

Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS)

Рыжкова О.П.¹, Кардымон О.Л.², Прохорчук Е.Б.³, Коновалов Ф.А.⁴, Масленников А.Б.⁵, Степанов В.А.⁶, Афанасьев А.А.⁷, Заклязьминская Е.В.⁸, Костарева А.А.⁹, Павлов А.Е.¹⁰, Голубенко М.В.⁶, Поляков А.В.¹, Куцев С.И.¹

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва; e-mail ryzhkova@dnalab.ru

² ООО ЦГРМ «Генетико», Москва

³ ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН», Москва

⁴ ООО «Геномед», Москва

⁵ ГБУЗ НСО «ГКБ №1», Новосибирск

⁶ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск

⁷ ООО «Бином», Москва

⁸ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского», Москва

⁹ ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург

¹⁰ ООО «Парсек Лаб», Санкт-Петербург

В связи с все более частым использованием новейших технологий секвенирования в различных областях научной и медицинской деятельности назрела необходимость стандартизации качества исследований, а также подходов к биоинформатической обработке получаемых данных. Представленный проект руководства является первым документом в Российской Федерации, регламентирующим интерпретацию результатов, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS), и определяющим необходимые качественные и количественные характеристики результатов MPS. Руководство – результат совместной работы специалистов различных областей: биоинформатиков, врачей лабораторных генетиков и врачей-генетиков. Оно предназначено для специалистов, работающих с технологиями MPS, а его основной целью является унификация подходов к интерпретации и контроль качества получаемых результатов.

Ключевые слова: массовое параллельное секвенирование (MPS), рекомендации, биоинформатический анализ, критерии патогенности вариантов последовательности ДНК.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants

Ryzhkova O.P.¹, Kardymon O.L.², Prohorchuk E.B.³, Konovalov F.A.⁴, Maslennikov A.B.⁵, Stepanov V.A.⁶, Afanasyev A.A.⁷, Zaklyazminskaya E.V.⁸, Kostareva A.A.⁹, Pavlov A.E.¹⁰, Golubenko M.V.⁶, Polyakov A.V.¹, Kutsev S.I.¹

¹ Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», Moscow; e-mail ryzhkova@dnalab.ru

² Genetico LLC, Moscow

³ Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences», Moscow

⁴ Genomed LLC, Moscow

⁵ State Budgetary Health Institution of the Novosibirsk Region «City Clinical Hospital №1», Novosibirsk

⁶ Federal State Budgetary Institution «Tomsk National Research Medical University the Russian Academy of Sciences», Tomsk

⁷ iBinom Inc., Moscow

⁸ Federal State Budgetary Institution «Petrovsky Russian Research Centre of Surgery», Moscow

⁹ Federal State Budgetary Institution « V.A. Almazov Federal North-West Medical Research Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation», Sankt-Peterburg

¹⁰ Parseq Lab LLC», Sankt-Peterburg

Massive parallel sequencing (MPS) are the most progress and success of technologies in genetic researches. However, the new technologies bring challenges in terms of data management, as well as for the bioinformatics and interpretation of result. This guideline for the evaluation and validation of MPS data is the first document in Russian Federation. A group of bioinformatics, laboratory genetics and clinical genetics worked at these guidelines. We believe that these recommendations would help to stakeholders in the field of human genetics uniforming and managing MPS data.

Key words: Massive parallel sequencing (MPS), guidelines, bioinformatics analysis, DNA variants classification criteria.

Введение

Основой для руководства послужили существующие руководства по интерпретации результатов массового параллельного секвенирования (MPS), разновидностью которых являются методы секвенирования нового поколения (NGS), которые были разработаны в США и Европе (стандарты и руководства ACMG, CAP, ESHG и FDA) [1–4]. Эти документы были переработаны группой ведущих российских специалистов в области генетики и биоинформатики.

Первоначальный проект руководства был представлен на Всероссийской научно-практической конференции «NGS в медицинской генетике» 22–24 апреля 2016 г. в г. Суздаль, и в течение последующих трех месяцев был открыт для внесения правок и комментариев.

В представленной для публикации редакции руководства были учтены поступившие замечания и приняты во внимание комментарии участников обсуждения. Валидация руководства проведена путём внутренней экспертной оценки.

Определение технологии

Технология массового параллельного секвенирования (MPS, massive parallel sequencing) — техника определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК для получения формального описания их первичной структуры. Технология MPS позволяет одновременно «прочитать» большое количество участков генома, что является её главным отличием от более ранних методов секвенирования. В ходе MPS могут генерироваться от сотен миллионов до миллиардов нуклеотидных последовательностей за один рабочий цикл. Отличительной особенностью использования данных методов является необходимость многократного прочтения анализируемой нуклеотидной последовательности. Все варианты последовательности ДНК, выявленные методом MPS и указанные в заключении лаборатории о проведенном анализе, должны быть подтверждены референсным методом (секвенирование по Сенгеру).

Терминология

Предлагается заменить широко используемые термины «мутация» и «полиморфизм» на термин «вариант нуклеотидной последовательности» со следующими характеристиками:

- патогенный (pathogenic);
- вероятно патогенный (likely pathogenic);
- неопределенного значения (uncertain significance);
- вероятно доброкачественный (likely benign);
- доброкачественный (benign).

Номенклатура вариантов нуклеотидной последовательности

Рекомендуется использовать единую, рекомендуемую мировым научным сообществом, номенклатуру вариантов нуклеотидной последовательности в соответствии с ресурсом <http://www.hgvs.org/mutnomen> (обязательно указание используемой версии). Инструменты для правильного описания вариантов нуклеотидной последовательности в соответствии с номенклатурой HGVS представлены на сайте <https://mutalyzer.nl>.

Референсная последовательность должна быть получена из:

- базы данных Национального центра биотехнологической информации RefSeq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) с указанием номера версии

или

- из базы данных Locus Reference Genomic (<http://www.lrg-sequence.org>).

Геномные координаты следует определять и использовать в соответствии со стандартом геномной сборки (например, GRCh38/hg38) или референсной геномной последовательностью, охватывающей весь ген (в том числе 5' и 3' нетранслируемые области и промотор).

Референсный транскрипт должен представлять собой наиболее клинически значимый и/или наиболее длинный из известных транскриптов. Референсные транскрипты, рекомендуемые мировым сообществом, могут быть идентифицированы с использованием баз данных:

- Locus Reference Genomic (<http://www.lrg-sequence.org>);
- Consensus CDS Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcidsBrowse.cgi>);
- Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>);
- ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>)

или

- локус-специфичных баз данных.

Лаборатории должны проверять клиническую значимость варианта нуклеотидной последовательности во всех возможных транскриптах.

Из правил номенклатуры HGVS возможны три исключения:

1. Символ «X» приемлем в отчетности по нон-сенс-вариантам в дополнение к использующимся в номенклатуре HGVS символам «*» и «Ter».
2. Возможна нумерация экзонов в соответствии с выбранным референсным транскриптом, используемым для обозначения варианта.
3. При клинической интерпретации результатов MPS допускается использовать термин «патогенный» вместо выражения «влияет на функцию».

Базы данных и литературные источники

Все обнаруженные варианты нуклеотидной последовательности необходимо классифицировать по патогенности. Оценка патогенности выявленных вариантов

включает изучение медицинской и научной литературы и баз данных. Для поиска описанных ранее вариантов рекомендуется использовать следующие базы данных (табл. 1).

Таблица 1

Рекомендуемые базы данных нуклеотидной последовательности человека

База данных, Web сайт	Описание
Популяционные базы данных	
Exome Aggregation Consortium http://exac.broadinstitute.org/	База данных вариантов, найденных при проведении экзомного секвенирования образцов ДНК 61,486 неродственных индивидуумов, являющихся участниками различных болезнь-специфичных и популяционных генетических исследований. Лица, с наследственными заболеваниями, проявляющимися в детстве, были исключены из выборки.
Genome Aggregation Database http://gnomad.broadinstitute.org/	Расширенная база данных геномных вариантов, основанная на базе Exome Aggregation Consortium, включающая данные по 123 136 экзомов и 15 496 геномов.
Exome Variant Server http://evs.gs.washington.edu/EVS/	База данных вариантов, найденных при экзомном секвенировании нескольких крупных когорт лиц европейского и афроамериканского происхождения. Включает в себя данные о покрытии, что важно для учета информации об отсутствии варианта.
1000 Genomes Project http://browser.1000genomes.org/index.html	База данных вариантов, найденных во время геномного и таргетного секвенирования с низким и высоким покрытием в 26 популяциях. Содержит информацию о большем числе вариантов по сравнению Exome Variant Server, но включает данные низкого качества. Некоторые обследованные когорты включали родственных индивидуумов.
dbSNP http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp	База данных коротких генетических вариантов (как правило, <50 п.н.), собранных из различных источников. Наряду с доброкачественными и вероятно доброкачественными вариантами содержит и множество патогенных вариантов.
dbVar http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar	База данных структурных вариантов (как правило, ≥50 п.н.), составленная из многих источников
Базы данных, включающие описания фенотипов	
OMIM http://www.omim.org/	База данных генов человека и генетических состояний, которая содержит репрезентативную выборку вариантов нуклеотидной последовательности, ассоциированных с заболеваниями.
Human Gene Mutation Database http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php	База данных аннотированных вариантов нуклеотидной последовательности, опубликованных в литературе. Доступ к основной части контента требует оплаты. В базе встречаются доброкачественные и вероятно доброкачественные варианты, необходимо уточнять клиническую значимость вариантов по литературным данным.
ClinVar http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/	База данных утверждений о клинической значимости и фенотипической взаимосвязи вариантов. Содержит данные низкого качества, в связи с чем не рекомендуется ее использование при формировании заключений о патогенности выявленного варианта. Использование может быть ограничено только поиском ссылок на литературные источники.
Специфичные базы данных (локус/ болезнь/ этническая принадлежность/ другие)	
Human Genome Variation Society http://www.hgvs.org/dblist/dblist.html Leiden Open Variation Database http://www.lovd.nl	Сайт общества по изучению вариаций генома человека, создавшего список тысяч баз данных, которые предоставляют варианты аннотации конкретных вариантов нуклеотидной последовательности человека. Большое число баз данных представлено в системе Leiden Open Variation Database system.
DECIPHER https://decipher.sanger.ac.uk/	Молекулярно-цитогенетическая база данных для врачей и исследователей, связывающая геномные данные, полученных с использованием микрочипов, с фенотипом, используя геномный браузер Ensembl.
Базы данных о кодирующей последовательности	
NCBI Genome http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome	Ресурс полногеномных референсных последовательностей
RefSeqGene http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg/	Ресурс референсных последовательностей клинически релевантных генов
MitoMap http://www.mitomap.org/MITOMAP/	Исправленная кембриджская референсная последовательность митохондриальной ДНК человека

Рекомендации по использованию баз данных

При использовании баз данных лаборатории должны проверить:

1. Частоту обновлений, курирование базы данных (необходимо использовать новейшую версию и/или базу, куратором которой является институт с хорошей репутацией).

2. Использование номенклатуры HGVS и наличие указаний на референсные последовательности для сборки генома и транскриптов, используемые при наименовании вариантов.

3. Показатели качества, приводящиеся для оценки точности данных (может потребоваться чтение соответствующих публикаций).

4. Источник и независимость исследований, в которых содержится информация о варианте нуклеотидной последовательности.

Рекомендации по использованию литературных источников

Литературные источники, в которых употребляются старая номенклатура и классификация вариантов нуклеотидной последовательности, должны быть использованы с осторожностью. Так же настороженно следует относиться к данным, встретившимся лишь в одном литературном источнике.

Следует учитывать, что одни и те же индивидуумы, а также их родственники, могут встречаться несколько раз в различных литературных источниках в зависимости от контекста и размера выборки. Это может быть связано как с пересечением авторства и межлабораторным сотрудничеством, так и с тем, что данные по пробанду и членам его семьи имеются в различных клинических базах. В результате возможно дублирование при подсчете интересующих случаев и ложное увеличение частоты варианта. Пересечение по авторству или учреждениям является первым признаком потенциального пересечения наборов данных.

Компьютерные (in silico) предсказательные программы

Если вариант нуклеотидной последовательности не был описан в литературе ранее и не представлен ни в одной из баз данных, или сведения о нем недостаточны, для заключения о его клинической значимости можно использовать программы предсказаний патогенности. В табл. 2 представлены адреса сайтов и краткое описание наиболее часто используемых на данный момент программ предсказания.

Критерии для интерпретации вариантов

Варианты, описанные ранее в нескольких источниках (кроме ClinVar), являющиеся причиной развития интересующего фенотипа с соответствующим типом наследования, классифицируются как патогенные.

Для интерпретации остальных вариантов предлагается использовать два набора критериев: первый для классификации патогенных вариантов, второй для классификации доброкачественных вариантов. Критерий патогенности может быть очень сильный (PVS1), сильный (PS1-4), средний (PM1-5) или вспомогательный (PP1-5). Критерий доброкачественности варианта может быть очень сильный (независимый) (BA1), сильный (BS1-4) или вспомогательный (BP1-6). Соответствие анализируемого варианта нумерации признаков, характеризующих каждый критерий, не дает никаких оснований для изменения его клинической значимости. Важно только отнесение варианта к тому или иному критерию, нумерация признаков нужна для упрощения их использования.

Для каждого варианта нуклеотидной последовательности специалист выбирает подходящие признаки, которые затем объединяет в соответствии с приведенными ниже правилами (табл. 3), классифицируя значимость варианта по пятиуровневой системе: патогенный, вероятно патогенный, неопределенного значения, вероятно доброкачественный, доброкачественный. Если вариант не отвечает критериям любого набора (для патогенных или доброкачественных критериев), или доказательства доброкачественности и патогенности противоречивы, то он считается вариантом неопределенного значения.

Характеристики критериев отнесения вариантов нуклеотидной последовательности к патогенным или доброкачественным*Патогенный (P) вариант*

Критерий «очень сильный» (very strong, PVS):

PVS1: LOF-варианты — варианты, приводящие к прекращению синтеза белка (нонсенс-мутации; мутации со сдвигом рамки считывания; изменения канонических (± 1 или ± 2) нуклеотидов сайта сплайсинга; варианты, приводящие к изменениям в инициирующем кодоне; делеции/дупликации одного или нескольких экзонов), если данный тип варианта нуклеотидной последовательности гена является известной причиной заболевания.

При отнесении варианта к критерию PVS необходимо принять во внимание, что:

- существуют гены, варианты нуклеотидной последовательности которых, приводящие к прекращению синтеза белка, не являются патогенными (например, *GFAP*, *MYH7*);

- нужно быть осторожным при интерпретации вариантов нуклеотидной последовательности, расположенных близко к 3' концу гена;

- необходимо соблюдать осторожность при интерпретации сплайс-вариантов, которые прогнозируемо приводят к пропуску экзонов, но оставляют оставшуюся часть белка нетронутой и не меняют рамку считывания;

- необходима осторожность при наличии нескольких транскриптов.

Критерий «сильный» (strong, PS):

PS1: вариант, приводящий к замене на аминокислоту, которая была описана ранее как патогенная для этого заболевания, в том же положении. Например: если описана замена G>C, приводящая к замене Val>Leu, то замена G>T, приводящая к такой же аминокислотной замене, соответствует критерию PS1.

Следует принять во внимание, что варианты, патогенность которых обусловлена изменением сайта сплайсинга, а не аминокислоты относятся к критерию PVS1.

PS2: *de novo* вариант, отсутствующий у обоих родителей пациента.

Для отнесения варианта к этому критерию необходимо подтверждение как отцовства, так и материнства. Донорство яйцеклеток, суррогатное материнство,

ошибки при подсадке эмбриона в программах экстракорпорального оплодотворения и т.д. могут привести к «ложному» материнству.

PS3: подтверждение патогенности эффекта варианта функциональными исследованиями (*in vitro* или *in vivo*) гена или продукта гена. Функциональные исследования должны быть валидируемыми, воспроизводимыми и проведенными лабораториями, имеющими хорошую репутацию.

PS4: распространенность варианта у больных индивидумов значительно выше, чем в контрольной группе. Отношение шансов (OR), полученное при исследовании «случай-контроль» >5,0.

Если результаты исследования «случай-контроль» статистически не достоверны, очень редкий вариант нуклеотидной последовательности у нескольких не свя-

Таблица 2

Наиболее часто используемые компьютерные программы предсказания патогенности вариантов нуклеотидной последовательности (in silico)

Название — Вебсайт	Основа
ConSurf — http://consurftest.tau.ac.il/	Эволюционная консервативность
FATHMM — http://fathmm.biocompute.org.uk/	Эволюционная консервативность
MutationAssessor — http://mutationassessor.org/	Эволюционная консервативность
PANTHER — http://www.pantherdb.org/tools/snpScoreForm.jsp	Эволюционная консервативность
PhD-SNP — http://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html	Эволюционная консервативность
SIFT — http://sift.jcvi.org/	Эволюционная консервативность
SNPs&GO — http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/	Структура/функция белка
Миссенс-замены	
Align GVGD - http://agvgd.hci.utah.edu/agvgd_input.php	Структура/функция белка и эволюционная консервативность
MAPP — http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/MAPP/index.html	
MutationTaster - http://www.mutationtaster.org/	
MutPred — http://mutpred.mutdb.org/	
PolyPhen-2 — http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/	Выравнивание и измерение сходства между последовательностью варианта и последовательностью гомологичного белка
PROVEAN - http://provean.jcvi.org/index.php	
SIFT — http://provean.jcvi.org/index.php	Выравнивание множества последовательностей и анализ структуры белка
nsSNPAnalyzer — http://snpanalyzer.uthsc.edu/	
Condel — http://bg.upf.edu/fannsdB/	Объединяет SIFT, PolyPhen-2 и MutationAssessor
Изменения в сайтах сплайсинга	
GeneSplicer — http://ccb.jhu.edu/software/genesplicer/	Модели Маркова
Human Splicing Finder — http://www.umd.be/HSF/	Основанное на положении варианта
MaxEntScan — http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentsscanscoreseq.html	Принцип максимальной энтропии
NetGene2 — http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/	Нейронные сети
NNSplice — http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html	Нейронные сети
ASSP — http://wangcomputing.com/assp/	Нейронные сети
FSPLICE — http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fssplice&group=programs&subgroup=gfind	Видоспецифичный предиктор сайтов-сплайсинга, основанный на модели весовой матрицы

занных родством пациентов с одинаковым фенотипом при его отсутствии в контрольной группе, следует отнести к критерию средний (PM, moderate).

Критерий «средний» (moderate, PM):

PM1: вариант расположен в «горячей» точке и/или важных и хорошо исследованных функциональных доменах белка (например, активный сайт фермента), в которых не описаны доброкачественные изменения.

PM2: вариант отсутствует в контрольной выборке (или встречается с крайне низкой частотой): для аутосомно-доминантных заболеваний частота аллеля не должна превышать 0,01%, для аутосомно-рецессивных заболеваний — 0,5%, для доминантных X-сцепленных — 0,03%, для рецессивных X-сцепленных — 0,5%.

Следует учитывать, что данные о частоте в популяциях инсерций/делеций могут быть плохо аннотированы в базах данных, содержащих информацию о результатах NGS.

PM3: вариант, находящийся в транс-положении с описанным патогенным вариантом при рецессивных заболеваниях. Для подтверждения требуется анализ родителей (или потомков).

PM4: вариант, приводящий к синтезу белка измененной длины (инсерции/делеции в рамках считывания в неповторяющихся регионах или потеря стоп-кодона/замена на аминокислоту).

PM5: новые миссенс-варианты, приводящие к замене аминокислоты в положении, в котором другие миссенс-варианты, выявленные ранее, были описаны, как патогенные. Следует с осторожностью относиться к интерпретации изменений нуклеотидной последовательности, которые влияют на сплайсинг.

Критерий «вспомогательный» (supporting, PP):

PP1: вариант в гене, для которого точно установлена связь с болезнью вследствие косегрегации у нескольких пораженных членов семьи. По мере накопления данных о сегрегации может быть отнесен к критерию «сильный» (PS).

PP2: миссенс-вариант в гене, в котором редки доброкачественные миссенс-варианты, но они являются обычной причиной возникновения заболевания.

PP3: результаты не менее трех программ предсказания патогенности *in silico* подтверждают патогенное воздействие варианта на ген или генный продукт. При этом следует учитывать, что многие программы используют одни и те же или очень схожие алгоритмы, поэтому результаты использования нескольких программ не могут считаться независимыми и должны оцениваться в сочетании. Таким образом, критерий PP3 используется для оценки варианта один раз, представляя собой комбинацию результатов всех программ предсказания патогенности.

PP4: фенотип пациента или/и семейная история высоко специфичны для заболевания с данной наследственной этиологией

PP5: источники с хорошей репутацией указывают на патогенность варианта, но независимая оценка не проводилась.

Доброкачественный (B)

Критерий «очень сильный (независимый)» (stand-alone, BA):

BA1: частота аллеля >3% в базах данных ESP, 1KP или EXAC.

Критерий «сильный» (strong, BS):

BS1: частота аллеля больше, чем ожидаемая для заболевания: для аутосомно-доминантного заболевания частота аллеля не должна превышать 0,01%, для аутосомно-рецессивного заболевания — 0,5%, для доминантного X-сцепленного — 0,03%, для рецессивного X-сцепленного — 0,5%.

BS2: если вариант нуклеотидной последовательности в гене, изменения которого приводят к заболеванию с полной пенетрантностью с манифестацией в детстве, встретился у здорового взрослого человека:

- 1) в гомозиготном состоянии при заболеваниях с рецессивным типом наследования;
- 2) в гетерозиготном состоянии при заболеваниях с доминантным типом наследования или
- 3) в гемизиготном состоянии при X-сцепленных заболеваниях.

BS3: функциональные исследования (*in vitro* или *in vivo*), подтверждают отсутствие патогенного эффекта варианта на ген или генный продукт. Функциональные исследования должны быть валидируемыми, воспроизводимыми и проведенными лабораториями, имеющими хорошую репутацию.

BS4: вариант нуклеотидной последовательности, для которого точно установлено отсутствие косегрегации с болезнью в семье. При этом следует принять во внимание, что наличие фенокopies может имитировать отсутствие сегрегации у пораженных лиц, а наличие в семье более чем одного патогенного варианта может также привести к ложному заключению об отсутствии косегрегации варианта и заболевания.

Критерий «вспомогательный» (support, BP):

BP1: миссенс-вариант в гене, о котором известно, что только варианты нуклеотидной последовательности, приводящие к изменению длины белка, являются причиной заболевания.

BP2: если выявлен один патогенный вариант, соответствующий фенотипу заболевания с полной пенетрантностью, а неописанный вариант находится с ним в транс-положении при доминантном типе наследования заболевания или в цис-положении при любом другом типе наследования.

BP3: делеции/инсерции с сохранением рамки считывания, если не проводилось функциональное исследование.

BP4: результаты не менее трех программ предсказания патогенности *in silico* подтверждают отсутствие воздействия варианта на ген или генный продукт. При этом следует учитывать, что многие программы используют одни и те же или очень схожие алгоритмы, поэтому результаты использования нескольких программ не могут считаться независимыми и должны оцениваться в сочетании. Как и PP3, критерий BP4 используется для оценки варианта один раз, представляя собой комбинацию результатов всех программ предсказания патогенности.

BP5: источники с хорошей репутацией сообщили об отсутствии патогенности варианта, но независимая оценка не проводилась.

BP6: синонимичный (*silent*) вариант с отсутствием влияния на консенсусную последовательность сплайс-сайтов по данным алгоритмов предсказания сплайсинга (отсутствует новые сайты сплайсинга) и нуклеотид не является эволюционно высоко консервативным.

В заключении лаборатории о проведенном исследовании следует отражать только варианты, относящиеся к группам: патогенный, вероятно патогенный, неопределенного значения. Доброкачественные и вероятно доброкачественные варианты в заключении отражать не следует.

При обнаружении патогенных вариантов, соответствующих фенотипу пациента и не противоречащих типу наследования (1 вариант при заболевании с доминантным типом наследования и X-сцепленным рецессивным типом наследования у пациентов мужского пола; 2 и более варианта в одном гене при аутомосно-рецессивном типе наследования и X-сцепленном рецессивном у пациентов женского пола) в заключении следует отражать только эти варианты, другие выявленные варианты в заключении отражать не следует.

При обнаружении одного патогенного и одного и более вероятно патогенного вариантов нуклеотидной последовательности в одном гене, соответствующих фенотипу пациента, при заболевании с аутомосно-рецессивным и X-сцепленным рецессивным типами наследования, в заключении следует отражать только их, с указанием на необходимость семейного анализа для установления *cis*- или *trans*-положения вариантов. Другие выявленные варианты в заключении отражать не следует.

В остальных случаях необходимо отражать все выявленные варианты, относящиеся к группам патогенный, вероятно патогенный и неопределенного значения.

Необходимо также указывать на наличие выявленных у пациента патогенных вариантов в генах, не связанных с направительным диагнозом, но обуславливающих развитие заболеваний, для которых существует лечение.

Общие требования к отчёту лаборатории и заключению о результатах исследования

Несмотря на сложность информации отчёт должен быть краткими и ёмким.

Разделы отчёта должны включать информацию о пациенте, список выявленных патогенных, вероятно патогенных вариантов и вариантов неопределенного значения (см. выше), интерпретацию, методологию, качество данных, ссылки к литературе.

Информация о пациенте

Информация о пациенте должна включать: ФИО (в трех строках друг под другом), дату рождения, пол, клинический диагноз, родственные отношения (если есть данные о других членах семьи)

Информация о выявленных вариантах:

1. Список патогенных, вероятно патогенных и вариантов неопределенного значения, выявленных при анализе, по номенклатуре HGVS, включая:

- название гена;
- положение (позиция замены в геноме по GRCh/hg);
- зиготность;
- номер экзона;
- номенклатура на уровне нуклеотида и ДНК;
- номенклатура на уровне белка (в случаях, где используется историческая (альтернативная) номенклатура, рекомендуется указывать оба варианта.

2. Номер используемой референсной последовательности (NM).

3. Название заболевания.

4. Тип наследования.

5. Частоты варианта в базах данных (в описании используемых баз данных должны быть указаны их версии).

6. Результаты программ предсказания с указанием Score (в описании используемых программ должны быть указаны их версии). Должны быть указаны результаты всех программ, которые использует лаборатория для интерпретации клинической значимости варианта, а не только те, где он клинически значим.

Данные о покрытии (качество данных):

1. Среднее покрытие исследуемой области при секвенировании полного (WES)/ «клинического» экзона и панелей генов должно быть не менее $\times 70$, полного генома (WGS) не менее $\times 15$.

2. При исследовании WES/WGS/«клинического» экзона, больших панелей генов (>100 т.п.н.) необходимо указывать долю (%) областей с покрытием менее $\times 10$.

3. При исследовании небольших панелей генов (<100 т.п.н.) необходимо указывать все регионы с покрытием менее $\times 10$.

4. При обнаружении только одного варианта в гетерозиготном состоянии в гене заболевания с рецессив-

ным типом наследования при любом типе исследования необходимо указывать все области гена с покрытием менее x10.

5. Информация о подтверждении найденных вариантов секвенированием по Сенгеру.

Дополнительная информация:

- семейное происхождение варианта, если известно;
- при анализе конкретных вариантов, перечисление списка искомых вариантов в рамках исследования.

Интерпретация:

При интерпретации результатов должна приводиться доказательная база, на основании которой классифицированы варианты в отчёте.

Стоит указывать:

- предсказанный эффект на синтезируемый белок;
- описан ли данный вариант ранее в литературе или в базе данных заболеваний или контрольной группы, если да, то сколько раз (1 или более), № замены и частоту выявленного аллеля с указанием базы данных, из которой получена информация;

- литературные источники (при наличии), которые использовались для классификации варианта, указываются в двух местах:

- рядом с описанием варианта;
- в конце отчёта;

- рекомендации врачу для дополнительного лабораторного и/или функционального тестирования;

- данные о неполной пенетрантности, фенотипической и генетической гетерогенности;

- обобщённый вывод по результатам использования программ предсказания патогенности *in silico* и анализа эволюционной консервативности варианта;

- обязательно информацию о подтверждении результатов анализа MPS референсным методом (секвенирование по Сенгеру) для всех вариантов, внесенных в заключение.

Отчёт по вариантам в генах неопределённого значения, показанных к тестированию

Ген неопределённого значения — это ген без доказанной ассоциации с фенотипом пациента или ассоциированный с другим фенотипом, отличным от фенотипа исследуемого пациента.

Таблица 3

Правила комбинирования критериев для классификации вариантов

Патогенный вариант	<ol style="list-style-type: none"> 1 очень сильный критерий (PVS1) и <ol style="list-style-type: none"> 1 сильный (PS1-PS4) или 2 и более средних (PM1-PM5) или 1 средний (PM1-PM5) и 1 вспомогательный (PP1-PP5) 2 и более вспомогательных (PP1-PP5) 2 и более сильных (PS1-PS4) критериев 1 сильный критерий (PS1-PS4) и <ol style="list-style-type: none"> 3 и более средних (PM1-PM5) или 2 средних (PM1-PM5) и 2 и более вспомогательных (PP1-PP5) или 1 средний (PM1-PM5) и 4 и более вспомогательных (PP1-PP5)
Вероятно патогенный вариант	<ol style="list-style-type: none"> 1 очень сильный (PVS1) и 1 средний (PM1-PM5) 1 сильный (PS1-PS4) и 1-2 средних (PM1-PM5) 1 сильный (PS1-PS4) и 2 и более вспомогательных (PP1-PP5) 3 и более средних (PM1-PM5) 2 средних (PM1-PM5) и 2 и более вспомогательных (PP1-PP5) 1 средний (PM1-PM5) и 4 и более вспомогательных (PP1-PP5)
Вариант неопределённого значения	<ol style="list-style-type: none"> Вариант не описывается ни одним критерием Критерии доброкачественности и патогенности противоречат друг другу
Вероятно доброкачественный вариант	<ol style="list-style-type: none"> 1 сильный (BS1-BS4) и 1 вспомогательный (BP1-BP6) 2 и более вспомогательных (BP1-BP6)
Доброкачественный вариант	<ol style="list-style-type: none"> 1 очень сильный (BA1) или 2 сильных (BS1-BS4)

В случаях с генами неопределённого значения предлагаемая классификация вариантов нуклеотидной последовательности применяться не может, по следующим причинам:

- *de novo* вариант не имеет сильной доказательной базы (в среднем человек имеет 1 *de novo* вариант на экзом и 100 *de novo* вариантов на геном);
- у здорового человека встречаются от 2 до 4 LOF-вариантов на геном (нарушающих синтез белка).

Варианты, найденные в генах неопределённого значения, следует помечать в отчёте как «варианты в генах неопределённого значения» и всегда относить к вариантам неопределённого значения.

Новые клинические случаи с редкими фенотипами и выявленными патогенными вариантами смогут позволить в дальнейшем классифицировать эти варианты по представленным руководствам.

Методология

Раздел «Методология» должен включать следующую информацию:

- тип образца (кровь, слюна, биоптат и др.);
- метод выделения нуклеиновых кислот;
- тип подготовки библиотек (ПЦР, гибридный захват, амплификация полного генома и др.);
- коммерческое название прибора, на котором проводилось исследование и методы анализа нуклеиновых кислот;
- официальное наименование гена (при анализе конкретного гена или списка генов), заявленное в Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee. Информация о гене может быть указана в ссылке на электронный источник (при анализе экзомов);
- номер транскрипта согласно RefSeq;
- геномный референс с указанием версии;
- недоступность некоторых вариантов для анализа (при недостаточном покрытии регионов при секвенировании).

В отчёте не должны указываться клинические рекомендации по ведению пациента.

Повторный анализ и подтверждение результатов

Ввиду постоянно растущего объема информации о геномных вариантах, может потребоваться повторный анализ результатов проведенного исследования, для чего врачу рекомендуется периодически запрашивать актуальную информацию у лабораторий (1 раз в 6–12 месяцев). Лаборатории должны предоставить описание используемой методики повторного анализа данных и пояснить, требуется ли дополнительная оплата за такой анализ.

Проведение дополнительных анализов таких, как секвенирование по Сенгеру для верификации выявленных вариантов, анализ ДНК родителей для установле-

ния цис-, транс- положения выявленных вариантов, вариантов *de novo*, родства и др. может включаться или нет в стоимость анализа на усмотрение лаборатории.

Каждый пациент должен подписывать информированное согласие на проведение анализа, использующего технологии MPS, в котором должны быть указаны все ограничения методов.

Особые положения

Особенности интерпретация вариантов нуклеотидной последовательности у здоровых или людей без симптомов

Для отнесения варианта к патогенным необходима сильная доказательная база. Вероятность обнаружения вариантов, признанных патогенными, обычно очень низкая.

Предсказанная пенетрантность патогенного варианта, обнаруженного в отсутствии фенотипа или семейного анамнеза, может быть намного ниже, чем у пациента с симптомами.

Распространённые многофакторные заболевания

Данное руководство не применимо для оценки клинической значимости вариантов, ассоциированных с многофакторными заболеваниями.

Определение генов, ответственных за распространённые многофакторные заболевания основывается на популяционном подходе (GWAS), а не на семейных исследованиях. Насчитывается более 1200 вариантов с повышенным риском развития таких заболеваний и наследственных черт; большинство этих вариантов находятся за пределами генных регионов. Польза тестирования вариантов, ассоциированных с многофакторными заболеваниями, для клинической практики не очевидна.

Настоящее руководство не предлагает форму отчёта по вариантам для многофакторных признаков; включать в отчёт эти варианты можно в качестве дополнительных сведений. Термины «патогенный» и «вероятно патогенный» не приемлемы в данном контексте, даже если ассоциация статистически достоверна. Упомянуть эти варианты стоит как «аллели риска», доказательство риска может быть выражено в терминах «установленный аллель риска», «вероятный аллель риска» или «неопределённый аллель риска».

Особенности интерпретации и анализа вариантов митохондриальной ДНК

Номенклатура вариантов митохондриальной ДНК отличается от номенклатуры для ядерных генов. В ней используется нумерация по последовательности митохондриальной ДНК (пример: m.8992T>C) и последовательности белка. Действующая референсная последовательность — Revised Cambridge Reference Sequence of the Human Mitochondrial DNA (NC_012920 gi:251831106).

Наличие гетероплазмии или гомоплазмии должно быть включено в отчёт с приблизительной оценкой уровня гетероплазмии. Уровень гетероплазмии в разных типах тканей может различаться, поэтому она должна быть интерпретирована с учетом исследованного биологического образца.

Для анализа патогенности выявленных вариантов применяются те же подходы, что и для анализа вариантов ядерного генома. Если вариант присутствует в филогении митохондриальной ДНК человека (phylotree.org), то он не может быть классифицирован как патогенный.

Источники для интерпретации вариантов митохондриальной ДНК:

- MitoMap — главный информационный источник по митохондриальным вариантам и гаплотипам;
- по частоте встречаемости (mtdb.igp.uu.se);
- для митохондриальных транспортных ДНК (ma-mitna.u-strasbg.fr);
- для митохондриальных гаплогрупп (phylotree.org);
- другая информация (mtdnacommunity.org/default.aspx).

Особенности анализа соматических вариантов

При анализе данного типа вариантов необходимо руководствоваться рекомендациями по интерпретации соматических вариантов с перечислением ссылок на опухолевые базы данных в дополнение к базам данных для структурных вариантов. Данное руководство неприменимо для анализа соматических вариантов.

Особенности фармакогеномного анализа и интерпретации

При классификации фармакогеномных вариантов использование терминов, характеризующих метаболизм (быстрый, средний, медленный), эффективность воздействия препарата (резистентный, быстро реагирующий, чувствительный) или риск нежелательных эффектов может быть более уместным нежели термина «патогенный». Данное руководство неприменимо для оценки клинической значимости фармакогеномных аллелей.

Заключительные положения для лабораторий

Анализ «первичных» результатов MPS может проводить только врач лабораторный генетик в кооперации с другими специалистами, такими как биоинформатик и врач-генетик.

Данные, полученные методами MPS должны интерпретироваться врачом лабораторным генетиком, затем обязательна консультация врача-генетика, который выдает клиническое заключение.

Наилучшие результаты получаются в результате тесного взаимодействия клинического учреждения и лаборатории в процессе проведения анализа.

Для более точной интерпретации результатов MPS необходима подробная клиническая информация; лаборатория вправе отказать в анализе, если не получает до-

статочную информацию о фенотипе пациента вместе с биологическим образцом.

Лаборатория обязана оценить вариант и ген в контексте анамнеза и семейной истории пациента, клинических данных и предшествующих лабораторных тестов, и с использованием этой информации определить, является ли вариант патогенным, возможно патогенным или доброкачественным.

Рекомендуется проводить тестирование «троек» (мать, отец и ребёнок с заболеванием) в ходе геномного или экзомного анализа, особенно при подозрении на рецессивное заболевание или вариант, возникший *de novo*.

Возможно игнорирование большинства вариантов для доминантных заболеваний, если такие варианты наблюдаются у здоровых родственников.

Рекомендуется пользоваться информационными ресурсами, специфичными для данной патологии.

Лаборатория имеет право не принять образец без необходимой клинической информации.

Заключение

На сегодня методы анализа вариантов нуклеотидной последовательности с использованием MPS несовершенны, и приводимое в отчетах лабораторий отнесение вариантов к той или иной категории патогенности не подразумевает абсолютной достоверности. При диагностике менделирующих заболеваний результаты MPS следует использовать совместно с данными других объективных методов исследования. Вариант, классифицированный как патогенный с использованием предлагаемой в данном руководстве схемы, может быть использован врачом для принятия медицинских решений как базовое доказательство, вариант, классифицированный как вероятно патогенный, может быть использован при принятии клинического решения в сочетании с другими доказательствами по рассматриваемому заболеванию, а вариант неопределённого значения не должен быть использован в принятии клинических решений. Лаборатории обязаны выдавать список патогенных вариантов, выявленных у пациента, не связанных с направительным диагнозом, но обуславливающих развитие заболеваний, для которых существует лечение.

Список литературы

1. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing, *Genetics in medicine*, V. 15, Number 9, September 2013, p. 733-747
2. College of American Pathologists' Laboratory Standards for Next-Generation Sequencing Clinical Tests, *Arch Pathol Lab Med*. 2015;139:481-493
3. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing, *European Journal of Human Genetics* (2016) 24, 2-5
4. Use of Standards in FDA Regulatory Oversight of Next Generation Sequencing (NGS)-Based In Vitro Diagnostics (IVDs) Used for Diagnosing Germline Diseases, Document issued on July 8, 2016 <https://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/UCM509838.pdf>

Примеры заключений

Пример 1: Выявлен патогенный вариант нуклеотидной последовательности при заболевании с АР типом наследования

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

по результатам секвенирования ДНК (панель «Эпилепсии»)

Пациент:

Фамилия

Имя

Отчество

Пол: М/Ж

Дата рождения: дд.мм.гг

Вид материала: Кровь (венозная)

Дата забора: дд.мм.гг

Диагноз: Симптоматическая эпилепсия.

Патогенные варианты нуклеотидной последовательности, являющиеся вероятной причиной заболевания

Ген	Положение (GRCh37/hg19)	Генотип	Экзон	Положение в кДНК	Замена АК	Частота аллеля*	Референсная последовательность	Глубина прочтения
<i>TPP1</i>	chr11:6638271G>A	A/A	6	с.622C>T	p.Arg208*	0,0173159%	NM_000391.3	176x

* Частоты аллелей приведены по базе Exome Aggregation Consortium (выборка до 60702 человек). н/д = нет данных (не описан)

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

У ФИО был проведен поиск патогенных мутаций, ассоциированных с наследственными эпилепсиями, а также с другими наследственными заболеваниями со сходными фенотипическими проявлениями.

Выявлен ранее описанный вариант нуклеотидной последовательности в 6 экзоне гена *TPP1* (chr11:6638271G>A, rs119455955) в гомозиготном состоянии, приводящий к появлению сайта преждевременной терминации трансляции в кодоне 208 (p.Arg208Ter, NM_000391.3). Вариант описан как мутация, которая в гомозиготной или в компаунд-гетерозиготной форме с другими мутациями приводит к развитию нейронального цероидного липофусциноза, тип 2 (OMIM: 204500), основными симптомами которого являются атаксия, миоклонические приступы, постепенный регресс интеллектуального развития [ссылки на источники: или 2 статьи или база данных, в которой указано сколько раз встретился вариант (обязательно больше 2)]. Частота варианта в контрольной выборке ExAC составляет 0.0173%.

Других значимых изменений, соответствующих критериям поиска, не обнаружено.

Все варианты, указанные в заключении, подтверждены методом прямого секвенирования по Сенгеру.

Оценка клинической значимости (патогенности) выявленных вариантов проводилась на основании российских рекомендаций для интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS).

Клиническое заключение по результатам данного исследования может быть дано только врачом-генетиком.

ОПИСАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

(стандартное, не зависит от типа выявленных вариантов)

Анализ ДНК пациента проведен на секвенаторе нового поколения (название) методом (например: парно-концевое чтение (2x151 п.н.)) со средним покрытием (например: не менее 70-100x). Для пробоподготовки была использована методика (например: селективный захват участков ДНК, относящихся к кодирующим областям (количество генов) генов с известным клиническим значением). Список исследованных генов: (при секвенировании клинического или полного экзона можно ограничиться ссылкой на ресурс, в котором представлены эти данные).

Для названия выявленных вариантов использовалась номенклатура (например: представленная на сайте <http://www.hgvs.org/mutnomen> версия 2.1511)

Обработка данных секвенирования проведена с использованием автоматизированного алгоритма (название используемой программы для биоинформатического анализа и/или ее описание, например: алгоритм включает выравнивание прочтений на референсную последовательность генома человека (GRCh37/hg19), постпроцессинг выравнивания, выявление вариантов и фильтрацию вариантов по качеству, а также аннотацию выявленных вариантов по всем известным транскриптам каждого гена из базы RefSeq с применением ряда методов предсказания патогенности замен (SIFT, PolyPhen2-HDIV, PolyPhen2-HVAR, MutationTaster), а также методов расчета эволюционной консервативности позиций (PhyloP, PhastCons)).

Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использованы выборки проектов «1000 геномов», ESP6500 и Exome Aggregation Consortium. Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов использованы база данных OMIM, специализированные базы данных по отдельным заболеваниям (при наличии) и литературные данные. В заключение включены только варианты, имеющие возможное отношение к клиническим проявлениям у пациента.

Ограничения методики, например, метод не позволяет выявлять инсерции и делеции длиной более 10 п.н., мутации в интронных областях (за исключением канонических сайтов сплайсинга), вариации длины повторов (в том числе экспансии триплетов), а также мутации в генах, у которых в геноме существует близкий по последовательности паралог (псевдоген). Метод не предназначен для определения цис-, транс-положения пар гетерозиготных мутаций, а также для оценки уровня метилирования, выявления хромосомных перестроек, полиплоидии, выявления мутаций в состоянии мозаицизма.

СВЕДЕНИЯ О КАЧЕСТВЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего прочтений	16051259	Всего выявлено вариантов	42310
Длина прочтений	2x151 п.н.	Вариантов после фильтрации по базовым критериям патогенности и оценки по клиническим критериям	1
Прочитано нуклеотидов	4.42 млрд		
Среднее покрытие	147.8x	Количество фрагментов (%) с покрытием менее X10 (для WES/WGS/ "клинический экзом"	8

Данные по покрытию генов Указать, какие участки нуклеотидной последовательности генов не были проанализированы или были проанализированы частично. Список должен включать название гена, № экзона и название референсной последовательности (NM). При секвенировании клинического или полного экзома можно ограничиться информацией о покрытии в графическом виде с указанием (в %) количества фрагментов нуклеотидной последовательности с покрытием менее X10 и информацией о том, как получить сведения о покрытии конкретной области.

ССЫЛКИ НА ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ БАЗЫ ДАННЫХ И ЛИТЕРАТУРУ

1. Ссылка на статью
2. Ссылка на статью
3. <http://www.omim.org/>
4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
5. <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>
6. <http://exac.broadinstitute.org/>

Дата

Подпись врача лабораторного генетика

Пример 2: Выявлен вероятно патогенный вариант нуклеотидной последовательности при заболевании с АД типом наследования

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

по результатам секвенирования ДНК (клиническое секвенирование экзома)

Пациент: Фамилия

Имя

Отчество

Пол: М/Ж

Дата рождения: дд.мм.гг

Вид материала: кровь (венозная)

Дата забора: дд.мм.гг

Диагноз: Криптогенная фокальная эпилепсия. Аутичное поведение. Задержка психоречевого развития.

Данные секвенирования могут быть предоставлены по запросу лечащего врача.

1. Патогенные варианты нуклеотидной последовательности, являющиеся вероятной причиной заболевания

Ген	Положение (GRCh37/hg19)	Генотип	Экзон	Положение в кДНК	Замена АК	Частота аллеля*	Референсная последовательность	Глубина прочтения
Не выявлено								

2. Вероятно патогенные варианты нуклеотидной последовательности, являющиеся возможной причиной заболевания

Ген	Положение (GRCh37/hg19)	Генотип	Экзон	Положение в кДНК	Замена АК	Частота аллеля*	Референсная последовательность	Глубина прочтения
<i>KANSL1</i>	chr17:44248700CAG>C	N/del	2	c.808_809delCT	p.Leu270fs	0,0032955%	NM_015443.3	25x

3. Варианты нуклеотидной последовательности неопределенного значения, имеющие возможное отношение к фенотипу

Ген	Положение (GRCh37/hg19)	Генотип	Экзон	Положение в кДНК	Замена АК	Частота аллеля*	Референсная последовательность	Глубина прочтения
<i>RPGRIP1L</i>	chr16:53686809G>GA	N/ins	15	c.1789_1790insT	p.Thr597fs	н/д	NM_015272.2	220x
<i>CPS1</i>	chr2:211502472T>G	T/G	22	c.2734T>G	p.Phe912Val	0,0016491%	NM_001875.4	199x
<i>LAMB1</i>	chr7:107569594T>C	T/C	31	c.4802A>G	p.Glu1601Gly	н/д	NM_002291.2	149x

* Частоты аллелей приведены по базе Exome Aggregation Consortium (выборка до 60702 человек). н/д = нет данных (не описан)

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

У ФИО был проведен поиск патогенных мутаций, ассоциированных с наследственными формами эпилепсии, эпилептической энцефалопатией, аутизмом, синдромальными и несиндромальными формами умственной отсталости, а также с другими наследственными заболеваниями со сходными фенотипическими проявлениями.

Выявлен ранее не описанный у больных вариант нуклеотидной последовательности в экзоне 2 гена *KANSL1* (chr17:44248700CAG>C, rs551541795) в гетерозиготном состоянии, приводящий к сдвигу рамки считывания, начиная с кодона 270 (p.Leu270fs, NM_015443.3). Мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания, в гене *KANSL1* в гетерозиготном состоянии описаны у пациентов с синдромом Кулена — де Ври (OMIM: 610443). Частота выявленного варианта нуклеотидной последовательности в контрольной выборке ExAC составляет 0,0033% (4 мутантных аллеля на 121376 хромосом; в гомозиготном состоянии не зарегистрирован). Выявленный вариант, нарушает синтез полноразмерного белка, однако, в силу ненулевой частоты встречаемости в контрольной выборке его следует расценивать как вероятно патогенный вариант, который может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных.

Результат требует анализа происхождения выявленного варианта (унаследованный или *de novo*).

Выявлен ранее не описанный вариант нуклеотидной последовательности в экзоне 15 гена *RPGRIP1L* (chr16:53686809G>GA) в гетерозиготном состоянии, приводящий к сдвигу рамки считывания, начиная с кодона 597 (p.Thr597fs, NM_015272.2). Мутации в гене *RPGRIP1L* в гомозиготном и компаунд-гетерозиготном состоянии описаны у пациентов с синдромом Жубер, тип 7 (OMIM: 611560), синдромом Меккеля, тип 5 (OMIM: 611561) и синдромом COACH (OMIM: 216360). Выявленный вариант нуклеотидной последовательности не зарегистрирован в контрольных выборках «1000 геномов», ESP6500 и ExAC. По совокупности сведений, выявленный вариант нуклеотидной последовательности следует расценивать как вариант с неопределенной клинической значимостью, который, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных.

Выявлен ранее не описанный у больных вариант нуклеотидной последовательности в экзоне 22 гена *CPS1* (chr2:211502472T>G, rs753496027) в гетерозиготном состоянии, приводящий к замене аминокислоты в позиции 912 белка (p.Phe912Val, NM_001875.4). Мутации в гене *CPS1* в гомозиготном и компаунд-гетерозиготном состоянии описаны, у пациентов с недостаточностью карбамоилфосфат-синтетазы 1 (OMIM: 237300). Частота выявленного варианта нуклеотидной последовательности в контрольной выборке ExAC составляет 0,0016%. Алгоритмы предсказания патогенности расценивают данный вариант как вероятно патогенный (SIFT, Polyphen2_HDIV, Polyphen2_HVAR, MutationTaster, PROVEAN). По совокупности сведений, выявленный вариант нуклеотидной последовательности следует расценивать как вариант с неопределенной клинической значимостью, который, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных.

Выявлен ранее не описанный вариант нуклеотидной последовательности в экзоне 31 гена *LAMB1* (chr7:107569594T>C) в гетерозиготном состоянии, приводящий к замене аминокислоты в позиции 1601 белка (p.Glu1601Gly, NM_002291.2). Мутации в гене *LAMB1* в гомозиготном состоянии описаны у пациентов с лиссэнцефалией, тип 5 (OMIM: 615191). Выявленный вариант нуклеотидной последовательности не зарегистрирован в контрольных выборках «1000 геномов», ESP6500 и ExAC. Алгоритмы предсказания патогенности расценивают данный вариант как вероятно патогенный (SIFT, Polyphen2_HDIV, Polyphen2_HVAR, MutationTaster, PROVEAN). По совокупности сведений, выявленный вариант нуклеотидной последовательности следует расценивать как вариант с неопределенной клинической значимостью, который, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных.

Других значимых изменений, соответствующих критериям поиска, не обнаружено.

Все варианты, указанные в заключении, подтверждены методом прямого секвенирования по Сенгеру.

Оценка клинической значимости (патогенности) выявленных вариантов проводилась на основании российских рекомендаций для интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS).

Клиническое заключение по результатам данного исследования может быть дано только врачом-генетиком.

Содержание разделов «Описание исследования», «Сведения о качестве исследования» и «Ссылки на использованные базы данных и литературу» см. в предыдущем примере заключения

Дата

Подпись врача лабораторного генетика