

---

# Рекомендации по интерпретации данных NGS

зав. ЦКП «геном» ФГБНУ «МГНЦ»,

зав. лаборатории медико-генетической диагностики №3 ФГБНУ «МГНЦ»

**к.м.н. Рыжкова О.П.**



МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
ИМЕНИ АКАДЕМИКА Н.П. БОЧКОВА

---

# Медицинская генетика



Расширен

ГЛАВНАЯ

О ЖУРНАЛЕ

[Главная](#) > [Том 18, № 2 \(2019\)](#) > [Рыжкова](#)

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

*О. П. Рыжкова, О. Л. Кардымон, Е. Б. Прохорчук, Ф. А. Коновалов, А. Б. Масленников, В. А. Степанов, А. А. Афанасьев, Е. В. Заклязьминская, Д. В. Ребриков, К. В. Савостьянов, А. С. Глотов, А. А. Костарева, А. Е. Павлов, М. В. Голубенко, А. В. Поляков, С. И. Куцев*

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.02.3-23>



# Основные изменения

1. Уточнения использования «существующих» критериев
2. Дополнение критериями анализа вариантов мтДНК
3. Расширение списка «вторичных» находок
4. Необходимость подтверждения варианта альтернативными методами (секвенирование по Сенгеру)
5. Заключение

# Основа рекомендаций 2018

**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**

Sue Richards, PhD<sup>1</sup>, Nazneen Aziz, PhD<sup>2</sup>, Sherri Bale, PhD<sup>1</sup>, David Bick, MD<sup>1</sup>, Soma Das, PhD<sup>1</sup>, Julie Gastier-Foster, PhD<sup>3,4</sup>, Wayne W. Grody, MD, PhD<sup>5,6,7</sup>, Madhuri Hegde, PhD<sup>1</sup>, Elaine Lyon, PhD<sup>8</sup>, Elaine Spector, PhD<sup>9</sup>, Karl Voelkerding, MD<sup>10</sup> and Heidi L. Rehm, PhD<sup>11</sup>, on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee

Disclaimer: These ACMG Standards and Guidelines were developed primarily as an educational resource for clinical laboratory geneticists to help them provide quality clinical laboratory services. Adherence to these standards and guidelines is voluntary and does not necessarily assure a successful medical outcome. These Standards and Guidelines should not be considered substitutes for all proper procedures and tests or substitutes for other procedures and tests that are reasonably directed to obtaining the same results. In determining the propriety of any specific procedure or test, the clinical laboratory geneticist should apply his or her own professional judgment to the specific circumstances presented by the individual patient or specimen. Clinical laboratory geneticists are encouraged to document in the patient's record the rationale for the use of a particular procedure or test, whether or not it is in conformance with these Standards and Guidelines. They also are advised to take notice of the date any particular guideline was adopted and to consider other relevant medical and scientific information that becomes available after that date. It also would be prudent to consider whether intellectual property interests may restrict the performance of certain tests and other procedures.

**Contains Nonbinding Recommendations  
Draft – Not For Implementation**

**1 Use of Standards in FDA Regulatory  
2 Oversight of Next Generation  
3 Sequencing (NGS)-Based In Vitro  
4 Diagnostics (IVDs) Used for  
5 Diagnosing Germline Diseases**

**7 Draft Guidance for Stakeholders and  
8 Food and Drug Administration Staff**

**DRAFT GUIDANCE**

12 This draft guidance document is being distributed for comment purposes only.

13 Document issued on July 8, 2016.

14 You should submit comments and suggestions regarding this draft document within 90 days of  
15 publication in the *Federal Register* of the notice announcing the availability of the draft  
16 guidance. Submit electronic comments to <http://www.regulations.gov>. Submit written  
17 comments to the Division of Dockets Management (HFA-305), Food and Drug Administration,  
18 5630 Fishers Lane, rm. 1061, Rockville, MD 20852. Identify all comments with the docket  
19 number listed in the notice of availability that publishes in the *Federal Register*.

**College of American Pathologists' Laboratory Standards for Next-Generation Sequencing Clinical Tests**

Nazneen Aziz, PhD<sup>1</sup>, Qin Zhao, PhD<sup>2</sup>, Lynn Bry, MD, PhD<sup>3</sup>, Denise K. Dittoli, MS, MT(ASCP)SBB<sup>4</sup>, Bingli Fanke, PhD<sup>5</sup>, Jane S. Gibson, PhD<sup>6</sup>, Wayne W. Grody, MD, PhD<sup>7,8</sup>, Madhuri R. Hegde, PhD<sup>9</sup>, Gerald A. Hecht, MD, PhD<sup>10</sup>, Debra C. B. Leonard, MD, PhD<sup>11</sup>, Jason D. Meeker, MD, PhD<sup>12</sup>, Raksh Nageswaran, MD, PhD<sup>13</sup>, Linda A. Pakiz, MT(ASCP)<sup>14</sup>, Ryan S. Robinson, MD, PhD<sup>15</sup>, Schuyler MD, Karen E. Weik, MD, Karl V. Voelkerding, MD

**Context**—The higher throughput and lower per-base cost of next-generation sequencing (NGS) as compared to Sanger sequencing has led to its rapid adoption in clinical testing. The number of laboratories offering NGS-based tests has also grown considerably in the past few years, despite the fact that specific Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988/Collge of American Pathologists (CAP) laboratory standards had not yet been developed to regulate this technology.  
**Objective**—To develop a checklist for clinical testing using NGS technology that sets standards for the analytic

Accepted for publication June 19, 2014.  
Published as an Early Online Release August 23, 2014.  
From Molecular Medicine (Dr Aziz), Laboratory Improvement Programs (Dr Zhao and Dr Pakiz), and Laboratory Accreditation and Regulatory Affairs (Dr Dittoli), College of American Pathologists, Northfield, Illinois; the Department of Pathology, Brigham A. Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts (Dr Bry); the Department of Pathology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts (Dr Fanke); the Department of Clinical Sciences, University of Central Florida College of Medicine, Orlando, Florida (Dr Leonard); the Division of Medical Genetics and Molecular Diagnostics, Department of

wet bench process and for bioinformatics or "dry bench" analyses. As NGS-based clinical tests are new to diagnostic testing and are of much greater complexity than traditional Sanger sequencing-based tests, there is an urgent need to develop new regulatory standards for laboratories offering these tests.  
**Design**—To develop the necessary regulatory framework for NGS and to facilitate appropriate adoption of this technology for clinical testing, CAP formed a committee in 2011, the NGS Work Group, to deliberate upon the contents to be included in the checklist.  
**Results**—A total of 18 laboratory accreditation checklist requirements for the analytic wet bench process and bioinformatics analysis processes have been included within CAP's molecular pathology checklist (MOL).  
**Conclusion**—This report describes the important issues considered by the CAP committee during the development of the new checklist requirements, which address documentation, validation, quality assurance, confirmatory testing, exception logs, monitoring of upgrades, variant interpretation and reporting, incidental findings, data storage, version traceability, and data transfer confidentiality.  
**Arch Pathol Lab Med.** 2015;139:481–493. doi:10.5858/arpa.2014-422-CP

**Open**  
**Guidelines for diagnostic next-generation sequencing**

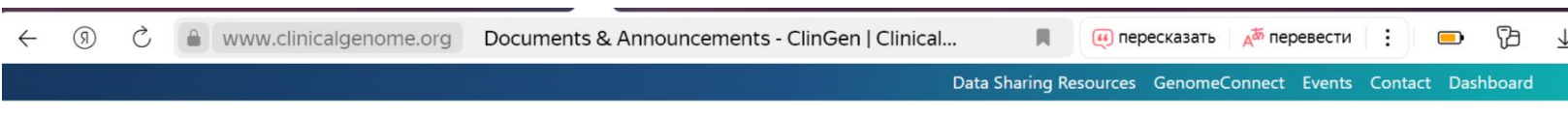
Gert Matthijs<sup>1,2</sup>, Erika Souche<sup>3,4</sup>, Mariëlle Alders<sup>5</sup>, Anniek Corvellec<sup>6</sup>, Sebastian Eck<sup>7</sup>, Ilse Fennstra<sup>8</sup>, Valérie Race<sup>9</sup>, Erik Sijstermans<sup>10</sup>, Marc Sturm<sup>11</sup>, Marjan Weiss<sup>12</sup>, Helger Yntema<sup>13</sup>, Egbert Bakker<sup>14</sup>, Hans Scheffer<sup>15</sup> and Peter Bauer<sup>16</sup>

We present, on behalf of EuroGenTest and the European Society of Human Genetics, guidelines for the evaluation and validation of next-generation sequencing (NGS) applications for the diagnosis of genetic disorders. The work was performed by a group of laboratory geneticists and bioinformaticians, and discussed with clinical geneticists, industry and patients' representatives, and other stakeholders in the field of human genetics. The statements that were written during the elaboration of the guidelines are presented here. The background document and full guidelines are available as supplementary material. They include many examples to assist the laboratories in the implementation of NGS and accreditation of this service. The work and ideas presented by others in guidelines that have emerged elsewhere in the course of the past few years were also considered and are acknowledged in the full text. Interestingly, a few new insights that have not been cited before have emerged during the preparation of the guidelines. The most important new feature is the presentation of a 'rating system' for NGS-based diagnostic tests. The guidelines and statements have been approved by the genetic diagnostic community, and thus seem to be valuable for the harmonization and quality assurance of NGS diagnostics in Europe.  
European Journal of Human Genetics (2016) 24, 2–5; doi:10.1038/ejhg.2015.226; published online 28 October 2015

1. Sue Richards, Nazneen Aziz, Sherri Bale 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. // Genetics in medicine doi:10.1038/gim.2015.30
2. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing, Genetics in medicine, V. 15, Number 9, September 2013, p. 733-747
3. College of American Pathologists' Laboratory Standards for Next-Generation Sequencing Clinical Tests, Arch Pathol Lab Med. 2015;139:481–493
4. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing, European Journal of Human Genetics (2016) 24, 2–5
5. 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
6. Keith Nykamp, Michael Anderson, Martin Powers et al. Sherlock: a comprehensive refinement of the ACMG–AMP variant classification criteria. Genet Med. 2017 Oct; 19(10): 1105–1117. doi: 10.1038/gim.2017.37
7. Sarah S Kalia, Kathy Adelman, David T. Miller 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. Published 2017 in Genetics in Medicine, DOI:10.1038/gim.2016.190
8. Ellard, Emma L Baple, Martina Owens et al. ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification 2017. The Association for Clinical Genomic Science
9. Рыжкова ОП, Кардымон ОЛ, Прохорчук ЕБ и др. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS). Медицинская генетика. 2017 (7): 4-17.
10. Monkol Lek, Konrad J. Karczewski et al.// Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. // Nature volume 536, pages 285–291 (18 August 2016)



# Основа рекомендаций 2024



Учитывая:

1. Научные, клинические и  
финансовые возможности в РФ

2. Опыт и знания специалистов РФ в области  
клинической и молекулярной генетики

All Documents

296

ClinGen Exhibit Booth  
Materials

3

on Activity Procedures

Disease Validity

7

Pathogenicity

43

Actionability

2

Sensitivity

2

Cancer Variant

1

Conflict Of Interest (COI)

61

Data Sharing Resources

18

Expert Panel Applications

13

News

46

Genetic Counselors

Kristy R. Crooks • Kelly D. Farwell Hagman • Diana Mandelker • ... Ryan J. Schmidt

Robyn L. Temple-Smolkin • Stephen E. Lincoln • Show all authors

Published: May 17, 2023 • DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2023.03.012> • Check for updates

PlumX

# Номенклатура

1. Описание вариантов : <http://www.hgvs.org/mutnomen>
2. Инструменты для обеспечения правильной номенклатуры: <https://mutalyzer.nl>,  
<https://variantvalidator.org/>
3. Референсная последовательность:  
**MANE Select** (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/MANE/>)
  1. RefSeq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>)
  2. Locus Reference Genomic (<http://www.lrg-sequence.org>)
4. **Геномные координаты в соответствии: GRCh37/hg19;**  
**GRCh38/hg18, T2T (CHM13v2.0/hs1)**

# 1. Классификация вариантов

## 1. Патогенный

- Очень сильный
- Сильный
- Средней тяжести
- Вспомогательный

## 2. Доброкачественный

- Очень сильный
- Сильный
- Средней тяжести
- Вспомогательный

# 1. Уточнение использования «существующих» критериев



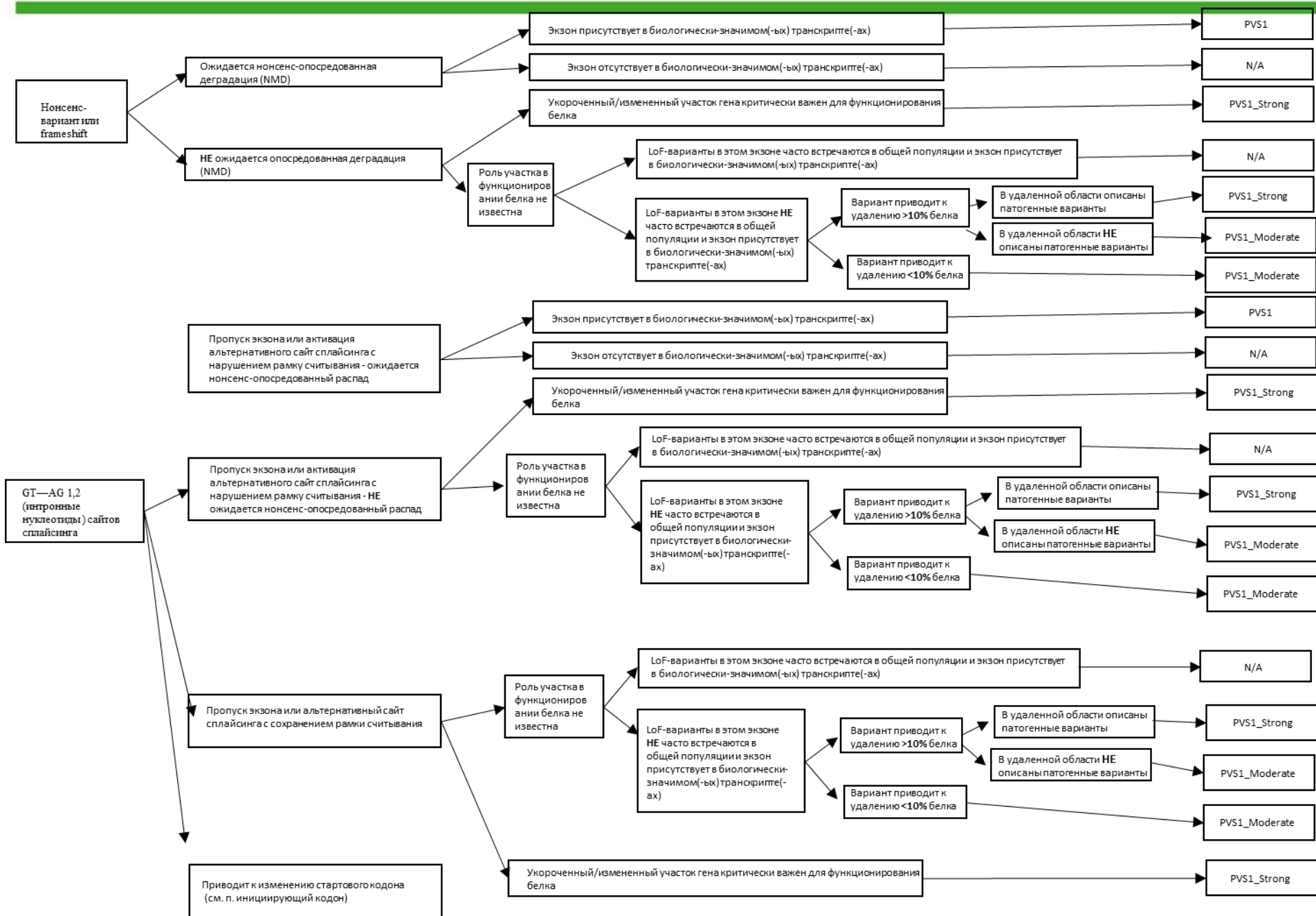
# 1. Уточнение использования «существующих» критериев

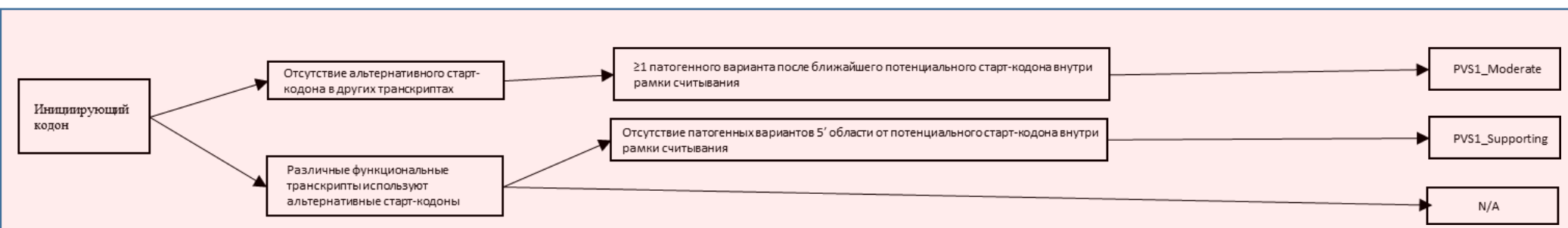
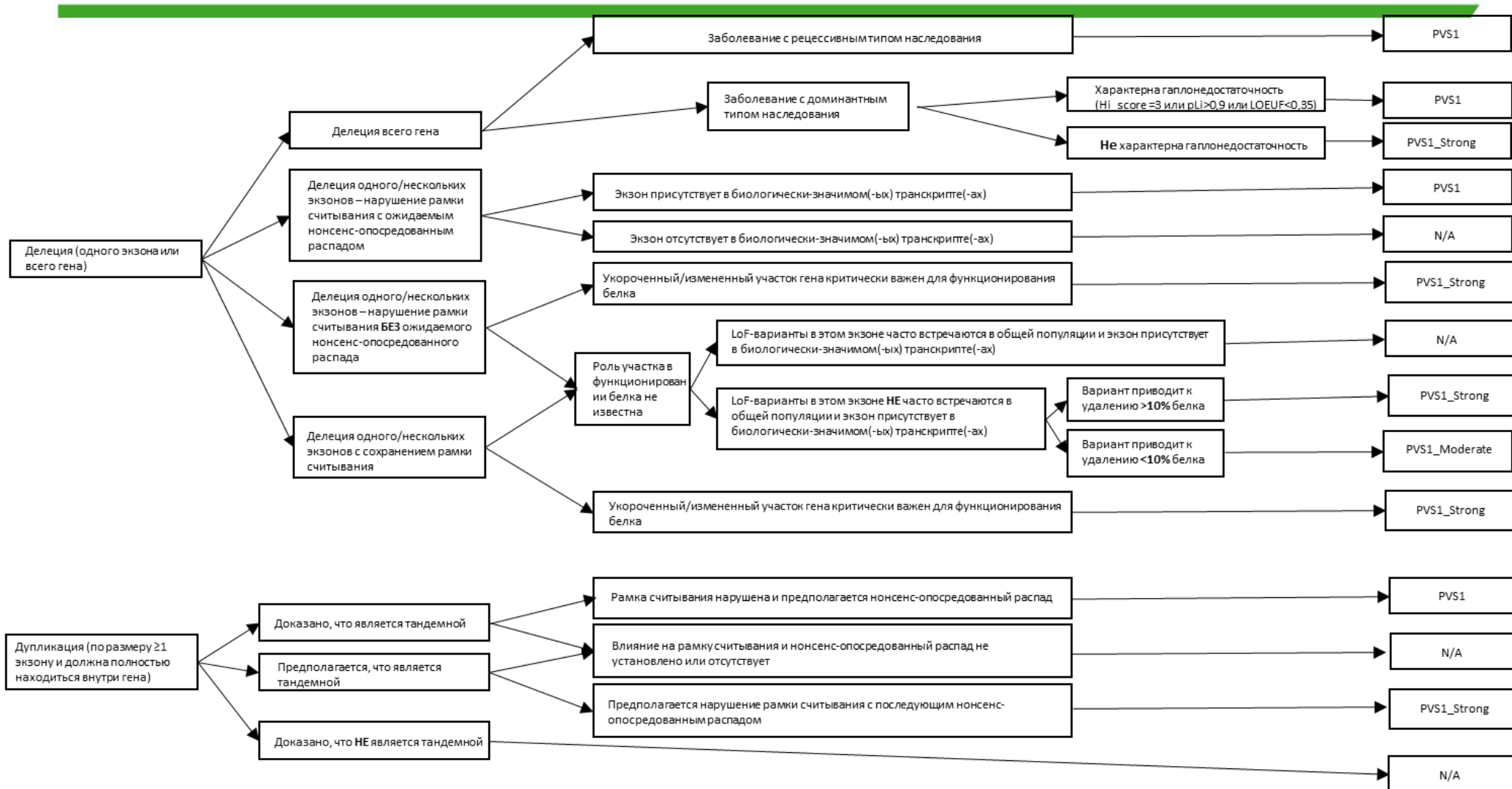
**PVS1** LOF-варианты, приводящие к прекращению синтеза белка, в генах, где данный тип варианта является известной причиной развития заболевания

- ✓ нонсенс-мутации;
- ✓ мутации со сдвигом рамки считывания;
- ✓ изменения канонических  $\pm 1$  или  $\pm 2$  нуклеотидов сайта сплайсинга;
- ✓ варианты, приводящие к исчезновению стартового-кодона;
- ✓ делеции/дупликации одного или нескольких экзонов.

## Принять во внимание:

- Существуют гены, где варианты, приводящие к прекращению синтеза белка, не являются патогенными (например, GFAP, MYH7)
- Будьте внимательны при интерпретации вариантов, расположенных близко к 3' концу гена
- Будьте внимательны со сплайс-вариантами, которые прогнозируемо приводят к пропуску экзонов, но оставляют оставшуюся часть белка нетронутой и не меняют рамку считывания
- Будьте осторожны при наличии нескольких транскриптов.





# 1. Уточ

Данный алл  
максимал

Уровень доказательства		Описание доказательства
Вспомогательное доказательство	Максимальное	Роль этого гена в конкретном заболевании неоднократно продемонстрирована как клинически, так и экспериментально. Эти наблюдения не были опровергнуты в течение долгого времени (минимум 3 года). Убедительных доказательств, опровергающих роль гена в патогенезе конкретного заболевания, не появилось.
	Сильное	Роль этого гена в развитии заболевания была независимо продемонстрирована не менее чем в двух отдельных исследованиях, в которых имеются оба из следующих <b>сильных</b> доказательств участия гена в патогенезе заболевания: Сильное доказательство на уровне варианта, демонстрирующее множество пробандов, не имеющих родственных связей и являющихся носителями вариантов, для которых имеются убедительные доказательства в пользу участия в развитии заболевания, <b>а также</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Убедительные доказательства генного уровня, полученные из вспомогательных экспериментальных данных различного типа<sup>2</sup>.</li></ul> Кроме того, отсутствуют убедительные доказательства, опровергающие участие гена в развитии заболевания.
	Умеренное	Имеется <b>умеренное</b> доказательство в пользу участия гена в развитие заболевания, обычно включающее оба из следующих типов доказательств: <ul style="list-style-type: none"><li>Имеется несколько пробандов с генетическими вариантами, для которых представлены убедительные доказательства связи с развитием заболевания<sup>1</sup></li><li>Умеренные экспериментальные данные<sup>2</sup> в пользу взаимосвязи «ген-заболевание»</li></ul> Роль этого гена не была независимо описана для конкретного заболевания, однако убедительные доказательства, опровергающие участие гена в развитии этого заболевания отсутствуют.
	Ограниченное	Имеются <b>ограниченные</b> доказательства, указывающие на участие гена в развитии заболевания, например: <ul style="list-style-type: none"><li>Менее трёх наблюдений вариантов, предоставляющих данные об участии гена в развитии заболевания<sup>1</sup> ИЛИ</li><li>Варианты встретились у пробандов, но ни для кого из них не предоставлено убедительных данных о наличии связи между геном и развитием заболевания.</li></ul>
Нет доказательств	Данные об участии гена в патогенезе заболевания отсутствуют. Такие гены могут быть «кандидатами» исходя из расстояния сцепления, данных, полученных на модельных организмах, вовлеченности в молекулярные пути, участвующие в развитии заболеваний и т.п., но публикаций, прямо утверждающих, что ген имеет отношение в развитие заболевания нет.	

ЛЬНОМ ИЛИ

# 1. Уточнение «существующих» критериев

## 1. Рекомендуется использовать PVS1, если:

Клиническая значимость гена СИЛЬНАЯ и выше

И

>10% вариантов, связанных с фенотипом, являются LOF (должны располагаться более чем в 1 экзоне)\*

## 2. Рекомендуется снижать уровень силы критерия на 1 уровень (PVS1→PVS1\_strong), если:

Клиническая значимость гена УМЕРЕННАЯ и выше

И

описано 2 или более LOF вариантов, ассоциированных с фенотипом (должны располагаться более чем в 1 экзоне)\*

И

Модельные нокаутные животные воспроизводят фенотип заболевания

## 3. Рекомендуется снижать уровень силы критерия на 2 уровня (PVS1\_strong→PVS1\_moderate), если:

Клиническая значимость гена УМЕРЕННАЯ и выше

И ЛЮБОЙ ИЗ:

описано 2 или более LOF вариантов, ассоциированных с фенотипом (должны располагаться более чем в 1 экзоне)\*

ИЛИ

Модельные нокаутные животные воспроизводят фенотип заболевания

## 4. Если нет доказательств того, что варианты LOF вызывают болезнь, PVS1 не следует применять (PVS1\_N/A).



--- Refined ACMG/AMP rules for splicing prediction data ---



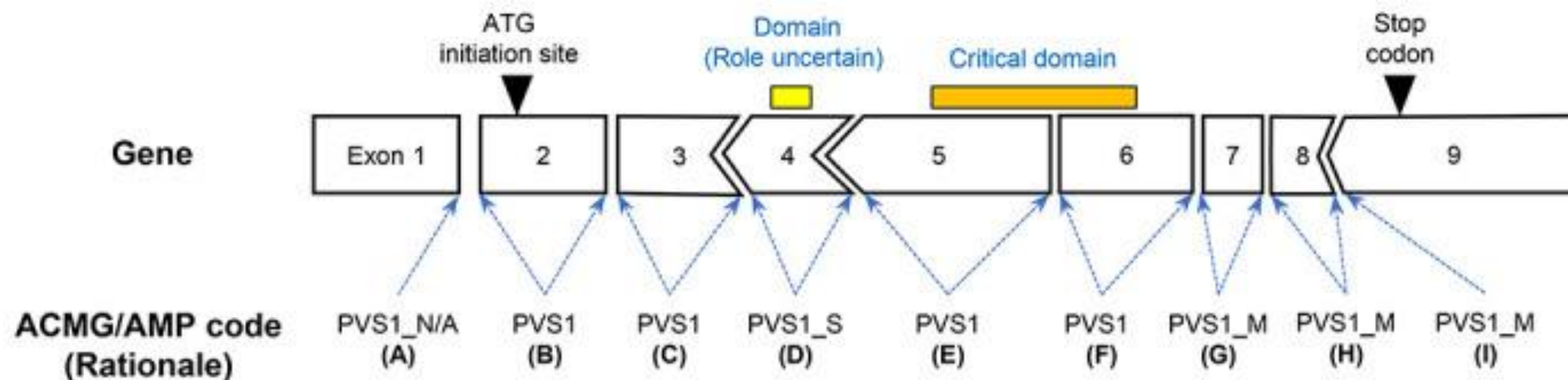
--- Refined ACMG/AMP rules for splicing assay data ---



**PVS1\_strength (RNA)**  
**BP7\_Strong (RNA)**



# 1. Уточнение «существующих» критериев



- (A) 5' UTR region - No splicing alteration predicted or use of a cryptic splice site does not affect the coding sequence.
- (B) Exon skipping or use of a cryptic splice site eliminates the initiation codon and there are no alternative start codons.
- (C) Exon skipping or use of a cryptic splice site disrupts reading frame and is predicted to undergo NMD
- (D) Exon skipping or use of a cryptic splice site preserves reading frame, and removes a region (>10% of the protein) which has not been established as critical to protein function.
- (E) Exon skipping or use of a cryptic splice site disrupts reading frame and is predicted to undergo NMD
- (F) Exon skipping or use of a cryptic splice site preserves reading frame, and removes a region which has been established as critical to protein function
- (G) Exon skipping or use of a cryptic splice site preserves reading frame, and removes a region (<10% of the protein) which has not been established as critical to protein function.
- (H) Exon skipping or use of a cryptic splice site disrupts reading frame and is not predicted to undergo NMD, and removes a region (<10% of the protein) which has not been established as critical to protein function.
- (I) Exon skipping or use of a cryptic splice site disrupts reading frame and is not predicted to undergo NMD, and removes a region (<10% of the protein) which has not been established as critical to protein function.



Variant Under Assessment (VUA)	Baseline computational/predictive code applicable to VUA	Position of comparison variant relative to VUA	PS1 code applicable to VUA	
			with P comparison variant	with LP comparison variant
Outside canonical dinucleotide	PP3	Same nucleotide	PS1	PS1 Moderate
Outside canonical dinucleotide	PP3	Within same splice motif (including within canonical dinucleotide)	PS1_Moderate	PS1_Supporting
Canonical dinucleotide	PVS1	Within same canonical dinucleotide	PS1_Supporting	N/A
Canonical dinucleotide	PVS1	Within same splice motif, but outside canonical dinucleotide#	PS1_Supporting	PS1_Supporting
Canonical dinucleotide	PVS1_Strong, PVS1_Moderate, or PVS1_Supporting	Within same canonical dinucleotide	PS1	N/A
Canonical dinucleotide	PVS1_Strong, PVS1_Moderate, or PVS1_Supporting	Within same splice motif, but outside canonical dinucleotide#	PS1_Moderate	PS1_Support

## 2. Анализ митохондриальной ДНК

## 2. Анализ митохондриальной ДНК

[Hum Mutat.](#) Author manuscript; available in PMC 2021 Dec 1.

PMCID: PMC7717623

*Published in final edited form as:*

NIHMSID: NIHMS1646504

[Hum Mutat.](#) 2020 Dec; [41\(12\)](#): 2028–2057.

PMID: [32906214](#)

Published online 2020 Nov 10. doi: [10.1002/humu.24107](#)

Specifications of the ACMG/AMP standards and guidelines for mitochondrial DNA variant interpretation.

[Elizabeth M. McCormick](#),<sup>1,19</sup> [Marie T. Lott](#),<sup>2,19</sup> [Matthew C. Dulik](#),<sup>3,4,19</sup> [Lishuang Shen](#),<sup>5</sup> [Marcella Attimonelli](#),<sup>6</sup> [Ornella Vitale](#),<sup>6</sup> [Amel Karaa](#),<sup>7</sup> [Renkui Bai](#),<sup>8</sup> [Daniel E. Pineda-Alvarez](#),<sup>9</sup> [Larry N. Singh](#),<sup>2</sup> [Christine M. Stanley](#),<sup>10,11</sup> [Stacey Wong](#),<sup>9</sup> [Anshu Bhardwaj](#),<sup>12</sup> [Daria Merkurjev](#),<sup>5</sup> [Rong Mao](#),<sup>13,14</sup> [Neal Sondheimer](#),<sup>15</sup> [Shiping Zhang](#),<sup>2,16</sup> [Vincent Procaccio](#),<sup>17</sup> [Douglas C. Wallace](#),<sup>2,3,20</sup> [Xiaowu Gai](#),<sup>5,18,20</sup> and [Marni J. Falk](#)<sup>1,3,20,\*</sup>

ACMG/AMP criteria codes	Original ACMG/AMP rule summary	Very strong	Strong	Moderate	Supporting	Comments
PVS1	Null variant in a gene where LOF is a known mechanism of disease	Large heteroplasmic mtDNA deletions, where at least one gene is completely deleted	Assessment of small deletions, nonsense, and frameshift variants in protein-coding genes should follow established guidelines ( <a href="#">Abou Tayoun et al., 2018</a> )			Nonsense mediated decay is not known to occur for mtDNA, however ClinGen SVI PVS1 guidelines ( <a href="#">Abou Tayoun et al., 2018</a> ) will be utilized when applicable (see <a href="#">Figure 2</a> ).
PS1	Same amino acid change as a previously established pathogenic variant regardless of nucleotide change	-	Applied per original ACMG/AMP guidelines	-	-	
PS2	De novo (both maternity and paternity confirmed) in a patient with the disease and no family history	De novo (maternity confirmed or identical full mtDNA sequence) in a patient with the disease and no family history; with weighting per ClinGen SVI guidance			Older sequencing techniques such as Sanger sequencing cannot reliably detect heteroplasmy levels below 30–50%. Current NGS techniques can typically detect heteroplasmy levels as low as 1.5%. It is recommended to test several tissues in the mother to fully assess for the presence and level of the mtDNA variant in question. Utilize ClinGen SVI recommendation for applying these criteria ( <a href="https://clinicalgenome.org/site/assets/files/3461/svi_proposal_for_de_novo_criteria_v1_0.pdf">https://clinicalgenome.org/site/assets/files/3461/svi_proposal_for_de_novo_criteria_v1_0.pdf</a> ), the mitochondrial genome would best fit with <a href="#">Table</a>	



### **3. Расширение списка вторичных находок**

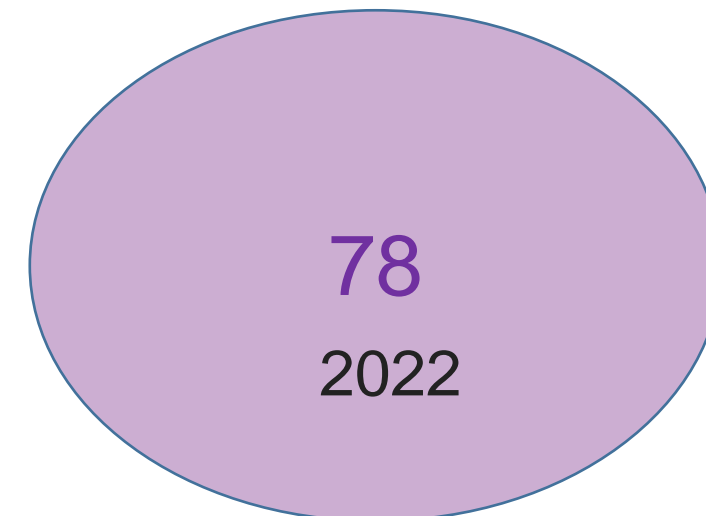
### 3. Расширение списка вторичных находок



ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing



Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the ACMG

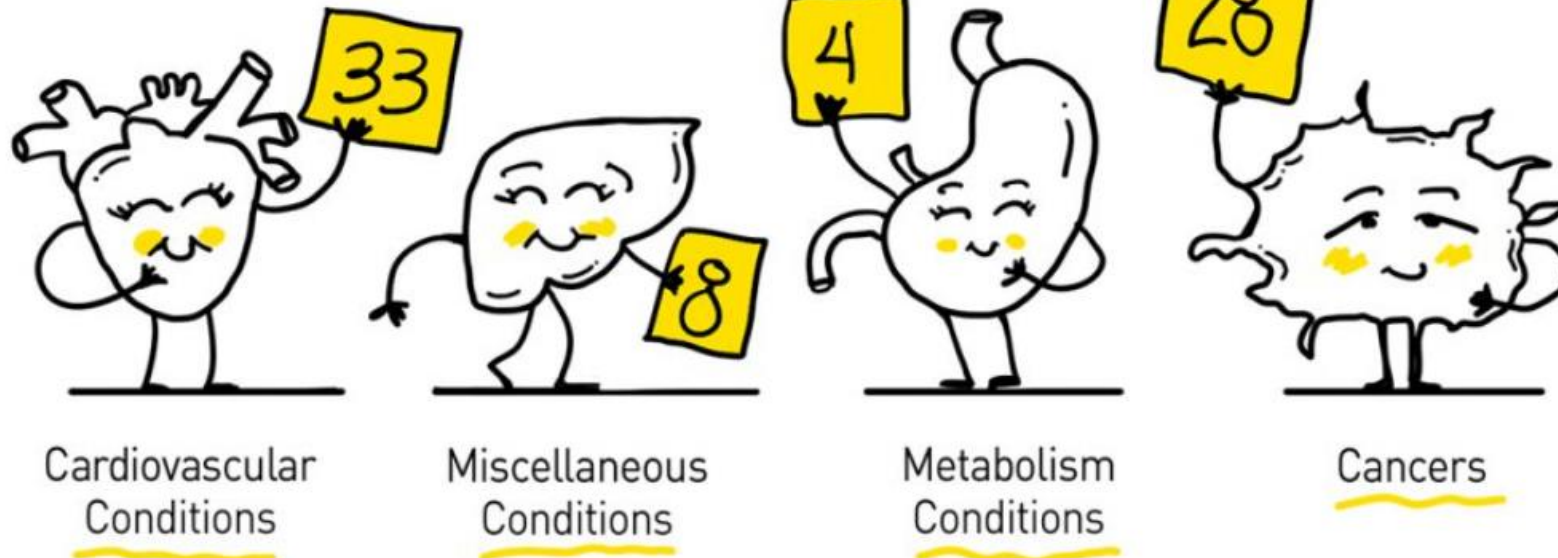


ACMG SF v3.2 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the ACMG

### 3. Расширение списка вторичных находок

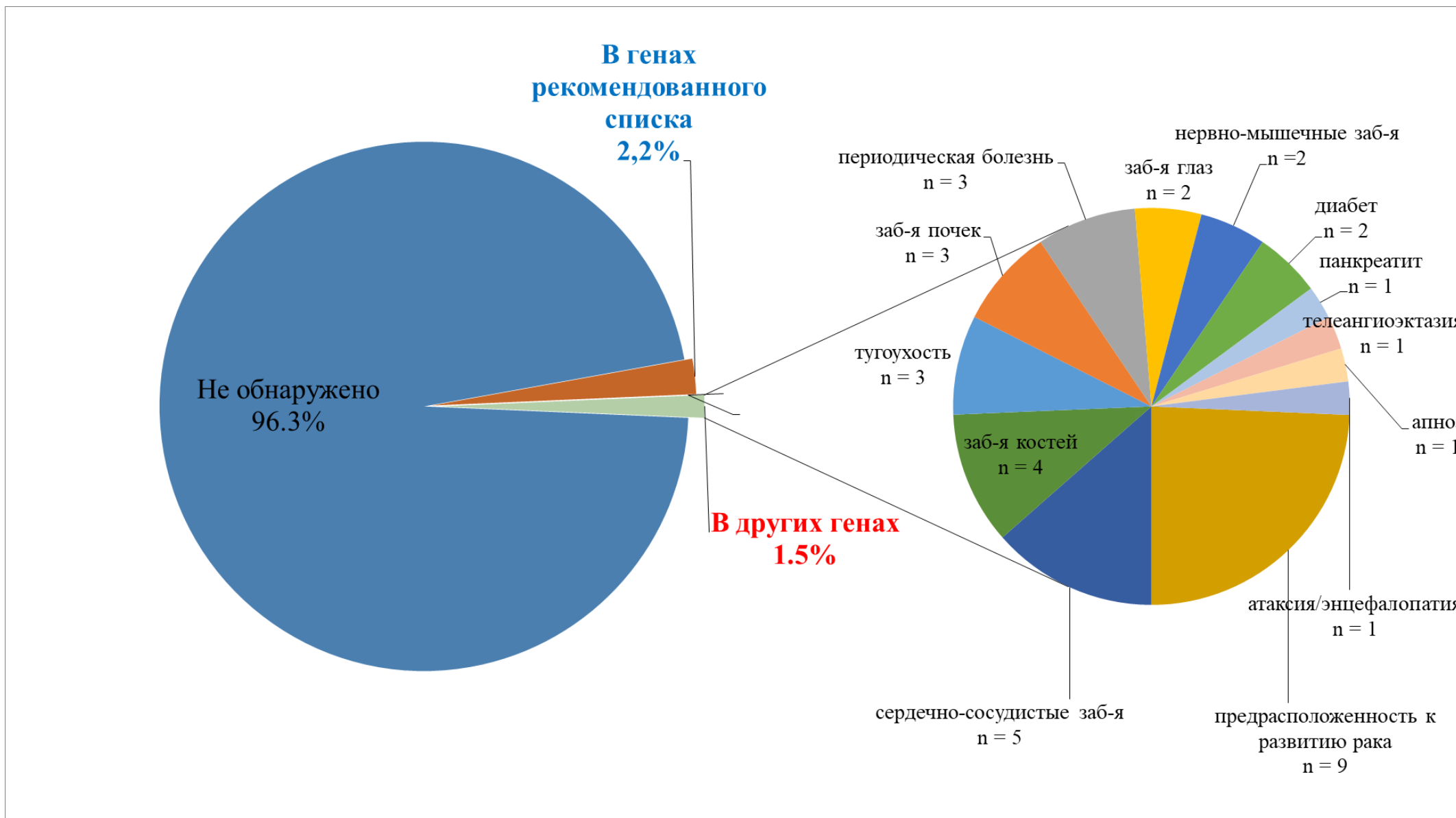
- **Определение:** патогенные и вероятно патогенные варианты, являющиеся причиной моногенных заболеваний, не связанных с направляющим диагнозом
- **ACMG** рекомендуют сообщать о патогенных и/или вероятно патогенных вариантах в **78** генах, мутации в которых приводят к заболеваниям, поддающимся лечению, **РОМГ** – в **69** генах

#### Medically Actionable Genes



\* By: Sarah Sharman, PhD,  
Science writer  
Illustrated by: Cathleen Shaw

### 3. Расширение списка вторичных находок



HCM <sup>g</sup>	1.0	603776	<i>PCSK9</i>	AD	All P and LP		
	1.0	115197	<i>MYBPC3</i>				
	1.0	613690	<i>TNNI3</i>				
	1.0	115196	<i>TPM1</i>				
	1.0	608751	<i>MYL3</i>				
	1.0	612098	<i>ACTC1</i>				
	1.0	600858	<i>PRKAG2</i>				
	1.0	608758	<i>MYL2</i>				
	LQTS types 1 and 2	1.0	192500	<i>KCNQ1</i>		AD	All P and LP
		1.0	613688	<i>KCNH2</i>			
LQTS3; Brugada syndrome	1.0	603830, 601144	<i>SCN5A<sup>b</sup></i>	AD	All P and LP		
LQTS types 14-16	3.2	616247	<i>CALM1<sup>g</sup></i>	AD	All P and LP		
		616249	<i>CALM2<sup>g</sup></i>	AD			
		618782	<i>CALM3<sup>g</sup></i>	AD			
Genes related to inborn errors of metabolism phenotypes							
Biotinidase deficiency	3.0	253260	<i>BTD</i>	AR	P and LP (2 variants)		
Fabry disease	1.0	301500	<i>GLA<sup>h</sup></i>	XL	All hemi, het, homozygous P and LP		
Ornithine transcarbamylase deficiency	2.0	311250	<i>OTC</i>	XL	All hemi, het, homozygous P and LP		
<b>Pompe disease</b>	<b>3.0</b>	<b>232300</b>	<b><i>GAA</i></b>	<b>AR</b>	<b>P and LP (2 variants)</b>		
Genes related to miscellaneous phenotypes							
Hereditary hemochromatosis	3.0	235200	<i>HFE</i>	AR	<i>HFE</i> p.C282Y <sup>i</sup> homozygotes only		
Hereditary hemorrhagic telangiectasia	3.0	600376	<i>ACVRL1</i>	AD	All P and LP		
	3.0	187300	<i>ENG</i>				
Malignant hyperthermia	1.0	145600	<i>RYR1<sup>j</sup></i>	AD	All P and LP		
	1.0	601887	<i>CACNA1S</i>				
Maturity-onset of diabetes of the young	3.0	600496	<i>HNF1A</i>	AD	All P and LP		
<b>RPE65-related retinopathy</b>	<b>3.0</b>	<b>204100, 613794</b>	<b><i>RPE65</i></b>	<b>AR</b>	<b>P and LP (2 variants)</b>		
Wilson disease	2.0	277900	<i>ATP7B</i>	AR	P and LP (2 variants)		
<b>Hereditary TTR amyloidosis</b>	<b>3.1</b>	<b>105210</b>	<b><i>TTR</i></b>	<b>AD</b>	<b>All P and LP</b>		

*AD*, autosomal dominant; *AR*, autosomal recessive; *DCM*, dilated cardiomyopathy; *HCM*, hypertrophic cardiomyopathy; *hemi*, hemizygous; *het*, heterozygous; *LP*, likely pathogenic; *LQTS*, long QT syndrome; *MIM*, Mendelian Inheritance of Man; *P*, pathogenic; *pLOF*, putative loss-of-function; *SD*, semidominant; *SF*, secondary finding; *TTR*, transthyretin; *XL*, X-linked.

### 3. Расширение списка вторичных находок

1. Есть ли необходимость расширять или использовать ACMG список?
2. Как часто обновлять?
3. По каким параметрам включать?
4. Кто будет курировать?



## **4. Необходимость подтверждения варианта альтернативными методами**

## 4. Необходимость подтверждения варианта альтернативными методами

Источник	
Американская коллегия медицинской генетики и геномики (ACMG)	Все каузативные варианты требуют валидации
Европейское общество генетики человека	NGS не следует внедрять в клиническую практику без валидации выявленных вариантов
Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования	Все варианты нуклеотидной последовательности, указанные в заключении больного, должны быть подтверждены секвенированием по Сэнгеру

## 4. Необходимость подтверждения варианта альтернативными методами

Источник	
Клинические рекомендации от 2020 года «Классическая фенилкетонурия и другие виды гиперфенилаланиемии»	Молекулярно-генетическая диагностика (ДНК-диагностика) может быть проведена» с использованием «полногеномного массового параллельного секвенирования с последующим подтверждением результатов методом секвенирования по Сенгеру
Клинические рекомендации от 2022 года «Эпилепсия и эпилептический статус у взрослых и детей»	Все выявленные варианты нуклеотидной последовательности требуют валидации
Клинические рекомендации от 2022 года «Гемолитико-уремический синдром (ГУС)»	При подозрении на атипичный ГУС и подготовке к трансплантации при любой форме тромботической микроангиопатии, приведшей к терминальной стадии хронической болезни почек, рекомендовано проведение молекулярно-генетического исследования методом секвенирования нового поколения (NGS) и секвенирования по Сэнгеру для идентификации генетических мутаций

## 4. Необходимость подтверждения варианта альтернативными методами

- Увеличение стоимости диагностики
- «Нагрузка» на лаборатории
- Увеличение времени окончательной постановки диагноза
- **Отсрочка терапии!**

## 4. Необходимость подтверждения варианта альтернативными методами (литературные данные WES – Sanger)

1. Zheng, J. *et al.* A comprehensive assessment of Next-Generation Sequencing variants validation using a secondary technology. *Mol Genet Genomic Med* **7**, e00748 (2019).
2. Sikkema-Raddatz, B. *et al.* Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum. Mutat.* **34**, 1035–1042 (2013).
3. Mu, W., Lu, H.-M., Chen, J., Li, S. & Elliott, A. M. Sanger Confirmation Is Required to Achieve Optimal Sensitivity and Specificity in Next-Generation Sequencing Panel Testing. *J. Mol. Diagn.* **18**, 923–932 (2016).
4. Nelson, A. C. *et al.* Criteria for Clinical Reporting of Variants from a Broad Target Capture NGS Assay without Sanger Verification. (2015).
5. Arteche-López, A. *et al.* Sanger sequencing is no longer always necessary based on a single-center validation of 1109 NGS variants in 825 clinical exomes. *Sci. Rep.* **11**, 5697 (2021).
6. Baudhuin, L. M. *et al.* Confirming Variants in Next-Generation Sequencing Panel Testing by Sanger Sequencing. *J. Mol. Diagn.* **17**, 456–461 (2015).
7. Beck, T. F., Mullikin, J. C., NISC Comparative Sequencing Program & Biesecker, L. G. Systematic Evaluation of Sanger Validation of Next-Generation Sequencing Variants. *Clin. Chem.* **62**, 647–654 (2016).

## 4. Необходимость подтверждения варианта альтернативными методами

FILTER=PASS,

QUAL  $\geq$  100,

DP  $\geq$  20X

allele frequency (AF)  $\geq$  0.2%



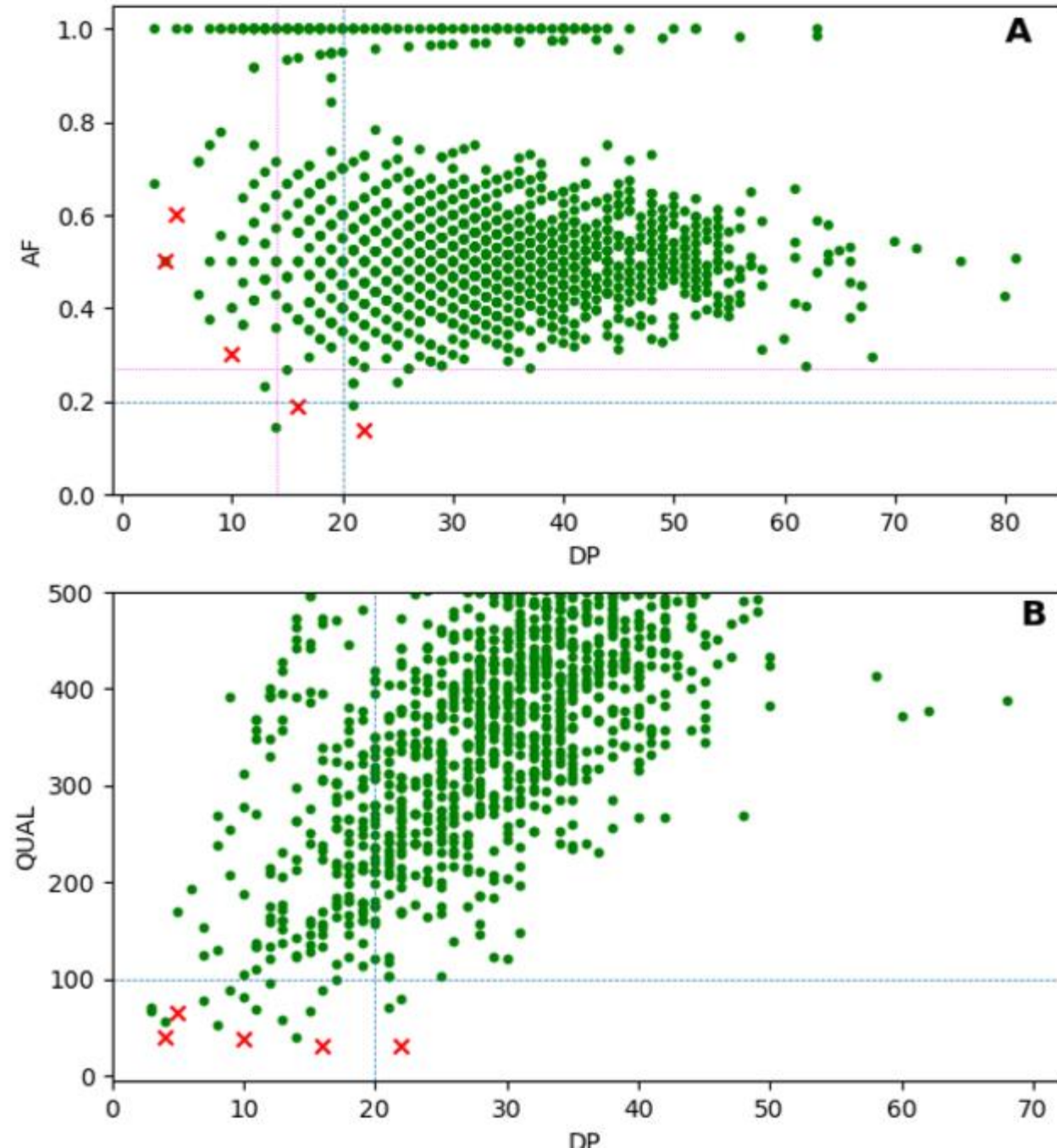
## 4. Необходимость подтверждения варианта альтернативными методами

### Sanger validation of WGS variants - when to?

Arina Kopernik<sup>1</sup>, Gaukhar Zobkova<sup>2</sup>, Natalia Doroschuk<sup>2</sup>, Anna Smirnova<sup>2</sup>, Daria Molodtsova-Zolotukhina<sup>2</sup>, Olesya Sagaydak<sup>2</sup>, Oxana Ryzhkova<sup>3</sup>, Sergey Kutsev<sup>3</sup>, Maria Vorontsova<sup>1</sup>, Eugene Albert<sup>1</sup>, Viktor Bogdanov\*<sup>1</sup>, Pavel Volchkov\*<sup>1</sup>,

\*corresponding author

В процессе публикации



## 4. Необходимость подтверждения варианта альтернативными методами

**Table 1.** Classification statistics based on different thresholds

Quality thresholds	“High quality” variants (unconfirmed variants)	“Low quality” variants (unconfirmed variants)	Sensitivity	Specificity	F1-score
FILTER = PASS QUAL > 100 DP > 20 AF > 0.2 <sup>8</sup>	1506 (0)	250 (5)	100%	2%	0.925
DP > 15 AF > 0.25	1657 (0)	99(5)	100%	5%	0.972
QUAL > 100	1735 (0)	21(5)	100%	23,8%	0.995

## 5. Заключение

## 5. Заключение

**Выносить в заключение варианты, согласно правилу:**

- При обнаружении **патогенных вариантов**, хорошо характеризующих фенотип пациента и не противоречащих типу наследования (1 вариант при заболевании с доминантным типом наследования, 2 и более в одном гене при АР и Х-сцепленном рецессивном типе наследования), в **заключении отражать только их**, другие выявленные варианты в заключении отражать не следует.
- При обнаружении **одного патогенного и одного и более вероятно патогенного** вариантов нуклеотидной последовательности в одном гене, хорошо характеризующих фенотип пациента, при заболевании с АР и Х-сцепленном рецессивном типе наследования, в **заключении отражать только их**, с пояснением о необходимости исследования цис-, транс-положения. Другие выявленные варианты в заключении отражать не следует.
- В остальных случаях отражать все выявленные варианты, относящиеся к группам патогенный, вероятно патогенный и неопределенного значения.

## 5. Заключение

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
TPP1	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). n/d = 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 208 кодоне (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 липофуциноза, 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)**

## 5. Заключение

# Но: Критерии ACMG/российские рекомендации

- Характеризуют «биологическую» значимость (патогенность) вариантов
- Не определяют «причинность» вариантов (носительство, рецессивные формы)
- Большинство вариантов попадает в категорию VOUS, даже если биоинформатик уверен в их причинности
- Так же в категорию VOUS попадают варианты формально «проходящие» по критериям.

## 5. Заключение

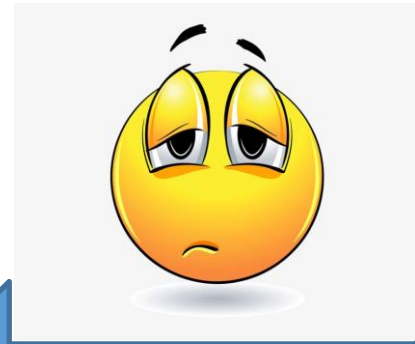
А если 1 патогенный вариант в AR?

А если 2 варианта в AR 1 из которых неопределенного значения?

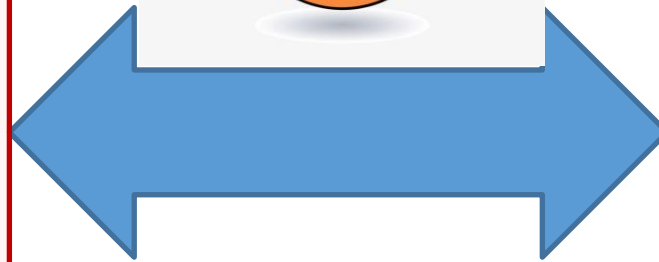


## 5. Заключение

фокус внимания врачей...



Патогенный вариант  
= причина  
заболевания



VOUS не имеют  
отношения к  
заболеванию

## 5. Заключение

Разделить варианты на 2 блока:

а) вероятно каузативные

- Доминантное наследование - 1 П/ВП в гетеро-
- Рецессивное наследование - 1 П/ВП в гомо-/геми-зиготном состоянии, П+П, П+ВП, ВП+ВП

б) варианты, имеющие возможное отношение к фенотипу

## Требования к качеству исследования:

- среднее покрытие при исследуемой области при секвенировании полного(WES)/«клинического» экзона и панелей генов должно быть не менее **x70**, полного генома (WGS) не менее **x30**.
- при исследовании WES/WGS/«клинического» экзона необходимо указывать **% областей с покрытием менее x10**.
- при исследовании панелей генов необходимо указывать **все регионы с покрытием менее x10**
- При обнаружении только **одного гетерозиготного варианта** при заболевании с рецессивным типом наследования при любом типе исследования необходимо указывать **все области гена с покрытием менее x10**.

**Презентация и рекомендации для правки:**

[https://docs.google.com/document/d/1\\_tFCEzjARo3dx3cTWFa-4BPLgOpf8Lh7xYpr2ncp5bw/edit?usp=sharing](https://docs.google.com/document/d/1_tFCEzjARo3dx3cTWFa-4BPLgOpf8Lh7xYpr2ncp5bw/edit?usp=sharing)

**Ngс.med-gen.ru**