



Школа анализа NGS данных MGNGS School'19  
Москва, 28.10—01.11.2019

# Составление заключения

А.В. Марахонов, к.б.н.,  
с.н.с. ФГБНУ «МГНЦ»

# Критерии ACMG

© American College of Medical Genetics and Genomics

**ACMG STANDARDS AND GUIDELINES**

**Genetics  
in Medicine**

## **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>2,16</sup>, Sherri Bale, PhD<sup>3</sup>, David Bick, MD<sup>4</sup>, Soma Das, PhD<sup>5</sup>, Julie Gastier-Foster, PhD<sup>6,7,8</sup>, Wayne W. Grody, MD, PhD<sup>9,10,11</sup>, Madhuri Hegde, PhD<sup>12</sup>, Elaine Lyon, PhD<sup>13</sup>, Elaine Spector, PhD<sup>14</sup>, Karl Voelkerding, MD<sup>13</sup> and Heidi L. Rehm, PhD<sup>15</sup>; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee

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

Рыжкова О.П.<sup>1</sup>, Кардымон О.Л.<sup>1</sup>, Прохорчук Е.Б.<sup>2</sup>, Коновалов Ф.А.<sup>3</sup>, Масленников А.Б.<sup>4</sup>, Степанов В.А.<sup>5</sup>, Афанасьев А.А.<sup>6</sup>, Заклязьминская Е.В.<sup>7</sup>, Ребриков Д.В.<sup>8</sup>, Савостьянов К.В.<sup>9</sup>, Готов А.С.<sup>10,11</sup>, Костарева А.А.<sup>12</sup>, Павлов А.Е.<sup>13</sup>, Голубенко М.В.<sup>5</sup>, Поляков А.В.<sup>1</sup>, Куцев С.И.<sup>1</sup>

# Заключение содержит 4 основных раздела

- Информация о пациенте и проведенном исследовании

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

**по результатам секвенирования ДНК**

**Пациент:**

**Пол:**

**Дата рождения:**

**Диагноз:**

*Данные секвенирования могут быть предоставлены по запросу лечащего врача.*

# Заключение содержит 4 основных раздела: результаты

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

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

3. Варианты с неизвестным клиническим значением, имеющие возможное отношение к фенотипу. Для уточнения статуса патогенности таких мутаций и их отношения к заболеванию у пациента могут потребоваться дополнительные исследования.

Ген	Положение (GRCh37/hg19)	Генотип	Экзон	Положение в кДНК	Замена АК	Частота аллеля*	Референсная последовательность	Глубина прочтения
KIF1B	chr1:10356666	C/T	18	c.1666C>T	p.(Arg556Cys)	0.0000203	NM_015074.3	67

4. Ранее описанные патогенные мутации, ассоциированные с другими значимыми моногенными заболеваниями.

Ген	Положение (GRCh37/hg19)	Генотип	Экзон	Положение в кДНК	Замена АК	Частота аллеля*	Референсная последовательность	Глубина прочтения
BRCA1	chr17:41276045	C/T/del	2	c.68_69 delAG	p.(Glu23Val fs*17)	0.0001987	NM_007294.3	110

\*Частоты аллелей приведены по базе [gnomAD](#) (выборка до 138632 человек). н/д = нет данных (не описан).

- Разделение вариантов по группам согласно классификации ACMG/ПОМГ
- Характеристика выявленных вариантов по качеству и аллельной характеристике
- Придерживаться единства номенклатуры вариантов согласно рекомендациям HGVS

# Заключение содержит 4 основных раздела: Интерпретация

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

У \_\_\_\_\_ был проведен поиск патогенных мутаций, ассоциированных с нервно-мышечными заболеваниями.

Обнаружен однонуклеотидный вариант NM\_015074.3(*KIF1B*\_v001):c.1666C>T (rs767848662), приводящий к несинонимичной замене p.(Arg556Cys) высоко консервативной позиции в ГНА домене (forkhead-associated) белка кинезина 1B KIF1B. Мутации в гене *KIF1B* описаны у больных болезнью Шарко — Мари — Тута 2A1 типа (OMIM #118210) с аутосомно-доминантным типом наследования. Вариант был зарегистрирован в базе данных gnomAD с частотой 0,00203% (5 пораженных хромосом из 246096), что может быть связано с неполной пенетрантностью гена или поздним началом заболевания. Биоинформатические алгоритмы предсказывают данный вариант как патогенный или вероятно патогенный (SIFT, Polyphen2, BadMutScore, LRT, MutationTaster, MutationAssessor, FATHMM, MetaSVM, MetaLR, M-CAP, CADD, DANN) или нейтральный (PROVEAN). По совокупности данных, вариант следует рассматривать как имеющий неизвестное клиническое значение согласно критериям PS4, PP3.

Кроме того, обнаружена ранее неоднократно описанная мутация в гетерозиготном состоянии NM\_007294.3(*BRCA1*\_v001):c.68\_69delAG (CD951600) в гене *BRCA1*, гетерозиготные мутации в котором ассоциированы с повышенным риском развития рака молочной железы (OMIM #604370) и других злокачественных новообразований [1, 2].

- Аллельное состояние
- Заболевание и тип наследования
- Если известен тип мутаций, приводящий к этому заболеванию — указать
- Частоты вариантов в базах данных
- Указать предсказанный эффект на белковую последовательность, если она может быть повреждена
- Результаты программ предсказания патогенности in silico, даже если эти программы предсказывают отсутствие эффекта.
- Другая доказательная база: ссылки на литературу с указанием того, описан ли вариант или нет, если ли рядом описанные варианты, затрагивает ли вариант тот или иной функциональный домен, консервативность позиции,

# Заключение содержит 4 основных раздела: Интерпретация

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

У \_\_\_\_\_ был проведен поиск патогенных мутаций, ассоциированных с нервно-мышечными заболеваниями.

Обнаружен однонуклеотидный вариант NM\_015074.3(*KIF1B*\_v001):c.1666C>T (rs767848662), приводящий к несинонимичной замене p.(Arg556Cys) высоко консервативной позиции в ГНА домене (forkhead-associated) белка кинезина 1B KIF1B. Мутации в гене *KIF1B* описаны у больных болезнью Шарко — Мари — Тута 2A1 типа (OMIM #118210) с аутосомно-доминантным типом наследования. Вариант был зарегистрирован в базе данных gnomAD с частотой 0,00203% (5 пораженных хромосом из 246096), что может быть связано с неполной пенетрантностью гена или поздним началом заболевания. Биоинформатические алгоритмы предсказывают данный вариант как патогенный или вероятно патогенный (SIFT, Polyphen2, BadMutScore, LRT, MutationTaster, MutationAssessor, FATHMM, MetaSVM, MetaLR, M-CAP, CADD, DANN) или нейтральный (PROVEAN). По совокупности данных, вариант следует рассматривать как имеющий неизвестное клиническое значение согласно критериям PS4, PP3.

Кроме того, обнаружена ранее неоднократно описанная мутация в гетерозиготном состоянии NM\_007294.3(*BRCA1*\_v001):c.68\_69delAG (CD951600) в гене *BRCA1*, гетерозиготные мутации в котором ассоциированы с повышенным риском развития рака молочной железы (OMIM #604370) и других злокачественных новообразований [1, 2].

- Аллельное состояние
- Заболевание и тип наследования
- Если известен тип мутаций, приводящий к этому заболеванию — указать
- Частоты вариантов в базах данных
- Указать предсказанный эффект на белковую последовательность, если она может быть повреждена
- Результаты программ предсказания патогенности *in silico*, даже если эти программы предсказывают отсутствие эффекта.
- Другая доказательная база: ссылки на литературу с указанием того, описан ли вариант или нет, если ли рядом описанные варианты, затрагивает ли вариант тот или иной функциональный домен, консервативность позиции...
- Совокупность критериев, которую набрал вариант.

# Заключение содержит 4 основных раздела: Интерпретация

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

**Рекомендовано подтверждение обнаруженных вариантов референсными методами.**

**Рекомендована консультация врача-генетика.**

**Результаты данного исследования могут быть правильно интерпретированы только врачом-генетиком.**

В отчёте не должны приводиться  
клинические рекомендации по ведению  
пациента!!

# Заключение содержит 4 основных раздела: описание исследования

Анализ ДНК пациента проведен на секвенаторе нового поколения Illumina NextSeq 500 методом парно-концевого чтения (2×151 п. о.) со средним покрытием не менее 70–100×. Для пробоподготовки была использована методика селективного захвата участков ДНК, относящихся к кодирующим областям генов.

Обработка данных секвенирования проведена с использованием автоматизированного алгоритма (алгоритм включает оценку качества секвенирования, выравнивание прочтений на референсную последовательность генома человека (GRCh37/hg19), постпроцессинг выравнивания, выявление вариантов и фильтрацию вариантов по качеству, а также аннотацию выявленных вариантов по всем известным транскриптам каждого гена из базы RefSeq с применением ряда методов предсказания патогенности замен (SIFT, PolyPhen2-HDIV, PolyPhen2-HVAR, MutationTaster, LRT, BMut), а также методов расчета эволюционной консервативности позиций (PhyloP, PhastCons). Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использованы выборки проектов «1000 геномов», ESP6500 и gnomAD. Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов использованы база данных OMIM, специализированные базы данных по отдельным заболеваниям (LOVD) и литературные данные.

В заключение включены только варианты, имеющие возможное отношение к клиническим проявлениям у пациента. Полиморфизмы, классифицированные по различным критериям как нейтральные, в заключение не включены.

Для названия выявленных вариантов использовалась номенклатура HGVS (представленная на сайте <http://varnomen.hgvs.org/>).

Ограничения методики: метод не позволяет выявлять инсерции и делеции длиной более 10 п.о., 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.

- 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).



# Заключение содержит 4 основных раздела: сведения о качестве

## СВЕДЕНИЯ О КАЧЕСТВЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

<b>Всего прочтений</b>	25474502	<b>Всего выявлено вариантов</b>	55519
<b>Длина прочтений</b>	35–140	<b>Вариантов после фильтрации по базовым критериям патогенности и оценки по клиническим критериям</b>	2
<b>Прочитано нуклеотидов</b>	3,3 млрд		
<b>Среднее покрытие</b>	83,9×		

Данные по покрытию генов (указаны участки нуклеотидной последовательности генов, которые не были проанализированы или были проанализированы частично. Список включает название гена, № экзона и название референсной последовательности (NM).).

# Заключение содержит 4 основных раздела: ссылки и базы данных

## **ССЫЛКИ НА ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ БАЗЫ ДАННЫХ И ЛИТЕРАТУРУ**

1. Struewing (1995) Am J Hum Genet 57: 1 PubMed: 7611277
2. Grinshpun (2018) Eur J Hum Genet 26: 382 PubMed: 29321669
3. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А., Афанасьев А.А., Заклязьминская Е.В., Костарева А.А., Павлов А.Е., Голубенко М.В., Поляков А.В., Куцев С.И. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS). Медицинская генетика. 2017;16(7):4–17.
4. <http://www.omim.org/>
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
6. <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>
7. <http://gnomad.broadinstitute.org/>

# Основной результат, который ждет врач — ЗАКЛЮЧЕНИЕ

----- Пересылаемое сообщение -----

От:

Кому:

Дата:

Тема: Результаты генетической диагностики

Здравствуйте, уважаемая Л |

В прикрепленном табличном файле список всех значимых мутаций, которые мы обнаружили при секвенировании экзона Вашего сына.

Сам по себе файл не несет клинически значимой информации. Опирайтесь только на результаты генетического теста нельзя. Мы проводим работу по изучению вклада каждой (!) обнаруженной мутации в клиническую картину, наблюдаемую у Вашего сына.

На текущий момент мы считаем наиболее вероятной причиной развития болезни мутацию в гене BBS1 (Bardet-Biedl syndrome 1) с координатой на хромосоме: chr8 10467581

Подробнее о гене Вы можете узнать здесь: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/582>

Этот файл может понадобиться Вам в дальнейшем. Сохраните его у себя там, где Вы храните медицинскую документацию.

Мы ждем Вас с супругом на консультацию.

# Основной результат, который ждет врач — ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хромосома	хромосомная координата	ген	референс	найденная мутация	тип мутации
chrX	135960146	AC=5;AF=0.313;AN=16;BaseQRank	G	GAA	frame shift
chr17	39340795	AC=16;AF=1.00;AN=16;DP=351;FS	ACGGCAGCAGCTGGACATA	A	frame shift
chr3	195508454	AC=4,2;AF=0.250,0.125;AN=16;Base	T	TC,TGGTGACATGAAGAGGGGTGG	frame shift
chr3	195511329	AC=7;AF=0.438;AN=16;BaseQRank	A	AGGGCTGGT	frame shift
chr7	100385561	AC=10;AF=0.625;AN=16;BaseQRank	GGCTTCAGCTACCGCTTGC	G	frame shift
chr17	48227403	AC=8;AF=1.00;AN=8;DP=5;FS=0.0	G	GGC	frame shift
chrX	122336600	AC=16;AF=1.00;AN=16;DP=995;FS	T	TG	frame shift
chr2	242035491	AC=1;AF=0.063;AN=16;BaseQRank	ATT	A	frame shift
chr11	1093567	AC=8;AF=0.500;AN=16;BaseQRank	A	AC	frame shift
chr4	103822482	AC=7;AF=0.438;AN=16;BaseQRank	AAC	A	frame shift
chr7	75914934	AC=16;AF=1.00;AN=16;DP=99;FS	G	GC	frame shift
chr12	974355	AC=9;AF=0.563;AN=16;BaseQRank	T	TC	frame shift
chr3	14561627	AC=15;AF=0.938;AN=16;BaseQRank	A	AG	frame shift
chr3	75790783	AC=8;AF=0.500;AN=16;BaseQRank	G	GGTCTCCAGCATCATGTCCCTGTAC	frame shift
chr22	23653975	AC=5;AF=0.313;AN=16;BaseQRank	T	TCCGG	frame shift
chr1	26671538	AC=8;AF=0.500;AN=16;BaseQRank	AGCAC	A	frame shift
chr9	33794797	AC=7;AF=0.438;AN=16;BaseQRank	TGA	T	frame shift
chr12	51740416	AC=6;AF=0.375;AN=16;BaseQRank	C	CG	frame shift
chr10	116931101	AC=16;AF=1.00;AN=16;DP=266;FS	C	CTT	frame shift
chr1	17085995	AC=6;AF=0.375;AN=16;BaseQRank	G	GC	frame shift
chr5	139931629	AC=6;AF=0.375;AN=16;BaseQRank	C	CG	frame shift
chr2	231193470	AC=1;AF=0.063;AN=16;BaseQRank	A	C	frame shift
chr12	86268183	AC=1;AF=0.063;AN=16;BaseQRank	T	C	frame shift
chr1	26671522	AC=7;AF=0.438;AN=16;BaseQRank	GAAATGAGGCATCA	G	frame shift
chr2	158958551	AC=1;AF=0.063;AN=16;BaseQRank	G	GA	frame shift
chr12	50745861	AC=9;AF=0.563;AN=16;BaseQRank	T	TGA	frame shift

•

•

•

Список из 316 вариантов

# Применение критериев ACMG 1

Таблица 1. Нуклеотидные замены, являющиеся наиболее вероятной причиной заболевания, другие выявленные нуклеотидные замены, описанные в международных базах данных, а также нуклеотидные замены, которые могут оказывать влияние на клиническую картину болезни.

Ген	Референсная последовательность	Экзон/интрон	Геномная координата (GRCh37)	Нуклеотидная замена	Аминокислотная замена	Оценка, согласно рекомендациям ACMG
SCN1A	NM_001165963.1	19	166872146	c.3521C>G (гетерозигота)	p.T1174S	Патогенная
ATM	NM_000051.3	12	108123551	c.1810C>T (гетерозигота)	p.P604S	Вероятно патогенная
ATM	NM_000051.3	29	108160480T	c.4388T>G (гетерозигота)	p.F1463C	Вероятно патогенная

# Применение критериев ACMG 2

## Заключение по секвенированию экзома

Анализ проведен методами секвенирования следующего поколения с использованием наборов для обогащения экзома Genotek Clinical Exome (Illumina Inc., США) и секвенирования ДНК производства Illumina (Illumina Inc., США). Биоинформатическая обработка данных произведена в соответствии с регуляциями ACMG (США). Референсная последовательность Human genome 19 (hg19) build 37.

### Обнаруженные вероятно патогенные нарушения:

Ассоциированные заболевания	Хромосома	Позиция в геноме	Ген	Экзон	Нуклеотидная замена	Амино-кислотная замена
#118200 CHARCOT-MARIE-TOOTH DISEASE, DEMYELINATING, TYPE 1B;	1	Chr1:10425470	KIF1B	41	c.4378G>A в гетерозиготном состоянии	p.Glu1460Lys (несинонимичная замена)
#117000 CENTRAL CORE DISEASE OF MUSCLE	19	Chr19:38965975	RYR1	29	c.4178A>G в гетерозиготном состоянии	p.Lys1393Arg (несинонимичная замена)