ЗАКЛЮЧЕНИЕ

по результатам биоинформатического анализа
данных секвенирования ДНК
(полное секвенирование экзома)

СВЕДЕНИЯ ОБ ОБСЛЕДУЕМОМ		СВЕДЕНИЯ ОБ ОБРАЗЦЕ	
Обследуемый	ФИО	Дата поступления образца	ДД.ММ.ГГГГ
Дата рождения	ДД.ММ.ГГГГ	Материал для анализа	Периферическая кровь
Пол	Женский	Внутренний номер	DXXXXXX

КЛИНИЧЕСКАЯ ИНФОРМАЦИЯ	
Направляющий врач	ФИО
Направительный диагноз	Синдром эпилепсии, индуцированный фебрильной инфекцией. Сложные фокальные приступы с нарушением сознания. Аутоиммунный энцефалит?
Клинические характеристики	Эпиактивность на ЭЭГ. Поведенческие, когнитивные нарушения. В анамнезе эпистатус, отек головного мозга. Дифференциальный диагноз: рецидивирующее течение аутоиммунного энцефалита, злокачественная эпилептическая энцефалопатия, фебрильные приступы плюс.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ, ВОЗМОЖНО ИМЕЮЩИЕ ОТНОШЕНИЕ К ФЕНОТИПУ

Ген	Ассоциированное заболевание (Номер OMIM; тип наследования*)	Изменение ДНК (hg19) Изменение транскрипта Изменение белка	Зиготность	Частота	Компьютерное предсказание	Эволюционная консервативность	Классификация патогенности
PCDH19	Ранняя младенческая эпилептическая энцефалопатия, тип 9 (300088; XL)	chrX:g.99661781del ENST00000373034.4: c.1815del ENSP00000362125.4: p.Tyr605Ter	Гетерозигота	0	Патогенный	—	Вероятно патогенный

Обнаружен ранее не описанный в литературе вариант в гетерозиготном состоянии в экзоне 1 (из 6) гена *PCDH19*, приводящий к возникновению преждевременного стоп-кодона (p.Tyr605Ter, вариант типа нонсенс).

Патогенные гетерозиготные варианты в гене *PCDH19* могут приводить к развитию ранней младенческой эпилептической энцефалопатии, тип 9. Проявление данного заболевания, как правило, ограничено женским полом (около 90% описанных пациентов — женского пола). Предполагается, что патогенез связан с соматическим мозаицизмом вследствие X-инактивации и нарушением адгезии клеточных популяций, экспрессирующих разные типы протокадгерина:

1. Mincheva-Tasheva S. et al. Disrupted excitatory synaptic contacts and altered neuronal network activity underpins the neurological phenotype in *PCDH19*-clustering epilepsy (*PCDH19-CE*). Mol Neurobiol. 2021 Jan 7.

Описаны и случаи заболевания у пациентов мужского пола, у некоторых из которых показан соматический мозаицизм по вариантам в гене *PCDH19*:

2. Niazi R. et al. A mutation update for the *PCDH19* gene causing early-onset epilepsy in females with an unusual expression pattern. Hum Mutat. 2019 Mar;40(3):243-257.

Затронутая аминокислотная позиция 605 находится во внеклеточном кадгериновом домене 6 (EC6) в молекуле протокадгерина 19. Описано несколько патогенных вариантов в гене *PCDH19*, затрагивающих близлежащие аминокислотные позиции, например, неоднократно описанный вариант p.Arg602Ter (*de novo* статус подтвержден в нескольких семьях):

3. Shibata M. et al. Comparative characterization of *PCDH19* missense and truncating variants in *PCDH19*-related epilepsy. J Hum Genet. 2020 Dec 2.

В статье 2 указано, что, согласно результатам биоинформатических алгоритмов, все описанные варианты типа нонсенс в гене *PCDH19* приводят к разрушению мРНК по механизму NMD. С другой стороны, в работе 3 получены свидетельства в пользу корреляции между положением нонсенс- и фреймшифт-вариантов и клинической картиной заболевания.

Вариант отсутствует в базе данных популяционных частот gnomAD.

Вариант расценивается как вероятно патогенный.

В целях уточнения клинической значимости обнаруженного варианта рекомендуется анализ его наследования от родителей (следует учитывать, что патогенный вариант в данном случае может быть унаследован от здорового отца либо иметь статус *de novo*).

ПОБОЧНО ВЫЯВЛЕННЫЕ ВАРИАНТЫ В ГЕНАХ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ К ПРОВЕРКЕ

НЕ ОБНАРУЖЕНО

* XL, X-linked, X-сцепленное наследование заболевания

Для интерпретации результатов исследования необходима консультация врача-генетика.

Публичное акционерное общество
«Центр Генетики и Репродуктивной Медицины
«ГЕНЕТИКО»
119333, Москва
ул. Губкина, д. 3, корп. 1
Лицензия
Л041-01137-77/00362852
от 06.12.2018

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Прибор	Illumina NovaSeq 6000	Среднее покрытие	100x
Набор для пробоподготовки	SureSelect all Exon V7	Процент целевых нуклеотидов с покрытием >10X	98,7%

Дата выдачи заключения: ДД.ММ.ГГГГ

Биоинформатик

Врач-лабораторный генетик

Врач-генетик

Публичное акционерное общество
«Центр Генетики и Репродуктивной Медицины
«ГЕНЕТИКО»
119333, Москва
ул. Губкина, д. 3, корп. 1
Лицензия
Л041-01137-77/00362852
от 06.12.2018

ТЕХНИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ

Секвенирование белок-кодирующих генов человека методом парно-концевых прочтений было проведено с использованием целевого обогащения геномной ДНК.

Исходные данные секвенирования в формате fastq могут быть предоставлены по запросу.

Данные секвенирования были проанализированы с помощью автоматизированного алгоритма, заключающего в себя оценку параметров качества секвенирования (модуль FASTQC); удаление адаптеров и последовательностей с низким качеством (модуль SEQPURGE); выравнивание прочтений на версию hg19 генома человека (модуль BWA MEM); фильтрацию оптических и ПЦР дубликатов (модуль SAMBLASTER); локальную оптимизацию выравниваний (модуль ABRA2); обнаружение вариантов и их фильтрация согласно качеству (пакет FREEBAYES) и аннотацию вариантов относительно баз данных с клинической информацией (модуль ENSEMBL-VEP).
Алгоритм был протестирован на экзомных данных, для которых существует расшифровка генома «золотого стандарта» (данные Genome in a Bottle). Чувствительность алгоритма составила 98,6% и средняя специфичность 99,1%.

При поиске клинически значимых генетических вариантов были отфильтрованы варианты, не влияющие на структуру белка и при этом не отмеченные как патогенные в базе данных ClinVar, а также все варианты, не отмеченные как патогенные в базе данных ClinVar, с максимальной частотой встречаемости в популяциях более 2%. Во всех генах, потенциально имеющих отношение к заболеванию пациента, каждый из вариантов был проанализирован на предмет влияния на структуру и функцию белка, эволюционную консервативность позиции, клинический статус, частоту встречаемости и тип наследования соответствующего гена и классифицирован в одну из пяти категорий (патогенные варианты, вероятно патогенные варианты, варианты неопределенного значения, вероятно безвредные варианты, безвредные) в соответствии с рекомендациями ACMG (7). Варианты из категорий «Патогенные варианты», «Вероятно патогенные варианты» и «Варианты неопределенного значения» включены в заключение в формате, соответствующем рекомендациям HGVS.

Повторный биоинформатический анализ исходных данных по запросу может быть проведен через год либо в случае уточнения фенотипа.

Публичное акционерное общество
«Центр Генетики и Репродуктивной Медицины
«ГЕНЕТИКО»
119333, Москва
ул. Губкина, д. 3, корп. 1
Лицензия
Л041-01137-77/00362852
от 06.12.2018

ИНФОРМАЦИОННОЕ ПРИЛОЖЕНИЕ

МЕТОДИКА ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Полноэкзомное секвенирование – это секвенирование всех белок-кодирующих генов человека (приблизительно 20 000), а секвенирование экзома с клинической целью – это секвенирование порядка 5000 генов, про которые на настоящий момент известна ассоциация с генетическими болезнями или признаками. Экзом составляет всего ~1% от полного генома человека, но приблизительно 85% всех болезнетворных вариантов находятся именно в белок-кодирующих областях. С помощью технологии секвенирования экзома можно определить последовательность 90-95% целевых участков человека, и некоторые участки поддаются секвенированию с помощью этой методики несколько хуже. Способность метода выявить болезнетворный вариант зависит от того, в каком участке он находится.

Метод предназначен для поиска однонуклеотидных замен в кодирующих участках генов человека. Некоторые другие типы генетических вариантов могут быть выявлены, но поддаются обнаружению с меньшей вероятностью, чем однонуклеотидные замены: это относится, в частности, к коротким делециям или вставкам (инделам) и изменениям числа коротких тандемных повторов.

Результативность обследования сильно зависит от наличия информации о варианте во внешних базах данных клинической информации, а также от изученности генетического заболевания пациента. В настоящий момент изучение генетических заболеваний является приоритетным направлением исследований во всем мире, и базы данных с клинической информацией постоянно пополняются. В практике клинического секвенирования экзома процент диагностированных случаев растет с каждым годом, поэтому в некоторых случаях переанализ данных секвенирования через некоторое время может привести к установлению диагноза, даже если изначально он не был поставлен.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Ввиду некоторых технических ограничений, секвенирование экзома не может покрыть 100% целевых участков. Мы обеспечиваем необходимое для достоверного обнаружения гетерозиготных вариантов покрытие: не менее 10x для 90% целевых участков. Частота ошибочно обнаруженных вариантов при секвенировании экзома в среднем составляет не больше 1%, но в отдельных участках может достигать 5%, поэтому релевантные варианты рекомендуется подтверждать независимым секвенированием по Сэнгеру или другими референсными методами, если такая возможность существует.

Некоторые типы вариантов поддаются выявлению методом экзомного секвенирования плохо, в том числе структурные изменения хромосом (инверсии, транслокации, делеции), полиплоидия, анэуплоидия, протяженные участки триплетных и других повторов, варианты в генах с наличием в геноме близкого по последовательности псевдогена или паралога, варианты в GC-богатых участках, варианты в интронах за пределами стандартных сайтов сплайсинга, а также эпигенетические варианты. Метод имеет ограниченную чувствительность в отношении вариантов в состоянии мозаицизма. Чувствительность и специфичность обнаружения вариантов, находящихся в областях сегментарных дупликаций, могут быть низкими.

Результаты клинического секвенирования всегда интерпретируются в контексте клинической картины, семейной истории и других лабораторных данных. Изучаются только варианты, которые потенциально могут иметь отношение к заболеванию пациента. Результаты секвенирования экзома могут быть интерпретированы неверно, если предоставленная информация ошибочна или неполна. Некоторые медицинские процедуры, такие как пересадка костного мозга или переливание крови могут привести к неверным результатам. Редкие безвредные варианты могут быть классифицированы неверно. Выявленные варианты не всегда объясняют все клинические проявления у пациента. Предоставление большего количество клинически значимой информации может помочь более точной оценке значимости выявленных вариантов.

ПОБОЧНО ВЫЯВЛЕННЫЕ ВАРИАНТЫ

ACMG разработал рекомендации (8) по предоставлению информации пациенту о патогенных и вероятно патогенных вариантах, присутствующих в некоторых генах (ACTA2, ACTC1, APC, APOB, ATP7B, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, CACNA1S, COL3A1, DSC2, DSG2, DSP, FBN1, GLA, KCNH2, KCNQ1, LDLR, LMNA, MEN1, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, MYBPC3, MYH11, MYH7, MYL2, MYL3, NF2, OTC, PCSK9, PKP2, PMS2, PRKAG2, PTEN, RB1, RET, RYR1, RYR2, SCN5A, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD3, SMAD4, STK11, TGFBR1, TGFBR2, TMEM43, TNNI3, TNNT2, TP53, TPM1, TSC1, TSC2, VHL, WT1). Эти гены связаны с определенными генетическими заболеваниями, нуждающимися в медицинском контроле. В случае обнаружения вариантов в этих генах необходима консультация врача-генетика.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА И РЕСУРСЫ

1. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/
2. Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/
3. Genome Aggregation Database (gnomAD). http://gnomad.broadinstitute.org/
4. ClinVar. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
5. Clinical Genome Resourse, ClinGene. https://www.clinicalgenome.org/
6. Ensembl. http://www.ensembl.org/index.html
7. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015
8. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. Genet Med. 2017
9. Sequence Variant Nomenclature https://varnomen.hgvs.org/

Публичное акционерное общество
«Центр Генетики и Репродуктивной Медицины
«ГЕНЕТИКО»
119333, Москва
ул. Губкина, д. 3, корп. 1
Лицензия
Л041-01137-77/00362852
от 06.12.2018