

Diagnóstico genético: rastreo del gen *CFTR* y expresión clínica de las mutaciones

Dra. Teresa Casals
Laboratorio de Genética Molecular – IDIBELL
Barcelona

Sociedad Española Bioquímica Clínica
VIII Jornadas del Comité Científico
Toledo 10-11 Mayo 2010

El Cribado Neonatal en Fibrosis Quística

Objetivos

- × Detectar neonatos con mayor riesgo y diagnosticar los afectados
- × Dar una respuesta rápida para retrasar y reducir la expresión clínica de la enfermedad
- × Evaluar el tratamiento precoz
- × Determinar la incidencia en la población
- × Ofrecer asesoramiento genético

El Cribado Neonatal en Fibrosis Quística

Ventajas

- * **Diagnóstico precoz**
2-3 meses de vida vs 3-4 años
- * **Tratamiento y seguimiento**
Unidades especializadas multidisciplinares (neumo, gastro, diet, fisio, genet, ...)
- * **Apoyo psicológico**
- * **Asesoramiento genético**
detección de portadores
diagnóstico prenatal

El Cribado Neonatal en Fibrosis Quística

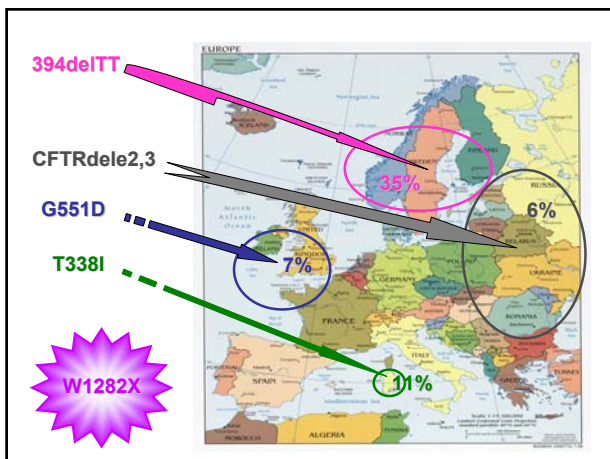
Limitaciones

- Especificidad baja de TIR (falsos positivos)
- Falsos negativos (3%-6%)
- Heterogeneidad molecular alta del gen *CFTR*
- Tamaño de la población
- Diversidad poblacional

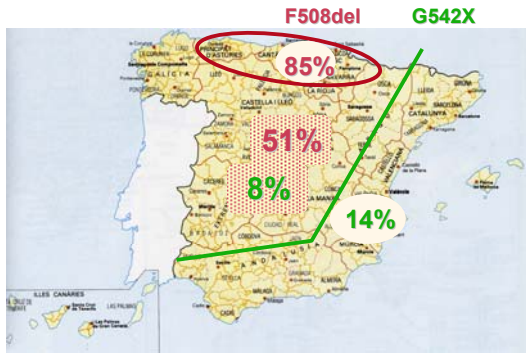
Distintas estrategias

Análisis molecular del gen *CFTR*

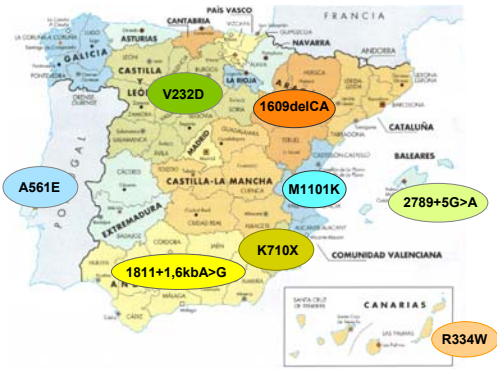
I. ESPECTRO MUTACIONAL ESPECÍFICO DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO



Heterogeneidad y diferencias geográficas

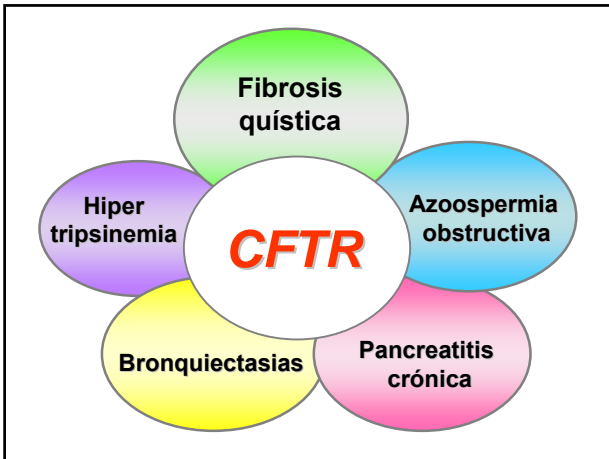


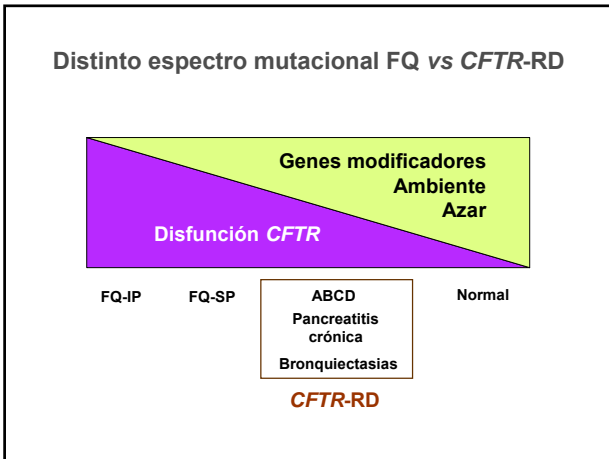
Distribución geográfica




Análisis molecular del gen *CFTR*

II. OTRAS PATOLOGÍAS ASOCIADAS
A MUTACIONES *CFTR*
(*CFTR*-related disorders)







Journal of **Cystic Fibrosis**
www.elsevier.com/locate/jcf

Journal of Cystic Fibrosis 7 (2008) 179–196

Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice

C. Castellani, H. Cuppens, M. Macek Jr., J.J. Cassiman, E. Kerem, P. Durie, E. Tullis, B.M. Assael, C. Bombieri, A. Brown, T. Casals, M. Claustres, G.R. Cutting, E. Dequeker, J. Dodge, I. Doull, P. Farrell, C. Ferec, E. Girodon, M. Johannesson, B. Kerem, M. Knowles, A. Munck, P.F. Pignatti, D. Radojkovic, P. Rizzotti, M. Schwarz, M. Stuhmann, M. Tzeticis, J. Zielenski, J.S. Elborn

ARTICLE

Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders – updated European recommendations

Els Dequeker¹, Manfred Stuhmann², Michael A Morris³, Teresa Casals⁴, Carlo Castellani⁵, Mireille Claustres⁶, Harry Cuppens⁷, Marie des Georges⁶, Claude Ferec⁷, Milan Macek⁸, Pier-Franco Pignatti⁹, Hans Scheffer¹⁰, Marianne Schwartz¹¹, Michal Witt¹², Martin Schwarz¹³ and Emmanuelle Girodon¹⁴

- Criterios de actuación ante distintas patologías / situaciones / origen étnico (FQ, ABCD, hiperrefring. intestinal, detección portadores, ...)
- Criterios de interpretación

Mutaciones *CFTR* y expresión clínica

- **Mutaciones responsables de FQ**
(F508del, G542X, 711+1G>T, ...)
- **Mutaciones asociadas a CFTR-RD**
(L997F, D443Y-G576A-R668C, R258G, ...)
- **Mutaciones sin consecuencias clínicas**
(I148T, M470V, F508C, 1716G>A, ...)
- **Mutaciones con expresión clínica incierta / desconocida**
(L967S, Y1014C, ...)

Pros / Contras del estudio molecular

- **Aumenta la especificidad**
aunque detecta portadores
- **Se caracterizan genotipos NO asociados a FQ**
detecta otros fenotipos asociados al gen *CFTR*

Abordaje del análisis molecular en los Programas de Cribado Neonatal

Análisis del gen *CFTR*

- Alta heterogeneidad molecular (>1700 mutaciones descritas)
- Necesidad de resultados a corto plazo

Características de la población en Cataluña

Alta heterogeneidad molecular y poblacional

- \geq de 200 mutaciones identificadas
- 7,5 millones con un 16% de inmigración
- Estudio genético en 2 fases:
 - I- análisis de mutaciones frecuentes
 - II- rastreo completo del gen *CFTR*

Programa de cribado neonatal en Cataluña (1999-2008)

Fase I. Panel de 32 mutaciones

| | | |
|-----------|--------------|-----------|
| F508del | 621+1G>T | 1717-1G>A |
| G542X | R117H | 2184delA |
| N1303K | R347H | 3905insT |
| R334W | R347P | 1898+1G>A |
| 711+1G>T | S549R | 3120+1G>A |
| R1162X | S549N | A455E |
| 2789+5G>A | G551D | V520F |
| I507del | R553X | R560T |
| 2183AA>G | 1078delT | 3876delA |
| G85E | 3849+10kbC>T | 394delTT |
| W1282X | 3659delC | |

De 23 mutaciones con frecuencia >0,5% solo 11 se detectan en este panel
(Alonso et al. Ann Hum Genet 2007; 71:194-201)

Fase I. Resultados del estudio molecular

Permite detectar el 73,4% de los alelos

- 2 mutaciones 47%
- 1 mutación 49%
- 0 mutaciones 4%

53%

Precisan ampliación del estudio molecular (fase II)

PCN en Cataluña (1999-2008)

116 Afectados (genotipo + PS positiva)

46 Mutaciones F508del (52%)

56 genotipos distintos

Nivel de detección > 99%

(1 alelo no identificado)

PCN en Cataluña (1999-2008)

Diagnosticados 116

F508del / F508del 29

F508del / otra 64

otra / otra 23

Casos falsos negativos

| TIR1 (>120ng/ml) | Genotipo | PS (≥60mmol/l) |
|---------------------|------------------------------|-------------------|
| 65 | F508del / 5T-13TG | 80 |
| 103 | F508del / G542X | 110 |
| 96 | F508del / F508del | 90 |
| 48 | F508del / <i>CFTR</i> dele20 | 100 |
| 112 | F508del / F508del | 107 |

Frecuencias alélicas (1999-2008)

| Mutación | Alelos | % |
|-----------------|--------|---------|
| F508del | 121 | 52.1 |
| G542X | 18 | 7.7 |
| L206W * | 12 | 5.1 |
| N1303K | 9 | 3.9 |
| Q890X * | 4 | 1.7 |
| 1811+1.6kbA>G * | 4 | 1.7 |
| L227R * | 4 | 1.7 |
| 2183AA>G | 3 | 1.3 |
| I507del | 3 | 1.3 |
| 3272-26A>G * | 3 | 1.3 |
| R1066C * | 3 | 1.3 |
| 5T-13TG | 3 | 1.3 |
| 10 mutaciones | | 0.5-0.9 |
| 24 mutaciones | | < 0.5 |

PCN en Cataluña (1999-2008)

161 Portadores (1 mutación y PS negativa)

67 casos con alteraciones en ambos alelos

- 28 Portadores
(5T-11TG, 1716G>A, R75Q)
- 22 CFTR-RD
(5T-12TG, L997F, G576A-R668C,...)
- 17 inciertos

Mutaciones con expresión clínica incierta o desconocida

16 mutaciones que producen el cambio de un aa

| | | |
|-----------|------------|------------|
| Arg31Cys | His939Asp | Gly1069Arg |
| Arg117His | Leu967Ser | Met1137Val |
| Ala120Val | Ile980Lys | Arg1162Leu |
| Arg170His | Tyr1014Cys | Ser1235Arg |
| Pro499Leu | Phe1052Val | Gln1352His |
| Glu725Lys | | |

Prueba del sudor

- A partir de 1 mes
- Positivo ≥ 60 mmol/l
- Dudoso 30-59 mmol/l
- 2 resultados positivos



diagnóstico confirmado

Prueba del sudor

- *excepciones*

algunas mutaciones pueden tener la PS normal (<30 mmol/L) o no concluyente (30-59 mmol/L)

R117H-7T
3849+10kbC>T
D1152H

J Med Genet 2009; 46: 752-758

The very low penetrance of cystic fibrosis for the R117H mutation: a reappraisal for genetic counselling and newborn screening

Thauvin-Robinet C, Munck A, Huet F, Génin E, Bellis G, Gautier E, Audrézet MP, et al.

Penetrancia del genotipo F508del / R117H (n=184)

| | PCN (n=72) | no-PCN (n=112) |
|----------------------|-----------------|------------------|
| Asintomáticos | 55 (76%) | 9 (8%) |
| 7T | 47 | 7 |
| 5T | 2 | 1 |
| T? | 6 | 1 |
| CF/CFTR-RD* | 17 (24%) | 103 (92%) |
| 7T | 14 | 98 |
| 5T | 1 | 3 |
| T? | 2 | 2 |

*. ABCD, BD, RS crónica, pancreatitis, ...

R117H-7T es una mutación con baja penetrancia principalmente asociada a CFTR-RD

PCN. R117H en nuestra casuística

| | |
|-------------------------|---------------|
| R117H-7T / R1162L | 2001 |
| R117H-7T / L997F | 2002 |
| R117H-7T / R170H | 2003 |
| R117H-7T / Q1352H | 2004 |
| R117H-7T / G576A, R668C | 2007 |
| R117H-7T / G542X | 2007 |
| R117H-7T / F508del | 2008 |
| R117H-7T / - | 14 portadores |



Journal of **Cystic
Fibrosis**

www.elsevier.com/locate/jcf

J Cyst Fibros 2009; 8:71-78

A European consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis

Mayell SJ, Munck A, Craig JV, Sermet I, Brownlee KG, Schwarz MJ, Castellani C, Southern KW; European Cystic Fibrosis Society Neonatal Screening Working Group

Consenso para diagnósticos inciertos

➤ Premisas

- TIR sensible pero especificidad baja
- identifica más portadores de los esperados por la incidencia de FQ en la población en estudio
- identifica neonatos con diagnóstico dudoso

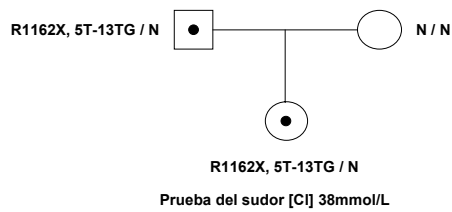
➤ Manifiesto

incluye 19 pautas en el seguimiento de los niños que no cumplen los criterios para el diagnóstico inequívoco de FQ

LOS ESTUDIOS DE SEGREGACIÓN
situaciones excepcionales

Análisis molecular. Familia 1

- 1- Mutaciones identificadas: R1162X y 5T-13TG
- 2- Estudio familiar: Mutaciones en *cis*
- 3- Diagnóstico: neonato y padre *portadores*



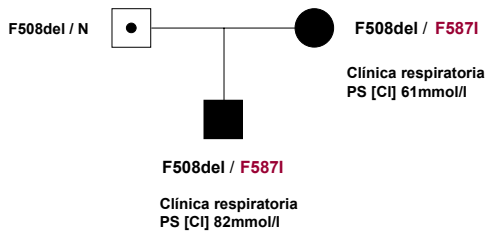
Alelos complejos en CFTR

inducen a errores de interpretación y diagnóstico

- F508del, I1027T
- F508del, D924N
- D1270N, R74W
- A1006E, 5T
- 296+3insT, V754M
- G576A, R668C
- 5T- 11/ 12/ 13TG

Análisis molecular. Familia 2

- 1- Inicio de la sintomatología respiratoria
- 2- Prueba del sudor positiva
- 3- Rastreo completo del gen *CFTR*
- 4- Diagnóstico: neonato y madre *afectados*

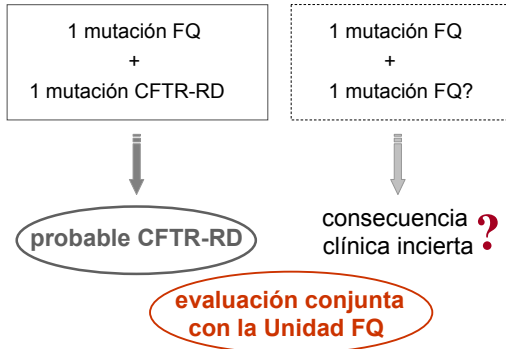


RESUMEN

Posibles diagnósticos

| Genotipo | PS | Diagnóstico |
|----------------|--------|-------------|
| 2 mutaciones | + | FQ |
| 1 mutación | + | FQ |
| 1 mutación | - | portador |
| 0 mutación | + | FQ * |
| 0 mutación | - | no-FQ |
| no concluyente | dudosa | ?? |

Dilemas en el diagnóstico




Dilemas en el diagnóstico



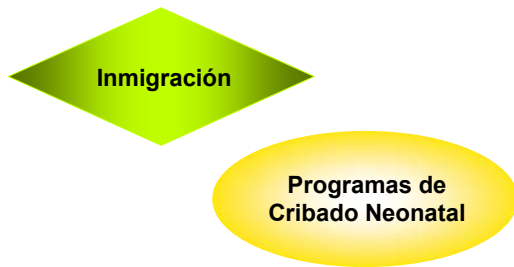
Programas de cribado neonatal



Incidencia de FQ en Cataluña (1999-2008)

| | | |
|-----------|-----------|---|
| 1999-2005 | ≈ 1:5.457 |  |
| 1999-2008 | ≈ 1:6.000 | |

Descenso de la incidencia



Publicaciones en población española

- Borrego S et al. Clin Genet 1994; 46:287-90
- Coto E et al. Med Clin (Barc) 1994; 103:681-3
- Alonso MJ et al. Ann Hum Genet 2007; 71:194-201
- Rana-Díez P et al. J Cyst Fibros 2008; 7:520-2
- Moya-Quiles MR et al. Clin Genet 2009; 76:577-79
- Ramos MD et al. Ann Hum Genet 2010 (en prensa)

PCN de fibrosis quística
Comisión de seguimiento en Cataluña

JL. Marín. Unidad de Cribado Neonatal. Hospital Clínic, Barcelona

T. Casals. Lab de Genética Molecular. Fundació IDIBELL, Barcelona

S. Gartner, N. Cobos. Unidad FQ. Hospital Vall d'Hebron, Barcelona

O. Asensio. Unidad FQ. Hospital Parc Taulí, Sabadell

JL. Séculi. Unidad FQ. Hospital S. Joan de Déu, Barcelona

M. Jané, MJ. Vidal. Programa de Salut Maternoinfantil.

D. G. Salut Pública, Conselleria de Sanitat de Catalunya
