

Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2)

Рыжкова О.П.¹, Кардымон О.Л.¹, Прохорчук Е.Б.², Коновалов Ф.А.³, Масленников А.Б.⁴, Степанов В.А.⁵, Афанасьев А.А.⁶, Захлязьминская Е.В.⁷, Ребриков Д.В.⁸, Савостьянов К.В.⁹, Глотов А.С.^{10,11}, Костарева А.А.¹², Павлов А.Е.¹³, Голубенко М.В.⁵, Поляков А.В.¹, Куцев С.И.¹

- 1 — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115522, Москва, ул. Москворечье д.1;
- 2 — Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 19071, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2;
- 3 — Лаборатория клинической биоинформатики, 123181, г. Москва, ул. Катукова, д. 21, к. 1;
- 4 — ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница №1», 630047, Новосибирск, ул. Залесского, 6;
- 5 — ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», 634009, г. Томск, пер. Кооперативный 5;
- 6 — ООО «Розалинд», 119333, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова 3-24;
- 7 — ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», 119991, Москва, ГСП-1, Абрикосовский пер., д.2;
- 8 — Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1;
- 9 — Национальный медицинский исследовательский Центр Здоровья Детей, 119296 г. Москва, Ломоносовский проспект, 2, стр.1;
- 10 — Институт трансляционной биомедицины Санкт-Петербургского Государственного Университета, 199034 г. Санкт-Петербург, Университетская наб. 7-9;
- 11 — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д.3;
- 12 — ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197341, г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2.
- 13 — ООО «Парсек Лаб», 197350, г. Санкт-Петербург, ул. дорога в Каменку, 74А

Представлена вторая версия руководства по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования. Первая версия руководства была опубликована в журнале «Медицинская генетика» в 2017 г. Она основана на рекомендациях и руководствах по интерпретации результатов массового параллельного секвенирования (MPS), разработанных в Европе и США ACMG, CAP, ESHG и FDA. Обсуждение документа было проведено на профильных научных мероприятиях в течение 2017-2018 гг. Поступившие замечания и поправки к документу отражены в его текущей версии.

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

Для цитирования: Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А., Афанасьев А.А., Захлязьминская Е.В., Ребриков Д.В., Савостьянов К.В., Глотов А.С., Костарева А.А., Павлов А.Е., Голубенко М.В., Поляков А.В., Куцев С.И. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). *Медицинская генетика* 2019; 18(2): 3-23
DOI: 10.25557/2073-7998.2019.02.3-23

Автор для корреспонденции: Рыжкова Оксана Петровна, e-mail: ryzhkova@dnalab.ru

Финансирование. Отсутствует.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 17.09.2018

Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (update 2018, v2).

Ryzhkova O.P.¹, Kardymon O.L.¹, Prohorchuk E.B.², Konovalov F.A.³,
 Maslennikov A.B.⁴, Stepanov V.A.⁵, Afanasyev A.A.⁶, Zaklyazminskaya E.V.⁷,
 Rebrikov D.V.⁸, Savostianov K.V.⁹, Glotov A.S.^{10,11}, Kostareva A.A.¹², Pavlov A.E.¹³,
 Golubenko M.V.⁵, Polyakov A.V.¹, Kutsev S.I.¹

- 1 — Research Centre for Medical Genetics,
115522, Moscow, Moskvorechie street, 1;
- 2 — Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences,
119071, Moscow, Leninsky Prospect, 33, Building 2,
- 3 — Independent Clinical Bioinformatics Laboratory,
123181, Moscow, st. Katukova, d. 21, v. 1;
- 4 — State Budgetary Health Institution of the Novosibirsk Region «City Clinical Hospital №1»,
630047, Novosibirsk, Zalessky street, 6;
- 5 — Tomsk National Research Medical Center the Russian Academy of Sciences,
634009, Tomsk, lane Cooperative 5;
- 6 — «Rosalind» LLC,
119333, Moscow, Dmitry Ulyanov str, 3-24;
- 7 — Petrovsky Russian Research Centre of Surgery,
119991, Moscow, GSP-1, Abrikosovsky lane, 2;
- 8 — Pirogov Russian National Research Medical University,
117997, Moscow, Ostrovityanova str, 1;
- 9 — National Medical Research Center for Children’s Health,
119296 Moscow, Lomonosov Avenue, 2,
- 10 — Institute of Translational Biomedicine of St Petersburg University,
199034 St. Petersburg, University Emb. 7-9;
- 11 — The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O.Ott,
199034, St. Petersburg, Mendeleevskaya line, 3;
- 12 — Federal North-West Medical Research Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation,
197341, St. Petersburg, Akkuratova str, 2;
- 13 — Parseq Lab LLC»,
197350 St. Petersburg, road to Kamenka str 74A

This is a second version of guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing (MPS) variants. First version was published in Medical Genetics journal in 2017. They were based on ACMG, CAP, ESHG and FDA guidelines and recommendations. Leading authorities on medical genetics and bioinformatics updated and finalized them. First version of guidelines was presented and discussed on all Russian conference «NGS in medical genetics» and all Russian conference «New technologies for diagnosing hereditary diseases». All members of these conferences and members of Russian Society of Medical Genetics could introduce amendments and give comments. Current version include reviewed notes and comments.

Key words: Masive parallel sequencing (MPS), Guidelines, bioinformatics analysis, DNA variants classification criteria

For citation: Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prohorchuk E.B., Konovalov F.A., Maslennikov A.B., Stepanov V.A., Afanasyev A.A., Zaklyazminskaya E.V., Rebrikov D.V., Savostianov K.V., Glotov A.S., Kostareva A.A., Pavlov A.E., Golubenko M.V., Polyakov A.V., Kutsev S.I. Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (update 2018, v2). *Medical genetics* 2019; 18(2): 3-24 [In Rus]

DOI: 10.25557/2073-7998.2019.02.3-24

Corresponding author. Ryzhkova Oxana e-mail ryzhkova@dnalab.ru

Funding. The research had no funding

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 17.09.2018

Введение

Основой для настоящего руководства послужили протоколы по интерпретации результатов массового параллельного секвенирования (MPS), разновидностью которого являются методы секвенирования нового поколения (NGS), разработанные

в США и Европе [1–8]. Эти протоколы были переработаны группой ведущих российских специалистов в области генетики и биоинформатики. Первая редакция руководства была опубликована в 2017 г. в журнале «Медицинская генетика» [9]. Его обсуждение

прошло на 2-ой Всероссийской научно-практической конференции «Новые технологии диагностики наследственных болезней» (г. Москва, 2017) и на Всероссийских научно-практических конференциях «NGS в медицинской генетике» (г. Суздаль, 2017 и 2018). Поступившие в ходе обсуждения замечания и поправки к документу отражены в представленной версии руководства.

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 до сотен миллионов и миллиардов нуклеотидных последовательностей за один рабочий цикл. Отличительной особенностью методов MPS является многократное прочтение анализируемой нуклеотидной последовательности.

Терминология

Вместо широко распространенных терминов «мутация» и «полиморфизм» рекомендуется использовать термин «вариант нуклеотидной последовательности» со следующими пятью характеристиками:

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

Номенклатура вариантов нуклеотидной последовательности

Рекомендуется использовать единую принятую 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>.

Для картирования последовательности отсеквенированных участков при биоинформатической обработ-

ке следует использовать референсную последовательность генома, расположенную на ресурсах:

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

или

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

Необходимо учитывать, что в референсной последовательности встречаются ошибки, связанные с так называемыми референсными минорными вариантами (позициями референсного генома, в которые инкорпорирован редкий или даже патогенный вариант). Такие ошибки требуют коррекции при проведении биоинформатического анализа.

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

Референсный транскрипт, используемый для аннотации выявленного варианта, должен представлять собой или наиболее клинически значимый и/или наиболее длинный из известных транскриптов. Референсные транскрипты, рекомендуемые мировым научным сообществом, и их описания приведены в базах данных:

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

- the Consensus CDS Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcidsBrowse.cgi>)

- the Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>)

- ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>)

или

- локус-специфичные базы данных.

Однако лаборатории должны проверять клиническую значимость варианта во всех возможных транскриптах.

Из правил номенклатуры HGVS возможны три исключения:

1. Символ «X» приемлемо использовать в отчетах по нонсенс вариантам в дополнение к рекомендованной номенклатурой HGVS символам «*» и «Ter».

2. Возможна нумерация экзонов в соответствии с выбранным референсным транскриптом, используемым для обозначения варианта нуклеотидной последовательности.

3. При клинической интерпретации результатов MPS допускается использование термина «патогенный» вместо выражения «влияет на функцию».

Рекомендуемые базы данных для анализа патогенности вариантов нуклеотидной последовательности

База данных, Web сайт	Описание
<i>Популяционные базы данных</i>	
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, исключены из выборки.
genome Aggregation Database http://gnomad.broadinstitute.org/	Расширенная база данных геномных вариантов, основанная на базе Exome Aggregation Consortium, включающая данные 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 при геномном и таргетном секвенировании 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
<i>Базы данных, включающие описания фенотипов</i>	
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, из-за чего необходимо уточнять клиническую значимость варианта по литературным источникам.
ClinVar http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/	База данных утверждений о клинической значимости и фенотипических проявлениях вариантов нуклеотидной последовательности. Содержит данные низкого качества, в связи с чем не рекомендуется её использование при формировании заключений о патогенности выявленного варианта . Использование этой базы данных может быть ограничено только поиском ссылок на литературные источники.
<i>Специфичные базы данных (локус/ болезнь/ этно/ другие)</i>	
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 по вариантам и аннотациям нуклеотидных замен. Большое количество баз данных представлена в системе Leiden Open Variation Database system.
DECIPHER https://decipher.sanger.ac.uk/	Молекулярно-цитогенетическая база данных для врачей и исследователей, связывающая геномные данные, полученные с использованием микрочипов, с фенотипом, используя геномный браузер Ensembl.
<i>Референсная последовательность</i>	
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

Базы данных и литературные источники

Все обнаруженные варианты нуклеотидной последовательности необходимо классифицировать по патогенности. Оценка патогенности выявленных вариантов включает изучение баз данных и медицинской и научной литературы. Для поиска описанных ранее вариантов рекомендуется использовать базы данных, приведенные в **табл. 1**.

Рекомендации по использованию баз данных

При использовании баз данных необходимо проверить следующее:

1. Частоту обновлений и 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 старые номенклатура и классификация вариантов нуклеотидной последовательности, должны использоваться с осторожностью. Так же настороженно следует относиться к данным, встретившимся лишь в одном литературном источнике.

Следует учитывать, что информация об одних и тех же индивидуумах, а также их родственниках может встречаться в нескольких различных литературных источниках в зависимости от контекста исследования и размера выборки. Это может быть связано как с пересечением авторства и межлабораторным сотрудничеством, так и с тем, что данные по пробанду и членам семьи имеются в различных клинических базах. В результате возможно ошибочное дублирование интересующих случаев и ложное увеличение частоты варианта. Пересечение по авторству или учреждениям является первым признаком потенциального пересечения наборов данных.

Следует отметить, что не во всех литературных источниках может быть описание патогенного варианта нуклеотидной последовательности и фенотипа паци-

ента. Патогенность варианта может трактоваться авторами публикации некорректно из-за неправильного описания фенотипа.

Компьютерные (in silico) предсказательные программы

Если вариант нуклеотидной последовательности не был описан ранее и не представлен ни в одной из баз данных или сведения о нем недостаточны, для решения о его значимости, можно использовать результаты использования программ предсказаний патогенности. В **табл. 2** представлены адреса сайтов и краткое описание наиболее часто используемых в настоящее время программ предсказания.

Критерии для интерпретации вариантов нуклеотидной последовательности

Варианты, описанные ранее в нескольких источниках (кроме ClinVar) как патогенные, являющиеся причиной развития интересующего фенотипа и подходящие под тип наследования, классифицируются как патогенные. Если в нескольких источниках описания патогенности варианта противоречат друг другу (вероятно-патогенный и доброкачественный), для классификации его патогенности следует использовать как приведенные в статьях аргументы, так и критерии, представленные ниже.

Для интерпретации остальных вариантов предлагается использовать два набора критериев: первый для классификации вероятно патогенных вариантов, второй для классификации вероятно доброкачественных вариантов. Критерий патогенности может быть очень сильный (PVS1), сильный (PS1-4), средний (PM1-5) или вспомогательный (PP1-5). Критерий доброкачественности может быть очень сильный (независимый) (BA1), сильный (BS1-4) или вспомогательный (BP1-7). Соответствие анализируемого варианта нумерации признаков, характеризующих критерий, не дает основания 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 выбираются подходящие признаки, которые затем объединяются в соответствии с приведенными ниже правилами (**табл. 3**), что позволяет классифицировать вариант, как патогенный, вероятно патогенный, неопределенного значения, вероятно доброкачественный или доброкачественный. Если вариант не соответствует критериям патогенности или

ОРГАНИЗАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

доброкачественности, или доказательства доброкачественности и патогенности противоречивы, то он оценивается как вариант неопределенного значения.

Характеристики критериев отнесения вариантов нуклеотидной последовательности к патогенным или доброкачественным

Патогенный (P) вариант

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

PVS1. Этому критерию соответствуют LOF-варианты – варианты нуклеотидной последовательно-

сти, приводящие к прекращению синтеза белка (нон-сенс-мутации, мутации со сдвигом рамки считывания, изменения канонических нуклеотидов сайта сплайсинга (± 1 или ± 2), варианты, приводящие к изменениям в иницирующем кодоне, делеции/дупликации одного или нескольких экзонов), при условии, что вариант нуклеотидной последовательности данного типа 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*);

Таблица 2.

Наиболее часто используемые компьютерные программы предсказания патогенности вариантов нуклеотидной последовательности

Название программы, Web-сайт	Основа предсказания патогенности
ConSurf, http://consurf.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/	
PROVEAN, http://provean.jcvi.org/index.php	Выравнивание и анализ сходства между последовательностью варианта и последовательностью гомологичных белков
SIFT, http://sift.jcvi.org	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/	Положение варианта
MaxEntScan, http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscanscoreseq.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

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

- требует осторожности интерпретации сплайс-вариантов, которые прогнозируемо приводят к пропуску экзонов, но оставляют оставшуюся часть белка интактной и не меняют рамку считывания.

- необходима осторожность при наличии нескольких транскриптов одного гена, так как один и тот же вариант может по-разному классифицироваться в зависимости от его положения в конкретном транскрипте.

Критерий «сильный» (*strong, PS 1-4*)

PS1. Этому критерию соответствует вариант нуклеотидной последовательности, приводящий к замене на ту же аминокислоту в том же положении, что и вариант, ранее описанный как патогенный при этом заболевании. Например, если описана замена G>C, приводящая к замене Val>Leu, то замена G>T, приводящая к той же аминокислотной замене, соответствует критерию PS1. Следует принять во внимание, что варианты, патогенность которых обусловлена изменением сайта сплайсинга, а не сайта, кодирующего аминокислоту, относятся к критерию PVS1

PS2. К этому критерию относят *de novo* вариант, выявленный у пациента при его отсутствии у обоих родителей. При отнесении 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. Этому критерию соответствуют варианты, патогенность которых подтверждена функциональными исследованиями гена или продукта гена *in vitro* или *in vivo*. Функциональные исследования должны быть валидируемыми, воспроизводимыми и проведенными лабораториями, имеющими хорошую репутацию.

PS4. Распространенность варианта, относящегося к данному критерию, у больных 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 связанных родством пациентов с одинаковым фенотипом при отсутствии его в контрольной группе следует отнести к критерию средний (PM, moderate).

Критерий «средний» (*moderate, PM 1-6*)

PM1. Вариант, относящийся к этому критерию, расположен в «горячей» точке и/или важных и хорошо исследованных функциональных доменах белка

(например, в активном сайте фермента), в которых не описаны доброкачественные изменения.

PM2. К этому критерию относят вариант, отсутствующий в контрольной выборке или встречающийся в ней 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 — 0,01%, для рецессивных X-сцепленных — 0,3%. При отнесении варианта к этому критерию следует учитывать, что в базах данных вариантов нуклеотидной последовательности, выявленных методами MPS, может содержаться неполная информация о частоте в популяциях делеций/инсерций. Кроме того, необходимо учитывать неполную пенетрантность, возраст начала и наличие фенкопий заболевания.

PM3. Этому критерию соответствует вариант, находящийся в транс-положении с описанным патогенным вариантом при рецессивных заболеваниях. Для подтверждения транс-положения вариантов требуется обследование родителей (или потомков) пациента.

PM4. К этому критерию следует отнести варианты, приводящие к синтезу белка измененной длины (инсерции/делеции в рамках считывания в неповторяющихся регионах; потеря стоп-кодона (замена на аминокислоту)).

PM5. Этому критерию соответствуют новые миссенс-варианты, приводящие к замене аминокислоты в том же положении, в котором ранее были описаны другие миссенс-варианты, расцененные как патогенные. Следует с осторожностью относиться к интерпретации изменений нуклеотидной последовательности, которые влияют не только на белковый/аминокислотный уровень, но и на сплайсинг. Варианты, изменяющие каноническую последовательность сайтов сплайсинга, соответствуют критерию PVS1

PM6. Вариант *de novo* в случаях, когда отцовство и материнство молекулярными методами не установлено, относят к этому критерию.

Критерий «вспомогательный» (*supporting, PP 1-5*)

PP1. Этому критерию соответствует вариант в гене, связь которого с болезнью точно установлена, ко-сегрегирующий с патологическим фенотипом у нескольких пораженных членов семьи. По мере накопления данных о сегрегации, например при обследовании большой семьи, в которой наследуется данное заболевание, может быть отнесен к критерию PS. При отнесении варианта к данному критерию важно рассмотреть число мейозов, а не количество информативных индивидов.

PP2. К этому критерию относят миссенс-вариант в гене, в котором обычно такие изменения вызывают заболевания, а доброкачественные миссенс-изменения наблюдаются редко. При этом следует принять во внимание, что значение $Z\text{-score} \geq 3$ (база данных ExAC) является доказательным, но соответствует всему гену, а не региону, в котором находится вариант ($Z\text{-score}$ — отношение числа выявленных миссенс-вариантов к ожидаемому их количеству в гене [10]).

PP3. К этому критерию относят вариант, если не менее трех программ предсказания *in silico* подтверждают его патогенность. Однако в связи с тем, что многие программы предсказаний используют одни и те же или очень схожие алгоритмы, результаты использования нескольких программ не могут считаться независимыми критериями и должны оцениваться в сочетании. Таким образом, критерий PP3 может быть использован для оценки варианта только один раз.

PP4. Этот критерий используют, если фенотип пациента высоко специфичен для заболевания с данной генетической этиологией. Он может быть применен в случаях, когда пациент имеет редкую комбинацию клинических признаков, для которой существует очень ограниченное количество известных генетических причин, и все эти гены были протестированы.

PP5. Этот критерий используется, если источники с хорошей репутацией указывают на патогенность варианта, но независимая оценка не проводилась. Связавшись с лабораторией, проводившей функциональное исследование варианта и объединив данные, можно реклассифицировать выявленный вариант.

Доброкачественный (В) вариант

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

BA1. Вариант относят к этому критерию, если частота аллеля $>3\%$ в базах данных Exome Variant Server(ESP), 1KG или в ExAC (gnomAD).

Критерий «сильный» (strong, BS 1-4)

BS1. Этот критерий используется, если частота аллеля больше, чем ожидаемая для заболевания с определенным типом наследования, а именно при аутосомно-доминантном заболевании частота аллеля превышает $0,01\%$, при аутосомно-рецессивном — $0,5\%$, при доминантном Х-сцепленном — $0,03\%$, при рецессивном Х-сцепленном — $0,5\%$. При отнесении варианта к этому критерию необходимо учитывать неполную пенетрантность, возраст начала заболевания и наличие фенкопий, информацию о которых можно получить из литературных источников.

BS2. Вариант нуклеотидной последовательности в гене, изменения которого приводят к заболеванию с полной пенетрантностью и манифестацией в детстве, соответствует этому критерию, если он найден у здорового взрослого человека:

- в гомозиготном состоянии при заболеваниях с рецессивным типом наследования;
- в гетерозиготном состоянии при заболеваниях с доминантным типом наследования;
- в гемизиготном состоянии при заболеваниях с Х-сцепленным типом наследования.

BS3. Этому критерию соответствуют варианты нуклеотидной последовательности, если функциональные исследования (*in vitro* или *in vivo*) подтверждают отсутствие патогенного эффекта на ген или генный продукт. Функциональные исследования должны быть валидированными, воспроизводимыми и проведенными лабораториями, имеющими хорошую репутацию.

BS4. К этому критерию относят вариант нуклеотидной последовательности, для которого точно установлено отсутствие косегрегации с болезнью у пораженных членов семьи. При этом следует принять во внимание, что наличие фенкопий 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 1-6)

BP1. Этому критерию соответствует 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 ранее не описанный вариант находится с ним в транс-положении при доминантном заболевании или в цис-положении при любом типе наследования, то его следует отнести к этому критерию.

BP3. К этому критерию относятся делеции/инсерции с сохранением рамки считывания, если не проводилось функциональное исследование.

BP4. К этому критерию следует отнести вариант нуклеотидной последовательности, если результаты не менее трех программ предсказания патогенности *in silico* подтверждают отсутствие его воздействия на ген или генный продукт. Поскольку многие программы предсказания имеют одни и те же или очень схожие алгоритмы, результаты использования нескольких про-

грамм не могут считаться независимыми критериями и должны оцениваться в сочетании. Поэтому критерий ВР3 используется для оценки варианта один раз, представляя собой комбинацию результатов всех программ предсказания патогенности.

ВР5. Если вариант обнаружен в случае с альтернативной молекулярной причиной заболевания, он относится к этому критерию.

ВР6. Этот критерий применяется, если источники с хорошей репутацией сообщили об отсутствии патогенности варианта, но независимая оценка не проводилась.

ВР7. Этому критерию отвечает синонимичный (silent) вариант, если алгоритмы предсказания сплайсинга показывают отсутствие его влияния на консенсусную последовательность сплайс-сайтов (не создается новый сайт сплайсинга), и нуклеотид не является высококонсервативным в эволюции.

Правила комбинирования критериев для классификации вариантов нуклеотидной последовательности

Правила комбинирования критериев при классификации вариантов нуклеотидной последовательности приведены в табл. 3. В заключение лаборатории о проведенном исследовании следует включать только

варианты, относящиеся к группам: патогенный, вероятно патогенный, неопределенного значения. Доброкачественные и вероятно доброкачественные варианты в заключении отражать не следует.

В зависимости от содержания информированного согласия на проведение исследования, подписанного пациентом, заключение лаборатории может содержать различную информацию. Если пациент выразил согласие на получение информации только о вариантах нуклеотидной последовательности, связанных с фенотипом по поводу которого он обследуется, то при обнаружении **патогенных вариантов**, соответствующих этому фенотипу, и отсутствии противоречий с типом наследования (1 вариант при аутосомно-доминантном заболевании или Х-сцепленном рецессивном заболевании у лиц мужского пола, 2 и более варианта при аутосомно-рецессивном заболевании или Х-сцепленном рецессивном заболевании у лиц женского пола), в заключении следует приводить только их. При обнаружении одного **патогенного** и одного и более **вероятно патогенного** вариантов нуклеотидной последовательности в одном гене, соответствующих фенотипу пациента, при заболевании с аутосомно-рецессивным и Х-сцепленным рецессивным типом наследования в заключении нужно их приводить с указанием на необходимость дополнительного исследования цис-, транс-положения. Другие

Таблица 3.

Комбинация критериев патогенности/доброкачественности при классификации вариантов нуклеотидной последовательности

Оценка патогенности	Комбинации критериев
Патогенный вариант	<ol style="list-style-type: none"> 1. Один очень сильный (PVS1) в сочетании с одним и более сильным (PS1–PS4) или двумя и более средними (PM1–PM6) или одним средним (PM1–PM6) и одним вспомогательным (PP1–PP5) или двумя и более вспомогательными (PP1–PP5) 2. Два и более сильных (PS1–PS4) 3. Один сильный (PS1–PS4) в сочетании с тремя и более средними (PM1–PM6) или двумя средними (PM1–PM6) и двумя и более вспомогательными (PP1–PP5) или одним средним (PM1–PM6) и 4 и более вспомогательными (PP1–PP5)
Вероятно патогенный вариант	<ol style="list-style-type: none"> 1. Один очень сильный (PVS1) и один средний (PM1–PM6) 2. Один сильный (PS1–PS4) и 1-2 средних (PM1–PM6) 3. Один сильный (PS1–PS4) и два и более вспомогательных (PP1–PP5) 4. Три и более средних (PM1–PM6) 5. Два средних (PM1–PM6) и два и более вспомогательных (PP1–PP5) 6. Один средний (PM1–PM6) и четыре и более вспомогательных (PP1–PP5)
Вариант неопределенного значения	<ol style="list-style-type: none"> 1. Вариант не соответствует ни одному критерию 2. Критерии доброкачественности и патогенности противоречат друг другу
Вероятно доброкачественный вариант	<ol style="list-style-type: none"> 1. Один сильный (BS1–BS4) и один вспомогательный (BP1–BP7) 2. Два и более вспомогательных (BP1–BP7)
Доброкачественный вариант	<ol style="list-style-type: none"> 1. Один очень сильный (BA1) 2. Два и более сильных (BS1–BS4)

**Поддающиеся лечению моногенные заболевания и гены,
варианты нуклеотидной последовательности которых являются их причиной**

Фенотип	OMIM	Тип наследования	Ген	Тип варианта
Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка, тип 5	604400	АД	<i>TMEM43</i>	П, ВП
Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка, тип 8	607450	АД	<i>DSP</i>	П
Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка, тип 9	609040	АД	<i>PKP2</i>	П, ВП
Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка, тип 10	610193	АД	<i>DSG2</i>	П, ВП
Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка, тип 11	610476	АД	<i>DSC2</i>	П, ВП
		АР		П, ВП
Рак молочной железы/яичников семейный 1	604370	АД	<i>BRCA1</i>	П, ВП
		Многофакторное		
Рак молочной железы/яичников семейный 2	612555	АД	<i>BRCA2</i>	П, ВП
		Многофакторное		
Бругада синдром 1	601144	АД	<i>SCN5A</i>	П, ВП
Катехоламинергическая полиморфная желудочковая тахикардия	604772	АД	<i>RYR2</i>	П
Дилатационная кардиомиопатия 1А	115200	АД	<i>LMNA</i>	П
		Встречаются АР формы		П, ВП
Дилатационная кардиомиопатия 1А	115200	АД	<i>MYBPC3</i>	П, ВП
		Встречаются АР формы		П, ВП
Элерса-Данло синдром, тип 4	130050	АД	<i>COL3A1</i>	П, ВП
Фабри болезнь	301500	Х-сцепленное	<i>GLA</i>	П, ВП
Семейный аденоматозный полипоз 1	175100	АД	<i>APC</i>	П, ВП
Семейный аденоматозный полипоз 2	608456	АР	<i>MUTYH</i>	П, ВП
Семейная гиперхолестеринемия	143890	АД	<i>APOB</i>	П
			<i>LDLR</i>	П, ВП
Семейная гипертрофическая кардиомиопатия 1	192600	АД	<i>MYH7</i>	П
Семейная гипертрофическая кардиомиопатия 3	115196	АД	<i>TPM1</i>	П, ВП
Семейная гипертрофическая кардиомиопатия 4	115197	АД	<i>MYBPC3</i>	П, ВП
Семейная гипертрофическая кардиомиопатия 6	600858	АД	<i>PRKAG2</i>	П, ВП
Семейная гипертрофическая кардиомиопатия 7	613690	АД	<i>TNNI3</i>	П
Семейная гипертрофическая кардиомиопатия 8	608751	АД	<i>MYL3</i>	П, ВП
		АР		П, ВП
Семейная гипертрофическая кардиомиопатия 10	608758	АД	<i>MYL2</i>	П, ВП
Семейная гипертрофическая кардиомиопатия 11	612098	АД	<i>ACTC1</i>	П, ВП
Семейный медуллярный рак щитовидной железы	155240	АД	<i>RET</i>	П
Гиперхолестеринемия аутосомно-доминантная, 3	603776	АД	<i>PCSK9</i>	П, ВП
Ювенильный полипоз	174900	АД	<i>BMPRIA</i>	П, ВП
Ювенильный полипоз	174900	АД	<i>SMAD4</i>	П, ВП
Некомпактный миокард левого желудочка, 6	601494	АД	<i>TNNT2</i>	П, ВП
Ли-Фраумени синдром 1	151623	АД	<i>TP53</i>	П, ВП
Лойса-Дитца синдром, тип 1А	609192	АД	<i>TGFBR1</i>	П, ВП
Лойса-Дитца синдром, тип 1В	610168	АД	<i>TGFBR2</i>	П, ВП
Лойса-Дитца синдром, тип 3	613795	АД	<i>SMAD3</i>	П, ВП
Синдром удлиненного интервала QT 1	192500	АД	<i>KCNQ1</i>	П, ВП
Синдром удлиненного интервала QT 2	613688	АД	<i>KCNH2</i>	П, В-П

Продолжение табл. 4 см. на стр. 13

Фенотип	OMIM	Тип наследования	Ген	Тип варианта
Синдром удлинённого интервала QT 3	603830	АД	<i>SCN5A</i>	П, ВП
Линча синдром	120435	АД	<i>MLH1</i>	П, ВП
			<i>MSH2</i>	П, ВП
			<i>MSH6</i>	П, ВП
			<i>PMS2</i>	П, ВП
Злокачественная гипертермия	145600	АД	<i>RYR1</i>	П
			<i>CACNA1S</i>	П, ВП
Марфана синдром	131100	АД	<i>FBN1</i>	П, ВП
Множественная эндокринная неоплазия, тип 1	154700	АД	<i>MEN1</i>	П, ВП
Множественная эндокринная неоплазия, тип 2a/b	171400	АД	<i>RET</i>	П
	162300			П
Нейрофиброматоз, тип 2	101000	АД	<i>NF2</i>	П, ВП
	162300			П, ВП
Орнитинтранскарбамилазы недостаточность	311250	Х-сцепленное	<i>OTC</i>	П, ВП
Парагангиома, 1	168000	АД	<i>SDHD</i>	П, ВП
Парагангиома, 2	601650	АД	<i>SDHAF2</i>	П
Парагангиома, 3	605373	АД	<i>SDHC</i>	П, ВП
Парагангиома, 4	115310	АД	<i>SDHB</i>	П, ВП
Пейтца-Егерса синдром	175200	АД	<i>STK11</i>	П, ВП
PTEN-ассоциированные синдромы гамартомных опухолей	153480	АД	<i>PTEN</i>	П, ВП
Ретинобластома	180200	АД	<i>RB1</i>	П, ВП
Аневризма грудной аорты, 4	132900	АД	<i>MYH11</i>	П, ВП
Аневризма грудной аорты, 6	611788	АД	<i>ACTA2</i>	П, ВП
Туберозный склероз, 1	191100	АД	<i>TSC1</i>	П, ВП
Туберозный склероз, 2	613254	АД	<i>TSC2</i>	П, ВП
Гиппель-Линдау синдром	193300	АД	<i>VHL</i>	П, ВП
Опухоль Вильмса	194070	АД	<i>WT1</i>	П, ВП
Болезнь Вильсона-Коновалова	277900	АР	<i>ATP7B</i>	П, ВП
Фенилкетонурия	261600	АР	<i>PAH</i>	П, ВП
Муковисцидоз	219700	АР	<i>CFTR</i>	П, ВП
Галактоземия	230400	АР	<i>GALT</i>	П, ВП
Глухота аутомомно-рецессивная, 1А	220290	АР	<i>GJB2</i>	П, ВП
Глухота аутомомно-доминантная, 3А	601544	АД	<i>GJB2</i>	П
Гиперфенилаланинемия с дефицитом ВН4-дефицитная, тип D	264070	АР	<i>PCBD1</i>	П, ВП
Гиперфенилаланинемия без дефицита ВН4	617384	АР	<i>DNAJC12</i>	П, ВП
Гиперфенилаланинемия с дефицитом ВН4, тип А	216640	АР	<i>PTS</i>	П, ВП
Гиперфенилаланинемия, с дефицитом ВН4, тип С	261630	АР	<i>QDPR</i>	П, ВП
Гиперфенилаланинемия, с дефицитом ВН4, тип В	233910	АР	<i>GCH1</i>	П, ВП
Дофа-зависимая дистония, обусловленная дефицитом сеипатерин-редуктазы	612716	АД?, АР	<i>SPR</i>	П (для АД); П, ВП (для АР)
Дофа-зависимая дистония с или без гиперфенилаланинемии	128230	АД, АР	<i>GCH1</i>	П (для АД); П, ВП (для АР)

Примечание. АД – аутомомно-доминантный тип наследования, АР – аутомомно-рецессивный тип наследования, П – патогенный вариант, ВП – вероятно-патогенный вариант.

выявленные варианты нуклеотидной последовательности в этих случаях в заключении отражать не следует.

В остальных случаях требуется приводить все выявленные варианты нуклеотидной последовательности, относящиеся к группам патогенный, вероятно патогенный и вариант неопределенного значения.

Если пациент указал, что хочет получить информацию и о вариантах, связанных с фенотипом, по поводу которого он проходит обследование, и о «вторичных» находках, то дополнительно к вышеуказанному в заключении рекомендуется приводить патогенные и вероятно-патогенные варианты в генах, указанных в **табл. 4**. Можно также включать информацию о патогенных вариантах, выявленных у пациента в генах, не связанных с направительным диагнозом, но обуславливающих развитие заболеваний, для которых существует эффективное лечение, по усмотрению лаборатории. При описании выявленных «вторичных» находок с доминантным типом наследования в заключении указывается патогенный/вероятно-патогенный вариант, при рецессивном типе наследования – патогенный/вероятно-патогенный вариант в гомо-/гемизиготном состоянии или два варианта в компаунд-гетерозиготном состоянии (количество отраженных в заключении вариантов должно согласовываться с типом наследования).

Общие требования к оформлению отчёта и заключения о результатах исследования

Несмотря на сложность информации отчёт должен быть краткими и ёмким.

Разделы отчёта должны включать информацию о пациенте, информацию о выявленных патогенных, вероятно патогенных вариантах и вариантах неопределенного значения (см. выше), интерпретацию, методологию, качество данных, ссылки на литературные источники и базы данных. Примеры заключений о результатах исследования приведены в приложении к руководству.

Информация о пациенте должна включать фамилию, имя, отчество (в трех строках друг под другом), дату рождения, пол, клинический диагноз, указания на родственные отношения, если есть данные о других членах семьи.

Информация о выявленных вариантах нуклеотидной последовательности должна включать:

- список патогенных, вероятно патогенных вариантов и вариантов неопределенного значения, выявленных при анализе, по номенклатуре HGVS;
- название гена;

- положение (позицию) замены в геноме по GRCh/hg;
- зиготность;
- номер экзона;
- номенклатуру на уровне нуклеотида и ДНК;
- номенклатуру на уровне белка (в случаях, когда используется историческая (альтернативная) номенклатура, рекомендуется указывать оба варианта);
- номер используемой референсной последовательности (NM);

• данные о покрытии:

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 $\times 30$;
 2. при исследовании WES/WGS/«клинического» экзона необходимо указывать долю (в %) «целевых» областей с покрытием менее $\times 10$;
 3. при исследовании панелей генов необходимо указывать все регионы с покрытием менее $\times 10$;
 4. при обнаружении только одного варианта в гетерозиготном состоянии при заболевании с рецессивным типом наследования необходимо указывать все области гена с покрытием менее $\times 10$ при любом типе исследования.
- название заболевания;
 - тип наследования;
 - частоты варианта в базах данных (с указанием использованной версии базы данных);

• результаты программ предсказания патогенности *in silico* с указанием Score и использованной версии программы. Должны быть указаны результаты анализа патогенности варианта с использованием всех программ, которые применяет лаборатория для интерпретации его клинической значимости, а не только те результаты, где он оказался клинически значимым.

Все варианты нуклеотидной последовательности, указанные в заключении, должны быть подтверждены секвенированием по Сэнгеру или другой валидированной технологией.

Дополнительно в этом разделе заключения можно отразить:

- семейное происхождение варианта нуклеотидной последовательности, если об этом известно;
- если целью исследования является поиск конкретных вариантов, список искомых вариантов.

В разделе, посвященном **интерпретации результатов**, должна приводиться доказательная база, на основании которой классифицированы варианты в отчёте.

В нем стоит указывать:

- предсказанный эффект на синтезируемый белок (программами оценки патогенности вариантов);

- описан ли данный вариант ранее в литературе, в базе данных заболевания 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 и в конце отчёта;

- рекомендации врачу по дополнительному лабораторному и/или функциональному тестированию;

- данные о неполной пенетрантности, фенотипическом разнообразии и генетической гетерогенности;

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

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

Особенности отчёта 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 обследуемого пациента. 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 (нарушающих синтез белка) на геном.

Предлагается варианты, найденные в генах неопределённого значения, пометить в отчёте как «варианты в генах неопределённого значения» и **всегда** относить в группу вариантов неопределённого значения. Новые клинические случаи с редкими фенотипами и выявленными патогенными вариантами смогут позволить в дальнейшем классифицировать эти варианты по представленным руководствам.

Раздел **методология** отчета должен включать следующую информацию:

- тип образца (кровь, слюна, биоптат и др.);
- методы 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 (HGNC). 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 приводиться клинические рекомендации по ведению пациента.

Повторный анализ и подтверждение результатов MPS

При отсутствии патогенных и вероятно-патогенных вариантов, являющихся причиной заболевания, может потребоваться повторный анализ результатов проведенного исследования. Врачу рекомендуется периодически запрашивать актуальную информацию у лабораторий (1 раз в 6 - 12 месяцев). Данные могут быть повторно проанализированы по запросу пациента или врача, представляющего интересы пациента. Лаборатории должны предоставить описание используемой методики повторного анализа данных и пояснить, требуется ли дополнительная оплата за такой анализ. Поощряется разработка новых подходов для предоставления пациенту обновлённой информации.

Проведение дополнительных анализов, таких как секвенирование по Сэнгеру для верификации выявленных вариантов, анализ ДНК родителей для установления 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 такого анализа, в котором должны быть указаны все ограничения используемого метода.

Особые положения

Особенности интерпретация вариантов у здоровых или людей без симптомов

Для отнесения выявленного варианта к патогенным в этих случаях необходима сильная доказательная база. Вероятность обнаружения вариантов, признан-

ных патогенными, в этой группе обследуемых обычно очень низкая.

Распространённые многофакторные заболевания

Данное руководство не применимо для оценки клинической значимости вариантов, ассоциированных с многофакторными заболеваниями. В настоящее время известно более 1200 вариантов, ассоциированных с повышенным риском развития таких заболеваний и наследственных черт, большинство этих вариантов находятся за пределами генных регионов.

Польза тестирования вариантов, ассоциированных с риском многофакторных заболеваний, для клинической практики не очевидна.

Настоящее руководство не предлагает форму отчёта по вариантам для многофакторных признаков; включить в отчёт эти варианты можно в качестве дополнительных сведений, однако 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 вариантов ядерных генов. В ней используются 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 гетероплазии или гомоплазии с приблизительной оценкой уровня гетероплазии должно быть включено в отчёт. Уровень гетероплазии в тканях разных типов может различаться, поэтому ее оценка должна быть приведена с указанием исследованного биологического образца.

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

Источниками для интерпретации вариантов митохондриальной ДНК являются:

- MitoMap – главный информационный источник по митохондриальным вариантам и гаплотипам;
- информация по частоте встречаемости вариантов (mtdb.igp.uu.se);

- информация по митохондриальным транспортным ДНК (mamitrna.u-strasbg.fr)
- информация о митохондриальных гаплогруппах (phyloree.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 по структурным вариантам. Данное руководство не применимо для оценки клинической значимости соматических вариантов.

Особенности фармакогеномного анализа и интерпретации:

Данное руководство **не применимо** для оценки клинической значимости фармакогеномных аллелей. При классификации фармакогеномных вариантов следует учитывать, что:

- фенотип проявляется только после приёма лекарственного средства;
- в общепринятой номенклатуре фармакогеномных аллелей используется знак (*) для обозначения аллелей, которые часто представляют собой гаплотип или комбинацию вариантов того же аллеля;
- до сих пор применяется традиционное нумерование нуклеотида, использующее устаревшую последовательность референса;
- конвертация бывшей традиционной номенклатуры к стандартизированной номенклатуре, использующей современный референс, при всей необходимости, рискована;
- интерпретация вариантов зачастую требует установления гаплотипа по комбинации обнаруженных вариантов;

Для многих генов фармакогенома (гены, кодирующие ферменты) весь фенотип берётся из диплотипа, а именно, комбинации вариантов гаплотипов обоих аллелей.

При классификации вариантов использование терминов, связанных с метаболизмом (быстрый, средний, медленный), эффективностью (резистентный, быстро реагирующий, чувствительный) или риском нежелательный эффектов, может быть более уместно нежели использование термина патогенный.

Краткая сводка по генам и клинически значимым вариантам доступна на pharmgkb.org. Аллели и номенклатура по цитохрому семейства гена P450 доступны на cypalleles.ki.se.

Заключительные положения для лабораторий

Анализ «первичных» результатов может проводить **только** врач лабораторный генетик в сотрудничестве с другими специалистами, такими как биоинформатик и врач-генетик. Данные, полученные методами MPS, должен интерпретировать врач лабораторный генетик, после чего **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 может быть необходима подробная клиническая информация. В лаборатории обязаны оценить вариант и ген в контексте анамнеза и семейной истории пациента, физического осмотра и предшествующих лабораторных тестов и с использованием этой информации определить, является ли вариант патогенным, вероятно патогенным или доброкачественным. В этой связи лаборатория вправе отказать в анализе, если не получает достаточную информацию о фенотипе пациента вместе с биообразцом, и не принять такой образец.

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

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

Рекомендуется пользоваться информационными ресурсами специфичными для определенной патологии.

Лаборатория обязана хранить «сырые» данные исследования (в виде файлов форматов .fastq, .bam или файлов более раннего формата) в течение 70 лет. Собственником данных MPS-анализа, является пациент.

Заключительные положения для врачей

Формулируя предварительный диагноз при направлении на исследование следует исходить из клинических признаков заболевания. Метод MPS не следует использовать без предварительного клинического диагноза или понимания возможностей дальнейшего консультирования пациента. Направление на исследование методом MPS должно включать максимальное количество клинических и лабораторных данных о пациенте.

При направлении на анализ методом MPS пациент в процессе первичной консультации должен получить необходимую информацию и в обязательном порядке подписать информированное согласие на про-

ведение исследования ему или его несовершеннолетнему ребенку. При подписании информированного согласия он должен выбрать, согласен ли он получить информацию:

1. только о вариантах, ассоциированных с фенотипом больного, или

2. о вариантах, ассоциированных с фенотипом больного и «вторичных» находках — вариантах, являющихся причиной моногенных заболеваний, не связанных с фенотипом и поддающихся лечению (минимум 69 генов, **табл. 4**), или

3. о вариантах, ассоциированных с фенотипом больного и «вторичных» находках: патогенных вариантах, являющихся причиной известных моногенных заболеваний, не связанных с фенотипом.

В зависимости от выбора пациента лаборатории обязаны выдавать список обнаруженных патогенных вариантов.

Пациент должен быть проинформирован, что в результате анализа может быть не обнаружено вариантов, связанных с фенотипом, могут быть выявлены варианты с неизвестным клиническим значением, которые сложно интерпретировать и, возможно, потребуются проведение дополнительных исследований для уточнения патогенности варианта.

После исследования обязательно повторное медико-генетическое консультирование пациента по результатам MPS.

На сегодня методы анализа вариантов нуклеотидной последовательности несовершенны, и приводимые в отчетах категории вариантов не подразумевают 100% уверенности. Не рекомендуется применение этого руководства как единственного обоснования фенотипа при диагностике менделирующих заболеваний; результаты анализа следует использовать совместно с данными других объективных методов исследования.

Вариант, классифицированный с использованием предлагаемой в настоящем руководстве схемы как патогенный, может быть использован врачом как базовое доказательство моногенной природы заболевания при формулировке диагноза. Вариант, классифицированный как вероятно патогенный, может служить достаточным доказательством для того, чтобы врач смог использовать результаты молекулярного тестирования в принятии клинического решения в сочетании с другими доказательствами по рассматриваемому заболеванию. Вариант неопределённого значения не должен быть использован в принятии клинических решений. Варианты неопределённого значения не должны анализироваться при дородовой (пренатальной или преимплантационной) генетической диагностике .

Примеры заключений

Пример 1: Выявлен патогенный вариант нуклеотидной последовательности при заболевании с аутосомно-рецессивным 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.

Первичные данные могут быть предоставлены по запросу пациента или его лечащего врача

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	c.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 экзоне 6 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 Сэнгеру.

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-концевого чтения (2x151 п.н.)) со средним покрытием (пример: не менее 70—100x). Для пробоподготовки была использована методика (пример: 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 (пример: 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, пример: 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 (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).

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 экзона можно ограничиться информацией о покрытии в графическом виде с указанием (в %) количества фрагментов нуклеотидной последовательности с покрытием менее $\times 10$ и информацией о том, как получить сведения о покрытии конкретной области).

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	Доля фрагментов (%) с покрытием менее $\times 10$ (для WES/WGS/«клинический экзом)	8

Ссылки на использованные базы данных и литературу

Ссылка на статью
Ссылка на статью
<http://www.omim.org/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>
<http://exac.broadinstitute.org/>
Дата

Подпись врача лабораторного генетика

Пример 2: Выявлены варианты нуклеотидной последовательности неопределенного значения при заболевании с аутосомно-рецессивным типом наследования

ЗАКЛЮЧЕНИЕ
по результатам секвенирования ДНК (клиническое секвенирование экзона)

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.

Первичные данные могут быть предоставлены по запросу пациента или его 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
Не выявлено								

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 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, тем не менее, 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, в частности, 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, тем не менее, 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, тем не менее, 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 Сэнгеру.

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

Данные секвенирования могут быть проанализированы повторно по запросу пациента или его лечащего врача (рекомендовано периодически запрашивать актуальную информацию у лаборатории (1 раз в 12 месяцев)).

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

ОПИСАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (стандартное, не зависит от типа выявленных вариантов)

СВЕДЕНИЯ О КАЧЕСТВЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (пример, см. выше)

Ссылки на использованные базы данных и литературу

Дата

Подпись врача лабораторного генетика

ОРГАНИЗАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Пример 3: Выявлены варианты нуклеотидной последовательности неопределенного значения при заболевании с аутосомно-рецессивным типом наследования, а также патогенные варианты, приводящие к заболеваниям, отличным от направительного диагноза.

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: нефротический синдром с гематурией, гормонорезистентный, IgA-нефропатия?.

Первичные данные могут быть предоставлены по запросу пациента или его 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
Не выявлено								

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

Ген	Положение (GRCh37/hg19)	Генотип	Экзон	Положение в кДНК	Эффект	Частота аллеля*	Референсная последовательность	Глубина прочтения
CFHR5	chr1:196973829A>G	A/G	9	c.1369A>G	p.(Asn457Asp)	0,00003609	NM_030787.3	87x

4. Патогенные варианты нуклеотидной последовательности, приводящие к заболеваниям, отличным от направительного диагноза.

Ген	Положение (GRCh37/hg19)	Генотип	Экзон	Положение в кДНК	Эффект	Частота аллеля*	Референсная последовательность	Глубина прочтения
BRCA2	chr13:32911788C>A	C/A	11	c.3296C>A	p.(Ser1099Ter)	н/д	NM_000059.3	62x

*Частоты аллелей приведены по базе The Genome Aggregation Database (выборка до 138 000 человек). н/д = нет данных (не описан)

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

У ФИО был проведен поиск патогенных вариантов, ассоциированных с наследственными формами нефротического синдрома, IgA-нефропатии, а также с другими наследственными заболеваниями со сходными фенотипическими проявлениями.

Выявлен не описанный ранее как патогенный вариант нуклеотидной последовательности в экзоне 9 гена CFHR5 (Chr1:196973829A>G), приводящий к мис-

сенс-замене (p.Asn457Asp, NM_030787.3), в гетерозиготном состоянии. Мутации в гене CFHR5 в гетерозиготном состоянии описаны у пациентов с нефропатией, обусловленной недостаточностью CFHR5 (Nephropathy due to CFHR5 deficiency OMIM: 614809). Данный вариант нуклеотидной последовательности зарегистрирован в контрольной выборке gnomAD с частотой 0,003609% (на 10 хромосомах из 277106). Алгоритмы предсказания патогенности дают противоречи-

вую оценку: PolyPhen2, SIFT и PROVEAN расценивают данный вариант как вероятно патогенный, Mutation Taster и UMD-predictor — как нейтральный. В связи с этим данный вариант следует расценивать как вариант с неопределенной клинической значимостью, который, тем не менее, может иметь отношение к фенотипу пациента в случае получения дополнительных подтверждающих данных.

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

Кроме того, у ФИО выявлен описанный ранее в одной статье LaDusa H [ссылка] как патогенный (SM1716892) вариант нуклеотидной последовательности в экзоне 11 гена *BRCA2* (Chr13:32911788C>A), приводящий к появлению сайта преждевременной терминирования трансляции в кодоне 1099 (p.(Ser1099Ter), NM_000059.3), в гетерозиготном состоянии. Мутации в гене *BRCA2* в гетерозиготном состоянии описаны у пациентов с предрасположенностью к раку молочной железы у мужчин ({Breast cancer, male, susceptibility to} OMIM: 114480), семейным раком молочной железы и яичников 2 типа ({Breast-ovarian cancer, familial, 2} OMIM: 612555), раком простаты ({Prostate cancer} OMIM: 176807), в гетерозиготном, гомозиготном и компаунд-гетерозиготном состоянии — у пациентов с медуллобластомой ({Medulloblastoma} OMIM: 155255), в гомозиготном и компаунд-гетерозиготном состоянии — у пациентов с анемией Фанкони (Fanconi anemia,

complementation group D1 OMIM: 605724), глиобластомой 3 типа ({Glioblastoma 3} OMIM: 613029), а также как фактор риска при раке поджелудочной железы 2 типа ({Pancreatic cancer 2} OMIM: 613347). Данный вариант нуклеотидной последовательности не зарегистрирован в контрольной выборке gnomAD. По совокупности сведений выявленный вариант нуклеотидной последовательности следует расценивать как патогенный. Необходима консультация врача-генетика.

Других значимых изменений, соответствующих критериям поиска, не обнаружено.

Все варианты, указанные в заключении, необходимо подтверждать методом прямого секвенирования по Сэнгеру.

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

ОПИСАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (стандартное, не зависит от типа выявленных вариантов)

СВЕДЕНИЯ О КАЧЕСТВЕ ИССЛЕДОВАНИЯ (пример, см. выше)

Ссылки на использованные базы данных и литературу

Дата

Подпись врача лабораторного генетика

Список литературы/References

- Richards S., Aziz N., Bale S., et al. 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;17(5):405-424 doi: 10.1038/gim.2015.30
- Rehm H.L., Bale S.J., Bayrak-Toydemir P., et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med.* 2013;15(9):733-747 doi: 10.1038/gim.2013.92
- Aziz N., Zhao Q., Bry L., et al. College of American Pathologists' Laboratory Standards for Next-Generation Sequencing Clinical Tests. *Arch Pathol Lab Med.* 2015;139:481-493 DOI: 10.5858/arpa.2014-0250-CP
- Matthijs G, Souche E, Alders M, et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet.* 2015;24(1):2-5. doi: 10.1038/ejhg.2015.226
- Duke SciPol. Use of standards in FDA regulatory Oversight of Next Generation Sequencing-Based In Vitro Diagnostics used for diagnosing Germline Diseases (Draft Guidance). Available at <http://scipol.duke.edu/content/use-standards-fda-regulatory-oversight-next-generation-sequencing-based-vitrodiagnostics> (08/08/2016)
- Nykamp K., Anderson M., Powers M., et al. Sherloc: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. *Genet Med.* 2017;19(10):1105-1117 doi: 10.1038/gim.2017.37.
- Kalia S.S., Adelman K., Miller D.T., et al. 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. *Genetics in Medicine* 2017; 19(2):249-255 doi:10.1038/gim.2016.190
- Ellard S., Baple E.L., Owens M., et al. ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification 2018. Available at http://acgs.uk.com/media/1140458/uk_practice_guidelines_for_variant_classification_2018_v1.0.pdf
- Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б. и др. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) [Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prohorchuk E.B. et al. Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants]. *Медицинская генетика [Medical Genetics]* 2017 (7): 4-17. (In Russ.)
- Lek M., Karczewski K.J., et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016 volume 536, pages 285-291 <https://doi.org/10.1038/nature19057>