et begrenset antall rapporterte kliniske tilfeller.
- For de variantene som ble validert kun gjennom syntetiske prøver (Tabell 2), anbefaler vi at laboratoriet verifiserer nærværet av slike varianter via en annen validert metode før resultatene rapporteres. Ta kontakt med testlaboratoriet for å etablere deres testprosedyre.
- Laboratoriefeil er sjeldne, men kan forekomme. Underliggende forskjeller i en pasients DNA eller andre analytiske faktorer kan påvirke analyseytelsen og dermed resultere i at påvisninger blir gjort eller uteblir.

Referanser

- 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. Tilgjengelig på www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250. Updated February 19, 2008.
- 3 U.S. National Newborn Screening Status Report genes-r-us.uthscsa.edu/sites/genes-r-us/files/nbsdisorders.pdf Updated January 06, 2013.
- 4 Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). www.genet.sickkids.on.ca/app. [Online] September 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] desember 2012.
- 10 Rohlf 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] September 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.

Patenter og varemerker

Dette dokumentet og dets innhold er opphavsrettslig beskyttet for Illumina, Inc. og tilknyttede selskaper ("Illumina"), og er ment utelukkende for kontraktbruk av sin kunde i forbindelse med bruk av produktet(ene) beskrevet her, og for intet annet formål. Dette dokumentet og dets innholdet skal ikke brukes eller distribueres til andre formål og/eller på annen måte kommuniseres, fremlegges eller reproduseres på noen måte uten forutgående, skriftlig samtykke fra Illumina. Illumina fører ikke noen lisens under sin patent, varemerke, opphavsrettigheter eller sedvanerett eller lignende rettigheter til tredjeparter ved dette dokumentet.

Instruksjonene i dette dokumentet skal være strengt og tydelig fulgt av kvalifisert og tilfredsstillende utdannet personell for å sikre riktig og sikker bruk av produktet(ene) som er beskrevet i dette dokumentet. Alt innhold i dette dokumentet skal leses fullt ut og være forstått før produktet(ene) brukes.

HVIS DET UNNLATES Å FULLSTENDIG LESE OG UTTRYKKELEG FØLGE ALLE INSTRUKSJONENE I DETTE DOKUMENTET, KAN DETTE FØRE TIL SKADE PÅ PRODUKTET(ENE), SKADE PÅ PERSONER, INKLUDERT BRUKERE ELLER ANDRE, OG SKADE PÅ ANNEN EIENDOM.

ILLUMINA PÅTAR SEG IKKE ANSVAR SOM FØLGE AV FEIL BRUK AV PRODUKTET(ENE) SOM ER BESKREVET I DETTE DOKUMENTET (INKLUDERT DELER AV DETTE ELLER PROGRAMVARE).

© 2017 Illumina, Inc. Med enerett.

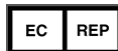
Illumina, Genetic Energy, MiSeqDx, Powered by Illumina, den oransje gresskarfargen og streaming bases-designet er varemerker for Illumina, Inc. og/eller deres partner(e) i USA og/eller andre land. Alle andre navn, logoer og andre varemerker tilhører deres respektive eiere.

AMPure, Beckman og Beckman Coulter er varemerker eller registrerte varemerker for Beckman Coulter, Inc.

Kontaktinformasjon



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California, 92122 USA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (utenfor Nord-Amerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Cambridge Limited
Chesterford Research Park, Little Chesterford
Saffron Walden, CB10 1XL
STORBRITANNIA