

TruSight™ Cystic Fibrosis

Eine von der FDA zugelassene
Sequenzierungslösung
der nächsten Generation
für die *In-vitro*-Diagnostik

- Ein gemeinsamer Workflow für die Ausführung von zwei Assays zum Test auf zystische Fibrose
- Varianten-Panel, das unterschiedliche ethnische Gruppen umfasst, und vollständige Sequenzierung des *CFTR*-Gens gewährleisten umfassende Coverage
- Effiziente Bibliotheksvorbereitung für hochgradig flexiblen Durchsatz von 24 bis 96 Proben je Lauf
- Hochgradig genaue und einfach zu interpretierende Ergebnisse in einem übersichtlichen, knappen Bericht

illumina®

Einleitung

Etwa 70.000 Kinder und Erwachsene weltweit leiden an zystischer Fibrose (Cystic Fibrosis, CF).¹ Die Krankheit tritt auf, wenn Personen zwei ursächliche Varianten des *CFTR*-Gens (Cystic Fibrosis Transmembrane Receptor) in trans erben. Millionen Menschen weisen ein einzelnes mutiertes Gen auf, ohne dass sie Symptome zeigen. Diese als Träger bezeichneten Personen sind sich der Mutation und des Risikos, dieses CF-verursachende Gen an ihre Kinder weiterzugeben, nicht bewusst. In den USA sind ca. 3 % der Bevölkerung sogenannte Träger.²

CF betrifft verschiedene Bevölkerungsgruppen in unterschiedlichem Maße, mit der höchsten Inzidenz bei Weißen.³ Die frühzeitige Diagnose und Behandlung von CF kann die Lebenszeit verlängern und die Lebensqualität verbessern.⁴ Jedoch beschränken sich derzeitige CF-Testverfahren hauptsächlich auf *CFTR*-Varianten bei Weißen, während klinisch relevante CF-verursachende Varianten bei anderen Bevölkerungsgruppen u. U. nicht erkannt werden. Die Folge für viele Familien sind langwierige weiterführende genetische Tests sowie eine mögliche Verzögerung der Behandlung von Patienten.

Aus diesem Grund hat Illumina den MiSeq™ Dx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay und den MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay entwickelt. Bei diesen Assays handelt es sich um die ersten, von der FDA (Food and Drug Administration) zugelassenen In-vitro-Diagnostikverfahren (IVD) für zystische Fibrose auf Basis von Sequenzierung der nächsten Generation (Next-Generation Sequencing, NGS). Die beiden vorhandenen Assays wurden zu einer einzigen NGS-Lösung für CF-Tests zusammengefasst: TruSight Cystic Fibrosis ([Abbildung 1](#)).

TruSight Cystic Fibrosis vereint vorhandene CF-Assays

TruSight Cystic Fibrosis vereint den MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay und den MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay in einem einzigen Kit und erhöht damit die Vielseitigkeit und den Probendurchsatz. Erreicht wird dies mithilfe aktualisierter Sequenzierungsreagenzien, während der Workflow, die Spezifikationen und die Leistung im Vergleich zu den ursprünglichen Assays unverändert bleiben. Im Rahmen der Integration in TruSight Cystic Fibrosis wurden die Namen der Assays in TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay und TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay geändert.



Abbildung 1: TruSight Cystic Fibrosis: TruSight Cystic Fibrosis vereint vorhandene Assays in einem einzigen Kit und erhöht damit die Vielseitigkeit und den Probendurchsatz.

Integrierter Workflow

TruSight Cystic Fibrosis integriert beide Assays in einem CF-Test-Workflow ([Abbildung 2](#)). Kunden wählen zu Beginn des Tests, welcher Assay durchgeführt werden soll, indem sie in Local Run Manager (LRM) das entsprechende Analysemodul auswählen. Anschließend bereiten Anwender die Probenbibliotheken vor, laden diese zur Sequenzierung in das MiSeqDx-Gerät und analysieren die Daten mit einer geeigneten Software.

Anwender sollten bei der Erwägung, welcher Assay für den jeweiligen Testzweck am besten geeignet ist, Folgendes in Betracht ziehen:

- **TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay:** bestimmt 139 klinisch relevante *CFTR*-Varianten genau⁵ ([Tabelle 1](#)).
- **TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay:** sequenziert alle proteincodierenden Regionen sowie alle Intron-Exon-Grenzen ([Abbildung 3](#)) und liefert damit eine umfassende Übersicht über das *CFTR*-Gen.

Weitere Informationen finden Sie in den [Erklärungen zur bestimmungsgemäßen Verwendung](#) sowie in der [Packungsbeilage](#).

Optimierte Kit-Konfiguration

TruSight Cystic Fibrosis behält Workflow, Produktspezifikationen, Datenqualität und Leistung des MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay und des MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay bei. TruSight Cystic Fibrosis zeichnet sich durch eine modulare Konfiguration aus, bei der Bibliotheksvorbereitungsreagenzien und Sequenzierungsreagenzien separat erhältlich sind, was mehr Flexibilität bei der Bestellung von Komponenten ermöglicht.

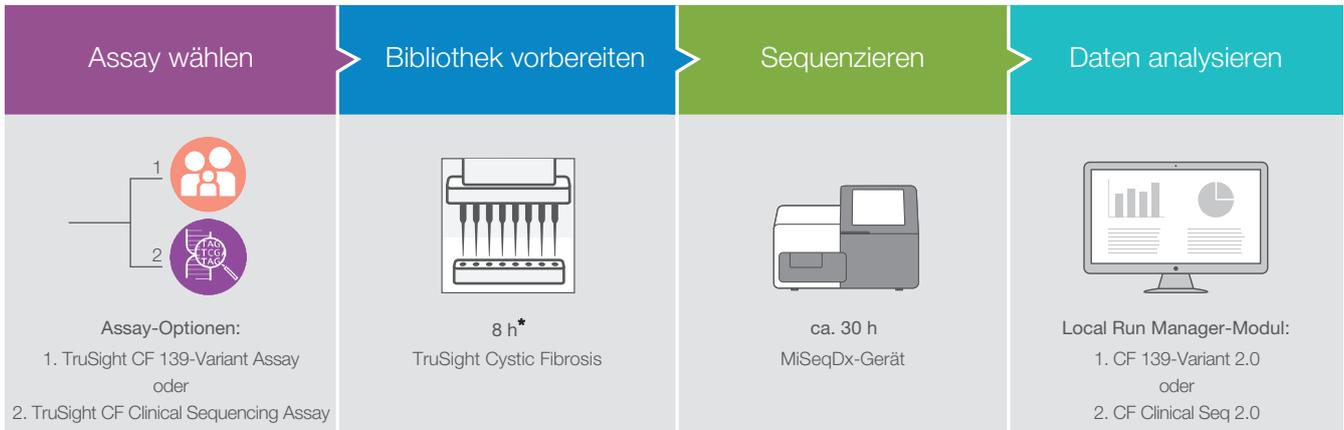


Abbildung 2: TruSight Cystic Fibrosis-Workflow: TruSight Cystic Fibrosis bietet einen optimierten, integrierten Workflow, der Bibliotheksvorbereitung, Sequenzierung, Datenanalyse und Berichterstellung für den TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay und den Clinical Sequencing Assay umfasst. *Die Dauer der Bibliotheksvorbereitung hängt vom Probendurchsatz ab und kann variieren.

Außerdem verwendet TruSight Cystic Fibrosis das MiSeqDx Reagent Kit v3 mit verbesserter SBS-Chemie (Sequencing by Synthesis, Sequenzierung durch Synthese), was für höhere Clusterdichten und Read-Längen sowie einen höheren Probendurchsatz sorgt. Das TruSight Cystic Fibrosis-Kit bietet Flexibilität, da dasselbe Kit viermal zur Verarbeitung von 24 Proben pro Lauf oder einmal zur Verarbeitung von 96 Proben in einem Lauf verwendet werden kann. Sämtliche Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert, was den manuellen Aufwand verringert und die Einheitlichkeit zwischen einzelnen Tests erhöht.



Abbildung 3: Mit dem TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay sequenzierte CFTR-Regionen: Die mit dem Assay sequenzierten CFTR-Regionen umfassen proteincodierende Regionen aller Exone, Intron-Exon-Grenzen, ca. 100 nt flankierender Sequenz um die 5'- und 3'-UTRs, zwei tiefe intronische Mutationen (1811+1.6kbA>G, 3489+10kbC>T), zwei große Deletionen (CFTRdele2,3, CFTRdele22,23) und die PolyTG/PolyT-Region.

Tabelle 1: TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay bietet ein Panel für klinisch relevante CFTR-Varianten

In der ACMG-23-Liste für das CF-Screening aufgeführte Mutationen		
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	

Nicht alle im Assay enthaltenen Varianten werden aufgeführt. Eine vollständige Liste der Varianten im TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay finden Sie unter www.illumina.com/TruSightCysticFibrosis.

Effiziente Bibliotheksvorbereitung erhöht den Durchsatz

Die Bibliotheksvorbereitung beginnt mit 250 ng genomischer DNA (gDNA), die aus einer Blutprobe isoliert wurde. Die DNA wird mit einem Pool von Oligonukleotidsonden gemischt. Jede Sonde enthält eine Sequenz zum Erfassen der jeweiligen Variante sowie eine Adaptersequenz, die in einer nachfolgenden Amplifikationsreaktion verwendet wird. Die Sonden hybridisieren an die DNA, je eine vor und eine hinter den spezifischen CFTR-Varianten (Abbildung 4). Eine proprietäre Extension-Ligation-Reaktion erstreckt sich über die Region von Interesse, gefolgt von einer Ligation, um die beiden Sonden zu vereinigen. Diese Reaktion erzeugt einen Matrizenstrang und bietet eine hervorragende Spezifität (Tabelle 2).

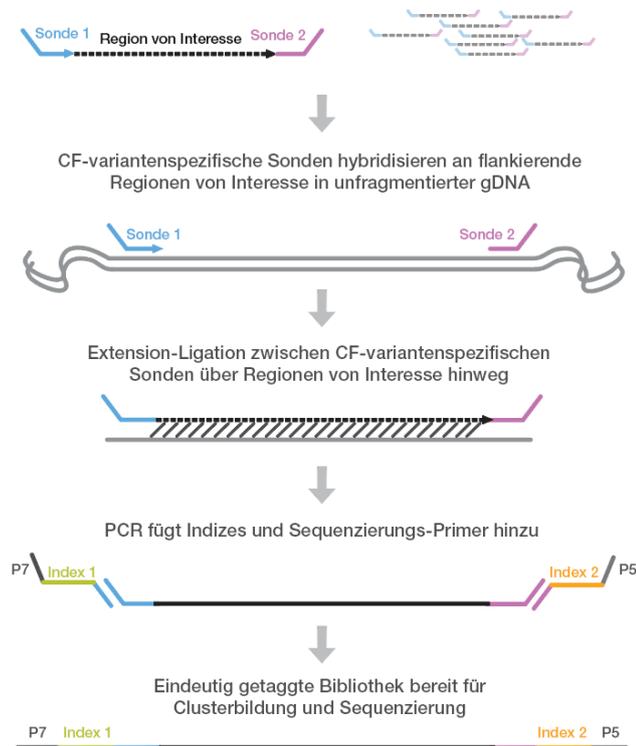


Abbildung 4: TruSight Cystic Fibrosis-Chemie: TruSight Cystic Fibrosis ermöglicht das Multiplexing von bis zu 96 Proben in einem Einzellauf. Der TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay und der TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay generieren anhand derselben Chemie hochwertige Sequenzierungsbibliotheken.

Um die Anzahl der Proben zu erhöhen, die in einem einzigen Sequenzierungslauf analysiert werden können, werden einzelne Bibliotheken mit einem eindeutigen Bezeichner bzw. Index „getaggt“. Diese eindeutigen probenspezifischen Indizes werden in einem PCR-Amplifikationsschritt zu allen Extension-Ligation-Matrizen hinzugefügt. Das endgültige Reaktionsprodukt enthält die *CFTR*-Varianten mit den erforderlichen Sequenzierungsadaptern und -indizes für die Sequenzierung auf einem MiSeqDx-Gerät. Eine automatisierte Vier-Read-Sequenzierungsstrategie ermittelt die getaggtten Proben für die individuelle nachgeschaltete Analyse. Dieser Ansatz sorgt für eine hochpräzise Probenidentifikation und damit für die Aufrechterhaltung der Integrität des Assays. Für TruSight Cystic Fibrosis können 24 bis 96 Proben gepoolt und auf einer MiSeqDx v3-Fließzelle für den TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay oder den Clinical Sequencing Assay in einem einzigen Sequenzierungslauf verarbeitet werden.

Hochpräzise, einfach interpretierbare Ergebnisse

Die Ergebnisse von TruSight Cystic Fibrosis werden in einem übersichtlichen Format bereitgestellt, das für einen zertifizierten Molekulargenetiker oder einen vergleichbar ausgebildeten Mitarbeiter unmittelbar verständlich ist. Beide Assay-Berichte enthalten den Assay-Namen, die Proben-ID, die Variantenkennung, die Genotypen und die Call-Rate für jede Probe. (Damit die Probe als gültig klassifiziert wird, muss bei $\geq 99\%$ der Positionen der Call erfolgreich verlaufen.) Der TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay liefert zudem den Variantentyp, die Allelhäufigkeit, die genomische Koordinate und die Sequenzierungstiefe für alle bestimmten Varianten. Zusätzlich zu den von der Local Run Manager-Software generierten Berichten haben Anwender Zugriff auf die Rohdatendateien, die einfach gespeichert werden können.

Tabelle 2: Leistung von TruSight Cystic Fibrosis

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

a. Die positive Übereinstimmung (Positive Agreement, PA) ist die Anzahl der Proben mit übereinstimmenden Varianten-Calls dividiert durch die Gesamtzahl der Proben mit dieser Variante, wie anhand der Referenzmethode ermittelt.

b. Die negative Übereinstimmung (Negative Agreement, NA) wurde über alle Wildtyp-Positionen (WT) hinweg berechnet, indem die Anzahl der konkordanten WT-Positionen durch die Gesamtzahl der WT-Positionen, wie in den Referenzmethoden ermittelt, dividiert wurde.

c. Die allgemeine Übereinstimmung (Overall Agreement, OA) wurde über alle berichteten Positionen hinweg berechnet, indem die Anzahl der konkordanten Wildtyp- und Varianten-Positionen durch die Gesamtzahl der berichteten Positionen, wie in den Referenzmethoden ermittelt, dividiert wurde.

Zusammenfassung

TruSight Cystic Fibrosis bietet eine neue Kit-Konfiguration, die den TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay und den TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay (zuvor MiSeqDx CF Assays) in einer Lösung vereint. TruSight Cystic Fibrosis behält Workflow, Produktspezifikationen, Datenqualität und Leistung des MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Assay und des MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay bei. Der TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay vereint ein breites Panel an 139 Varianten mit fortschrittlicher NGS-Technologie. Der Assay liefert genaue Ergebnisse für eine Population mit unterschiedlicher ethnischer Herkunft und verbessert die Ermittlung von Paaren, bei denen das Risiko besteht, dass ein Kind betroffen sein könnte. Genauere Erkenntnisse über CF liefert der TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay anhand der Sequenzierung des *CFTR*-Gens. Er bietet eine umfassende genetische Übersicht, die sich mit herkömmlichen Molekulargenotypisierungs-Panels nicht erzielen lässt. Die zusätzlichen Daten beseitigen die demografische Verzerrung und ermöglichen die genaue Bestimmung von zwei großen Deletionen, von zwei tiefen intronischen Mutationen sowie von Indels in Homopolymer-Regionen. TruSight Cystic Fibrosis ist eine integrierte Lösung für CF-Tests, die das Screening auf Varianten ermöglicht, bevor das *CFTR*-Gen auf neue Mutationen untersucht wird.

Weitere Informationen

Weitere Informationen über TruSight Cystic Fibrosis finden Sie unter illumina.com/TruSightCysticFibrosis.

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
TruSight Cystic Fibrosis	20036925
MiSeqDx-Gerät	DX-410-1001
MiSeqDx Reagent Kit v3	20037124

Flexible NGS-Plattform für IVD-Tests

Zusätzlich zu TruSight Cystic Fibrosis ist ein wachsendes Portfolio an von der FDA freigegebenen und zugelassenen IVD-Assays für das MiSeqDx-Gerät erhältlich:

- **TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx:** ein validiertes FDA-konformes Kit mit CE-IVD-Kennzeichnung, mit dem Chemielabore anwendungsspezifische NGS-Assays entwerfen können.
- **Praxis™ Extended RAS Panel:** das erste von der FDA zugelassene NGS-Panel für die In-vitro-Diagnostik zur Bestimmung von RAS-Mutationen zur Abklärung, ob bei Darmkrebs eine Behandlung des Patienten mit Vectibix infrage kommt.

Quellen

1. Cystic Fibrosis Foundation. www.cff.org/What-is-CF/About-Cystic-Fibrosis/. Aufgerufen am 10. November 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. Aufgerufen am 10. November 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.

Erklärungen zur bestimmungsgemäßen Verwendung

Bestimmungsgemäße Verwendung des TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay

Der Illumina TruSight Cystic Fibrosis 139-Variant Assay ist ein qualitatives In-vitro-Diagnostiksystem, das zum gleichzeitigen Erkennen von 139 klinisch relevanten CF-verursachenden Mutationen und Varianten des *CFTR*-Gens (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) in genomischer, aus menschlichen peripheren Vollblutproben isolierter DNA verwendet wird. Zu den Varianten gehören diejenigen, die 2004 vom American College of Medical Genetics (ACMG)⁶ und 2011 vom American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)⁷ empfohlen wurden. Der Test wurde für das Träger-Screening bei Erwachsenen im reproduktiven Alter, als bestätigender Diagnostest bei Neugeborenen und Kindern und als erster Test zur Unterstützung der Diagnose bei Personen mit Verdacht auf zystische Fibrose entwickelt. Die Ergebnisse dieses Tests sollten von einem zertifizierten Facharzt für klinische Molekulargenetik oder einem gleichwertig qualifizierten Kollegen interpretiert und in Verbindung mit anderen verfügbaren Labor- und klinischen Informationen verwendet werden. Dieser Test ist nicht für Neugeborenen-Screenings, die pränatale Diagnostik, Präimplantationstests, Träger-Screenings oder unabhängige Diagnosezwecke vorgesehen. Der Test muss auf dem MiSeqDx-Gerät von Illumina durchgeführt werden.

Bestimmungsgemäße Verwendung des TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay

Der Illumina TruSight Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay ist ein In-vitro-Diagnostiksystem für die gezielte Sequenzierung, das die proteincodierenden Regionen und Intron-Exon-Grenzen des *CFTR*-Gens in genomischer DNA, die aus in K2EDTA gesammelten menschlichen peripheren Vollblutproben isoliert wurde, neu sequenziert. Der Test erkennt einzelne Nukleotidvarianten und kleine Indels innerhalb der sequenzierten Region und meldet zudem zwei tiefe intronische Mutationen und zwei große Deletionen. Der Test muss auf dem MiSeqDx-Gerät von Illumina durchgeführt werden.

Der Test dient zur Unterstützung der Diagnose von Personen mit Verdacht auf zystische Fibrose (CF). Dieser Assay ist am besten geeignet, wenn der Patient eine atypische oder nicht klassische Form von CF aufweist oder wenn andere Mutationspanels die beiden verursachenden Mutationen nicht nachweisen konnten. Die Ergebnisse des Tests sollten von einem zertifizierten klinischen Molekulargenetiker oder einem gleichwertig qualifizierten Kollegen interpretiert werden und in Verbindung mit anderen verfügbaren Informationen, wie z. B. klinischen Symptomen, anderen Diagnostiktests und der Krankheitsgeschichte der Familie, verwendet werden. Dieser Test ist nicht für unabhängige Diagnosezwecke, die pränatale Diagnostik, Präimplantationstests, Träger-Screenings, Neugeborenen-Screenings oder Bevölkerungs-Screenings vorgesehen.

illumina®

1.800.809.4566 (USA, gebührenfrei) | +1.858.202.4566
(Tel. ausserhalb der USA)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2021 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Eigentümer.
Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-00145 v1.0 DEU