myExome

راهنمای پزشکان
Doctors' Guide

SAGENE
آزمایشگاه ژنتیک پزشکی ساژن

آزمایش myExome چیست؟

myExome آزمایش توالی‌یابی کامل اگزوم است که با استفاده از تکنولوژی توالی‌یابی نسل جدید (NGS) ، نواحی کد کننده اطلاعات مربوط به ساخت پروتئین حدود ۲۰۰۰۰ ژن شناخته‌شده در انسان را مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌دهد. این مناطق کد کننده که از آن نام برده شد اگزون و مجموعه اگزون‌ها اگزوم نامیده می‌شوند.

توالی‌یابی کامل اگزوم یک روش مقرون به صرفه برای مطالعه تغییرات ژنتیکی دخیل در بیماری‌های ارثی، اختلالات اسپورادیک و همین طور سرطان است. همچنین این روش یک جایگزین معتبر برای توالی‌یابی کامل ژنوم است بالاخص زمانی که محدودیت مالی برای بیمار وجود دارد. در انسان تنها ۱ تا ۳ درصد از ژنوم ، قطعات کدکننده پروتئین یا اگزونی هستند که ۸۵% از جهش‌های بیماری‌زا در آن یافت شده‌اند. بنابراین توالی اگزونی، به طور چشمگیری از نیاز به توالی‌یابی باقی ۹۷% ژنوم می‌کاهد و تجزیه و تحلیل گسترده بسیاری از نمونه‌ها را بدون نیاز به پرداخت هزینه گزاف ممکن می‌سازد.

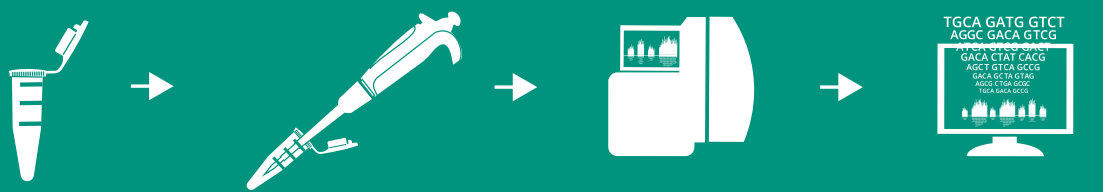
تکنولوژی به کار رفته در myExome

در آزمایش myExome از بهترین و جدیدترین تکنولوژی‌های آزمایشگاهی استفاده می‌شود. فرایند آزمایشگاهی توالی‌یابی اگزوم شامل دو قسمت اصلی جداسازی قطعات DNA مربوط به اگزون‌ها از بقیه ژنوم و توالی‌یابی قطعات جداسازی شده می‌باشد. نوع تکنولوژی مورد استفاده در هر یک از این قسمت ها تأثیر مستقیم در دقت تعیین جهش‌های ژنتیکی در مرحله آنالیز داده ها دارد.

جداسازی قطعات اگزونی

در آزمایش myExome برای جداسازی قطعات اگزونی از پروب‌های طراحی‌شده اختصاصی آزمایشگاه ساژن که علاوه بر مناطق کد کننده پروتئین، جهش های شناخته‌شده بیماری زا در نواحی غیر کد کننده پروتئین راهم پوشش می دهند استفاده می‌شود. این پروبها همچنین DNA میتوکندریال را هم پوشش می‌دهند. لازم به ذکر است که تمامی مراحل جداسازی قطعات DNA اگزون‌ها در آزمایش myExome با استفاده از ربات‌های دقیق و پیشرفته آزمایشگاهی انجام می‌شود که میزان خطا در انجام فرایند و جابه جایی نمونه ها را به حداقل ممکن می رساند.

تضمین کیفیت در هر مرحله از آزمایش



استخراج DNA

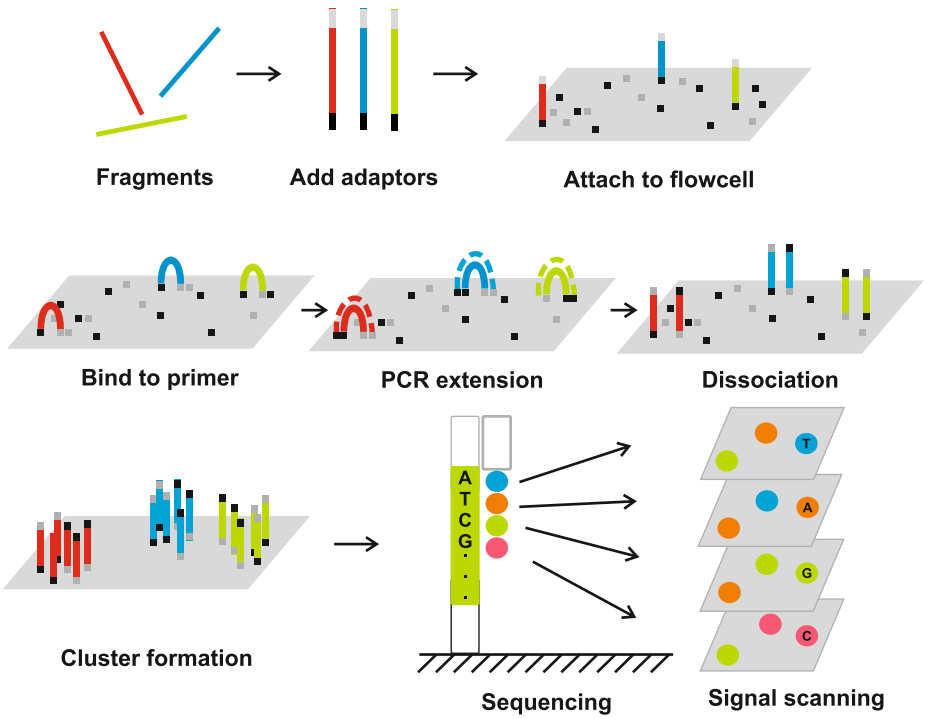
آماده سازی کتابخانه ژنی

توالی یابی

آنالیز داده ها

توالی یابی

توالی‌یابی DNA در آزمایش myExome با استفاده از بروزترین دستگاه‌های توالی‌یابی DNA نسل جدید (NGS) شرکت Illumina آمریکا انجام می‌شود (شکل ۱). در این روش میلیاردها رشته DNA به طور همزمان توالی‌یابی شده و سپس محل هر یک بوسیله مطابقت با ژنوم انسانی مرجع تعیین می‌گردد. طول رشته های توالی‌یابی شده در آزمایش myExome برابر ۱۵۰ نوکلئوتید است که موجب تطابق صحیح‌تر با ژنوم مرجع و در نهایت دقت بالاتر در تعیین جهش‌های ژنی می‌گردد.



شکل ۱: توالی یابی نسل جدید در آزمایش myExome با استفاده از دستگاه Illumina آمریکا. این روش شامل تهیه کتابخانه اگزونی، ایجاد خوشه DNA، واکنش مرحله‌ای توالی‌یابی DNA و عکس برداری پس از هر مرحله از واکنش است.

عمق خوانش

عمق خوانش در تکنولوژی توالی‌یابی DNA نسل جدید (NGS) عبارت است از تعداد دفعاتی که هر قسمت مورد نظر از ژنوم توالی‌یابی می‌شود. هر چه عمق خوانش بالاتر باشد دقت تعیین جهش‌های ژنتیکی موجود در ژنوم بیشتر خواهد بود. بر همین اساس آزمایش myExome با میانگین عمق خوانش 100x و یا 200x انجام می‌شود.

آنالیز داده‌های آزمایش myExome

آنالیز داده‌های آزمایش myExome توسط مجرب ترین اساتید آنالیز داده‌های توالی یابی DNA نسل جدید و با استفاده از پیشرفته ترین نرم افزارهای موجود در کنار بروزترین پایگاه های داده های ژنومیک به شرح زیر انجام می گردد:

- فیلتر کردن جهش‌های ژنتیکی با کیفیت غیرقابل قبول که به احتمال زیاد جهش‌های مثبت کاذب می‌باشند
- تفسیر بیش‌از ۲۰ هزار جهش باقی‌مانده با کیفیت قابل قبول به لحاظ محل قرارگیری آنها نسبت به ژن‌ها و تاثیر آن‌ها بر ترجمه پروتئین‌های مربوطه
- تعیین شیوع تمامی جهش‌های اگزومی یافت شده در نمونه مورد بررسی، در جمعیت‌های مختلف بر اساس پایگاه‌های داده ژنومیک ایرانوم، gnomAD و 1000 Genomes
- پیش بینی عملکرد جهش‌های تغییر آمینواسید (missense) با استفاده از مجموعه‌ای از الگوریتم‌ها مثل PolyPhen، SIFT و CADD
- گزارش Ada Score و RF Score برای پیش بینی عملکرد جهش‌های حد فاصل اگزون‌ها و اینترون‌ها (Splicing Sites) بر ترکیب اگزون‌ها برای ترجمه پروتئین با استفاده از پایگاه داده dbscSNV
- تفسیر تاثیر بالینی جهش‌های یافت شده در نمونه مورد نظر توسط آزمایشگاه‌های معتبر دنیا براساس پایگاه داده ClinVar
- محاسبه عمق پوشش برای آخرین نسخه مورد توافق توالی‌های کد کننده پروتئین (CCDS) ژنوم انسان
- محاسبه عمق پوشش برای هر اگزون
- محاسبه عمق پوشش برای هر ژن
- تفسیر تاثیر بالینی بیش از ۲۰ هزار جهش یافت‌شده در نمونه مورد بررسی بر اساس دستورالعمل کالج ژنتیک پزشکی آمریکا (ACMG) و طبقه‌بندی هر جهش به یکی از پنج دسته بیماری‌زا (Pathogenic)، احتمالا بیماری‌زا (Likely Pathogenic)، با تاثیر نامشخص (Uncertain Significance, VUS)، احتمالا غیر بیماری‌زا (Likely Benign) و غیر بیماری‌زا (Benign)
- تعیین بیماری‌های شناخته‌شده برای ژن‌های مربوط به هر جهش یافت‌شده بر اساس پایگاه داده بیماری‌های مندلین انسان (OMIM)
- آنالیز داده‌های توالی DNA اگزومی برای تعیین حذف و اضافه‌های بزرگ (CNV)
- تفسیر محل قرارگیری حذف و اضافه‌های بزرگ (CNV) نسبت به ژن‌ها و اگزون‌های آن‌ها
- تفسیر تاثیر بالینی حذف و اضافه‌های بزرگ (CNV) یافت‌شده در نمونه مورد نظر توسط آزمایشگاه‌های معتبر دنیا بر اساس پایگاه داده ClinVar
- تفسیر حذف و اضافه‌های بزرگ (CNV) یافت‌شده در نمونه مورد بررسی بر اساس پایگاه داده ClinGen که شامل حذف و اضافه‌های بزرگ (CNV) گزارش‌شده در بیماران با عقب ماندگی ذهنی و رشدی، اوتیسم و سایر آنومالی‌های مادرزادی می‌باشد
- تعیین بیماری‌های شناخته‌شده برای ژن‌های مربوط به هر حذف و اضافه بزرگ (CNV) یافت‌شده بر اساس پایگاه داده بیماری‌های مندلی انسان (OMIM)
- تعیین جهش‌های کاندید عامل بیماری‌زایی در نمونه مورد بررسی براساس علائم بالینی بیمار و با استفاده از بروزترین الگوریتم‌های فراگیری ماشینی (Machine Learning)
- گزارش یافته‌های ثانویه در ۵۹ ژن با اهمیت بالینی براساس توصیه کالج ژنتیک پزشکی آمریکا (ACMG)

محدودیت‌های آزمایش

- عدم تشخیص وارونگی‌های پیچیده
- عدم تشخیص جابه جایی‌های متعادل
- عدم تشخیص اختلالات توالی‌های تکراری
- عدم تشخیص قطعی موزاییسم‌های با درصد پایین
- عدم تشخیص قطعی درج/حذف‌های بیش از 50bp
- عدم تشخیص قطعی واریانت‌های موجود در سودوژن‌ها
- حساسیت محدود برای یافتن واریانت‌هایی که توالی محل قرارگیری آن‌ها با مناطق سودوژن مشابهت بسیار دارند

Sagene Medical Genetics Laboratory
7 Barmak Alley, Alvand St., Argantin Sq.,Tehran, Iran
Tel: 021 - 88662469
Website: www.sagene.ir

Name: sample

Accession ID:

DOB: ..../../..
Sex: **Female**
Race/Ethnicity: **Iranian**
Family #:

Referring facility: sample
Referring physician: sample
Copies to:

Specimen: **Blood**
Date of Collection: **2/20/2019**
Date of Receipt: **2/22/2019**
Date of Report: **5/17/2019**

Test(s) Performed: **Whole Exome Sequencing**
Indication for test: **Having a child with Hurler syndrome**

RESULT: Positive
Findings explain proband's child phenotype.

APPROACH

Sequencing of whole exome was done using Next Generation Sequencing and the data was analyzed to identify both previously classified and novel variants in all known human genes. Note that this test cannot exclude the possibility of variants in genes not analyzed or assayed with incomplete coverage.

VARIANTS RELEVANT TO INDICATION FOR TESTING

One pathogenic variant in IDUA was identified in this individual. No other variants of relevance to the indication were identified. Please see below for more detailed variant information.

Gene & Transcript	Variant	Allele State	Location	Disorder or Phenotype	Inheritance	Classification
IDUA NM_000203.4	c.502G>T p.Gly168Ter	Het.	Exon 5	Hurler Syndrome (Mucopolysaccharidosis type I)	Autosomal Recessive / Homozygous	Pathogenic

OTHER VARIANTS OF MEDICAL SIGNIFICANCE (INCIDENTAL FINDINGS)

Incidental findings are variants of medical significance that are not associated with the individual's reported indication. Please note that the presence of pathogenic variants in genes with incomplete coverage or in genes not examined cannot be fully excluded.

Monogenic Disease Risk

There were NO monogenic disease risk variants identified in this individual in genes unrelated to this individual's clinical presentation. Please see limitations for more detail.

Carrier Status

There were NO variants inferring a carrier status of a recessive disorder identified in this individual in genes unrelated to this individual's clinical presentation. Please see limitations for more detail.

RECOMMENDATIONS

The interpretation of these results should be done in the context of a patient's medical record and family history. Please note that interpretation and classification of the variants reported here may change over time. Please see a genetic counselor for services regarding the implications of these results in the context of understanding the implications of incidental findings, family planning and the informing of family members of potentially shared genetic outcomes.

DETAILED VARIANT INFORMATION (VARIANTS RELEVANT TO INDICATION FOR TESTING)

Gene & Transcript	Variant	Allele State	Location	Disorder or Phenotype	Inheritance	Classification
IDUA NM_000203.4	c.502G>T p.Gly168Ter	Het.	Exon 5	Hurler Syndrome (Mucopolysaccharidosis type I)	Autosomal Recessive / Homozygous	Pathogenic
Genomic Position				**Variant Frequency**		
Chr4:NC_000004.11:g.995264G>T				Not identified in large population studies		
VARIANT INTERPRETATION: The stop gained p.G168Ter in IDUA (NM_000203.4) has not been reported previously as a pathogenic variant nor as a benign variant, to our knowledge. The p.G168Ter variant is novel (not in any individuals) in gnomAD Exomes and is novel (not in any individuals) in 1000 Genomes.This variant is predicted to cause loss of normal protein function through protein truncation. The p.G168Ter variant is a loss of function variant in the gene IDUA, which is intolerant of Loss of Function variants, as indicated by the presence of existing pathogenic loss of function variant NP_000194.2:p.Met1Leu and 25 others. There are 27 downstream pathogenic loss of function variants, with the furthest variant being 470 residues downstream of the variant p.G168Ter. The patient's phenotype or family history is highly specific for a disease with a single genetic etiology. For these reasons, this variant has been classified as Pathogenic.						

METHODOLOGY

The individual's DNA was extracted and fragmented, with fragments from the coding regions of all known human genes targeted for amplification and sequencing. Agilent SureSelect V7 was used for target enrichment and illumina NovaSeq sequencer was used for generating paired-end sequencing of 150bp for each sequence read. Reads from the sequence output were aligned to the human reference genome (GRCh37) using the Burrows-Wheeler Aligner (BWA). Variants to the reference were called using the Genomic Analysis Tool Kit (GATK). The variants were annotated and filtered using the ACMG guidelines for interpretation of sequence variants. This includes comparison against the gnomAD population catalog of variants in 123,136 exomes, the 1000 Genomes Project Consortium's publication of 2,500 genomes, the NCBI ClinVar database of clinical assertions on variant's pathogenicity and multiple lines of computational evidence on conservation and functional impact.

یافته‌های ثانوی

کالج ژنتیک پزشکی آمریکا (ACMG) توصیه کرده است تا همزمان با توالی‌یابی کامل اگزوم و یا ژنوم، مجموعه ای از ۵۹ ژن نیز مورد بررسی قرار داده شوند. این ژن‌ها از لحاظ پزشکی، کاربردی بوده و دستورالعمل‌های بالینی و مدیریتی برای شرایط مرتبط با آن‌ها وجود دارد. فرد بیمار و یا والدین او می‌توانند گزارش یافته‌های ثانوی را درخواست نمایند. چنانچه واریانتی در این دسته از ژن‌ها به‌عنوان عامل بیماری‌زا یا احتمالا بیماری‌زا شناسایی شود، به صورت "یافته های ثانویه" در صورت انتخاب حالت سوم آنالیز داده‌ها گزارش خواهد شد. بیماران و اعضای خانواده این حق را دارند تا در زمان درخواست انجام آزمایش انتخاب کنند که آیا می خواهند از این یافته‌های ثانویه مطلع شوند یا خیر.

اندیکاسیون جهت انجام آزمایش myExome

آزمایش myExome توسط پزشک متخصص درخواست داده می‌شود و باید با فرم رضایت‌نامه و اطلاعات بالینی دقیق همراه باشد. به‌طور کلی، زمانیکه سابقه پزشکی و یافته‌های بالینی حاکی از یک بیماری ژنتیکی باشد، انجام این آزمایش توصیه می‌شود. جهت کاهش هزینه انجام آزمایش myExome، معمولا این آزمایش فقط برای بیمار اصلی انجام می‌شود ولی در صورت تمکن مالی خانواده بیمار، توصیه به انجام همزمان این آزمایش بر روی پدر و مادر بیمار و همچنین فرد مبتلای دیگر خانواده با بیماری مشابه با بیمار اصلی می‌شود. بدین وسیله شانس موفقیت در پیدا کردن جهش بیماری‌زا در خانواده بالاتر خواهد بود.

به‌طور معمول آزمایش myExome برای موارد زیر کاربرد دارد:

- بیمار یک اختلال ژنتیکی با تعدد ژن‌های بیماری زا دارد به این معنی که این بیماری می‌تواند توسط تعداد زیادی از ژن‌های مختلف ایجاد شود.
- بیمار یک اختلال ژنتیکی پیچیده و نامشخص با اختلالات بالینی متعدد دارد.
- بیمار یک اختلال ژنتیکی مشکوک دارد که برای تشخیص آن یک آزمایش ژنتیکی خاص در دسترس نیست.
- بیمار قبلا آزمایشات متعدد ژنتیکی انجام داده است اما علت بیماری همچنان ناشناخته است.
- ارائه مشاوره ژنتیک برای زوج های سالمی که ارتباط فامیلی باهم دارند و می‌خواهند در مورد احتمال تولد کودک با بیماری ژنتیکی اطلاعات بیشتری کسب نمایند.

مدت جوابدهی

جواب آزمایش myExome طی ۱۰ تا ۱۲ هفته در دسترس خواهد بود.

SAGENE
آزمایشگاه ژنتیک پزشکی ساژن

تهران، میدان آرژانتین، خیابان الوند،
بن بست برمک، پلاک ۷ طبقه ۳

۰۲۱-۸۶۰۸۱۴۸۲، ۰۲۱۸۶۰۸۵۳۱۷
info@sagene.ir
www.sagene.ir