

**ПРАВИТЕЛЬСТВО МОСКВЫ
ДЕПАРТАМЕНТ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ**

СОГЛАСОВАНО

Главный внештатный специалист
по клинической лабораторной
диагностике Департамента
здравоохранения города
Москвы


_____ А.Н. Цибин
« ____ » _____ 2023 г.

РЕКОМЕНДОВАНО

Экспертным советом по науке
Департамента здравоохранения
города Москвы № 9



« 04 » АВГУСТА _____ 2023 г.

**ВРЕМЕННОЕ РУКОВОДСТВО ПО ВНЕДРЕНИЮ NGS –
ТЕСТИРОВАНИЯ В ПРАКТИКУ КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ
ЛАБОРАТОРИЙ ДЗМ**

Методические рекомендации № 35

Москва 2023

УДК 57.089:614.2

ББК51.1

В81

Организация-разработчик: Государственное бюджетное учреждение города Москвы «Научно - исследовательский институт организации здравоохранения и медицинского менеджмента Департамента здравоохранения города Москвы»

Составители: кандидат биологических наук М.Ф. Латыпова, А.Н. Цибин, А.Г. Комаров, Е.А. Слуцкий, кандидат медицинских наук Н.А. Бодунова, врач - медицинский генетик, врач – лабораторный генетик А.М. Данишевич.

Рецензенты:

Демикова Наталья Сергеевна, главный внештатный специалист по медицинской генетике города Москвы, заведующий кафедрой медицинской генетики ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, гл. науч. сотр. отдела информационных технологий и мониторинга врожденных пороков развития ОСП НИКИ педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева ФГАОУ ВО РММУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, доктор медицинских наук.

Цуканов Алексей Сергеевич, главный научный сотрудник отдела лабораторной генетики ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России, доктор медицинских наук.

Никитин Алексей Георгиевич, заведующий лабораторией генетики ФНКЦ ФМБА России, кандидат биологических наук.

Временное руководство по внедрению ngs – тестирования в практику клинико-диагностических лабораторий ДЗМ: методические рекомендации / составители: М.Ф. Латыпова, А.Н. Цибин, А.Г. Комаров [и др.]. – М.: ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ», 2023. – 107 с.

Предназначение

Данные методические рекомендации предназначены в помощь: врачам клинической лабораторной диагностики, врачам-лабораторным генетикам, врачам-генетикам, врачам-инфекционистам, врачам-кибернетикам, врачам-лаборантам, биологам, медицинским физикам, биофизикам, химикам-экспертам, биохимикам и др. врачам-специалистам, в соответствии с Приложением приказа МЗ РФ от 2 мая 2023 г. №205-н «Об утверждении Номенклатуры должностей медицинских работников и фармацевтических работников» медицинских организаций, подведомственных Департаменту здравоохранения города Москвы, выполняющим на своей базе молекулярно-генетические исследования с применением технологий секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) ДНК, в качестве образовательного ресурса для

обеспечения качественных результатов, их интерпретации и сообщении о вариантах, обнаруженных в ходе выполнения анализов NGS.

Документ составлен на основе зарубежных стандартов и рекомендаций для клинико-диагностических и молекулярно-генетических лабораторий, выполняющих геномное секвенирование с помощью оценки целевых генных панелей, экзона и генома. В настоящем руководстве рассмотрены вопросы, важные для разработки любого теста NGS, без подробного рассмотрения конкретных технологий, тестовых приложений или характеристик, уникальных для конкретной платформы, отсутствует фокус на тестирование, связанное с соматической изменчивостью и другими смешанными популяциями клеток, РНК-секвенирование или на обнаружение циркулирующей ДНК плода. Представленная точка зрения обобщает и определяет некоторые ограничения и возможности, которые необходимо учитывать при внедрении анализов NGS в клиническую практику для улучшения здоровья населения.

Представленные методические рекомендации распространяются в качестве временного руководства для медицинских организаций, подведомственных Департаменту здравоохранения города Москвы.

Данный документ является собственностью Департамента здравоохранения города Москвы и не подлежит тиражированию и распространению без соответствующего разрешения.

За представленные данные в методических рекомендациях авторы несут персональную ответственность

ISBN

© Департамент здравоохранения города Москвы, 2023
© ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ», 2023
© Коллектив авторов, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	5
ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	6
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	16
ВВЕДЕНИЕ.....	18
1. Общие положения.....	19
2. Клинический диагноз и NGS	20
3. Мутации их отношение к болезни	21
4. Прогностическая способность теста NGS.....	23
5. Общие черты клинико-диагностического рабочего процесса NGS	24
6. Виды NGS-анализов, применяемых в клинической практике	26
7. Технологии секвенирования нового поколения	29
РЕКОМЕНДАЦИИ	31
1. Нормативные требования	31
2.1. Общие требования к лабораториям	32
2.2. Требования к специалистам, выполняющим NGS	33
2.3. Порядок от заказа до получения результата клинического	34
геномного секвенирования	34
3. Рекомендации по проведению процедур, предшествующих внедрению NGS в клиническую практику лаборатории	35
4. Разработка и проверка теста	40
5. Рекомендации для клинико-диагностических и молекулярно-генетических лабораторий по техническим процедурам NGS	58
6. Рекомендации по организации клинико-диагностического секвенирования с помощью целевого анализа панелей генов/ WES.....	72
7. Рекомендации организации клинико-диагностического секвенирования с помощью WGS/WES.....	79
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	86
ВЫВОДЫ.....	87
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	87
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	97
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	102
ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....	106

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

При разработке использованы действующие нормативные документы:

1. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 18 мая 2021 г. N 464н "Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований" (с изменениями и дополнениями), вступил в силу с 1 сентября 2021 года и действует до 1 сентября 2027 года.
2. Приказ Минздрава России от 23.11.2021 N 1088н «О внесении изменений в приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 18 мая 2021 г. N 464н Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований (Зарегистрировано в Минюсте России 30.11.2021 N 66103)», Стандарт оснащения клиничко-диагностической лаборатории 3 уровня А. Основное оборудование, Молекулярно-генетические исследования; "Приложение N 8 к Правилам проведения лабораторных исследований, утвержденным приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 18 мая 2021 г. N 464н, Стандарт оснащения микробиологической лаборатории.
3. Приказ Минздрава РФ от 21.04.2022 N 274Н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи пациентам с врожденными и (или) наследственными заболеваниями» (редакция от 21.04.2022 - действует с 31.12.2022), Приложение 3 «Стандарт оснащения медико-генетической консультации (Центра), 8. Стандарт оснащения молекулярно-генетической лаборатории.
4. ГОСТ Р 58505—2019/ ISO/TS 20428: 2017 ИНФОРМАТИЗАЦИЯ ЗДОРОВЬЯ (Элементы данных и их метаданные для описания структурированной информации о клиническом геномном секвенировании в электронных медицинских картах).
5. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2021 г. N 4 "Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней" (с изменениями и дополнениями), введены в действие с 1 сентября 2021 г. и действуют до 1 сентября 2027 г..
6. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности».

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем документе применяют следующие термины с соответствующими определениями:

APC (Adenomatous Polyposis Coli Gene) - ген-супрессор опухоли, ответственный за выработку аденоматозной полипозной палочки (APC), большого многофункционального белка, подавляющего опухоль, который действует как "привратник" для предотвращения развития опухолей; регулирует β -катенин, белок, играющий решающую роль в клеточной коммуникации, передаче сигналов, росте и контролируемом разрушении, но который, оставленный неконтролируемым, также приводит к многочисленным раковым заболеваниям).

BRCA1/BRCA2 (Breast Cancer1/Breast Cancer2) - названия двух генов, отвечающих за репарацию ДНК при повреждении и уничтожение поврежденных клеток; иногда в этих генах присутствуют мутации, что свидетельствует о повышенном риске развития рака молочной железы, яичников, простаты, поджелудочной железы и меланомы; эти мутации могут передаваться по наследству.

ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) – база данных вариантов нуклеотидной последовательности; архив отчетов о взаимосвязях между генетическими вариантами ДНК человека и фенотипом с подтверждающими данными; варианты классификаций доступны для неограниченного использования в сообществе через ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)

CNV (Copy Number Variation) вариация числа копий - вариант числа копий одного участка ДНК или более; сегмент ДНК, в котором количество ее копий различается, относят к структурным вариантам генома (SV), которые чаще всего представляют собой крупные делеции и дупликации; размер отличия в последовательностях ДНК может варьироваться от 1 тыс. до нескольких млн. нуклеотидов, их обнаруживают путем сравнения 2 и более геномов между собой; вариации числа копий могут приводить к развитию заболеваний, однако, точный процент связанных с заболеваниями вариаций пока трудно рассчитать; некоторые виды рака связаны с повышенным числом копий определенных генов.

de novo (от латин. – «заново») - генетическое изменение, возникшее в организме впервые, не унаследованное от родителей; термин может применяться как к однонуклеотидным генетическим вариантам, так и к целым генам; если пациент имеет выявленную *de novo* мутацию, то это значит, что она возникла в его организме впервые; для подтверждения статуса мутации *de novo*, врач-генетик назначает проведение генетического исследования обоим родителям пациента.

ES (Exome Sequencing), экзомное секвенирование - исследование кодирующих и прилегающих интронных областей генома, требующее обогащения этих областей методами захвата или амплификации.

GA4GH (Global Alliance for Genomics and Health), Глобальный альянс по геномике и здоровью - международный консорциум, разрабатывающий стандарты ответственного сбора, хранения, анализа и обмена геномными данными с целью создания «Интернета геномики».

Gene panel, генетическая панель - методика секвенирования целевых (таргетных) генов; исследует выбранный экспертами набор генов, связанных с определенным фенотипом или показаниями; разновидность глубокого секвенирования ПЦР-продуктов для анализа генетических вариантов в определенных генах и регионах генома; позволяет получить и проанализировать не такой большой объем данных, как полногеномное (WGS) или полноэкзомное (WES) секвенирование; врач-генетик может назначить пациенту проведение таргетного секвенирования при подозрении на наследственное моногенное, онкологическое или др. заболевание.

GS (Genome Sequencing), секвенирование генома - определение порядка нуклеотидов ДНК или оснований в геноме — порядка As, Cs, Gs и Ts, составляющих ДНК организма; геном человека состоит из более чем 3 миллиардов этих генетических букв.

GUS (Gene of Uncertain Significance), ген неопределенной значимости - ген, идентифицированный посредством секвенирования генома, но связь которого с заболеванием человека не установлена.

GWAS (Genome-Wide Association Study), полногеномный поиск ассоциаций - тестирование, основанное на ассоциациях между генетическими полиморфизмами, равномерно распределенными по всему геному, и заболеванием; для GWAS обычно сравнивают геномы людей с какими-то фенотипическими признаками (например, признаками определенного заболевания) с геномами людей из контрольной группы (т.е. здоровых людей, не имеющих признаков данного заболевания), в результате выявляют однонуклеотидные генетические варианты, обуславливающие риск развития заболеваний или эффект ответа организма на лекарственные препараты, что важно для фармакогенетических исследований.

HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) - комитет Организации по геному человека (HUGO), устанавливающий стандарты для номенклатуры генов человека; утверждает уникальные и значимые имена для всех известных человеческих генов на основе опроса экспертов; в дополнение к длинным названиям, HGNC также указывает аббревиатуру (*символы*) для каждого гена; HGNC является частью международной организации по изучению генома человека (HUGO).

HGVS (Human Genome Variation Society) - общество по изучению вариаций генома человека, создавшее список из тысяч баз данных, предоставляющих варианты аннотации на конкретные разновидности человеческой вариации; единая номенклатура, рекомендуемая мировым сообществом к использованию.

indel , вставка-делеция - вставка или/и делеция.

insertion, вставка - добавление одной или нескольких пар нуклеотидных оснований в последовательность ДНК.

In silico - компьютерные предсказательные программы; применяют, если вариант не был описан в литературе ранее и не представлен ни в одной из баз данных или сведения о нем недостаточны для решения о значимости варианта используют результаты программ предсказаний патогенности.

inversion, инверсия - хромосомная перестройка, при которой сегмент хромосомы меняется из конца в конец.

Matchmaker Exchange – база данных, собирающая доказательства новых взаимосвязей между генами и редкими заболеваниями; данные о случаях часто хранятся в изолированных базах данных, поэтому в рамках проекта была разработана федеративная платформа (Exchange), чтобы помочь подобрать людей с редкими заболеваниями с одинаковыми генами-кандидатами и схожими фенотипическими профилями; Exchange опирается на стандартизированное программирование приложений, включая продукты GA4GH; в базе данных содержится более 14 900 генов-кандидатов из материалов, представленных более чем 13 000 исследователей, которые можно запросить для поиска совпадений.

NGS (Next-Generation Sequencing), секвенирование нового поколения/высокопроизводительное секвенирование - технология, которая позволяет расшифровать последовательность нескольких генов или целого генома пациента за одну лабораторную процедуру; из-за высокой производительности и масштаба получаемых данных, возможности данной технологии позволяют ученым и врачам-генетикам анализировать от нескольких до десятков и сотен генов пациента (например, на расшифровку генома человека методом прямого секвенирования по Сенгеру потребовалось 10 лет, а NGS позволяет расшифровать геном за один день).

NIPT (Non-Invasive Prenatal Testing), неинвазивное пренатальное тестирование (НИПТ) - анализирует бесклеточную ДНК плода, обнаруженную в материнской крови.

Phred - компьютерная программа идентификации последовательности нуклеиновых оснований по данным "трассировки" флуоресценции, генерируемой автоматическим секвенатором ДНК, который использует электрофорез и метод с использованием 4-х флуоресцентных красителей; при первоначальной разработке Phred допускал значительно меньше ошибок в исследованных наборах данных, чем другие методы, в среднем на 40-50% меньше ошибок.

SF (Secondary Findings), вторичные находки – клинически значимые варианты в болезнетворных генах, не имеющие отношения к клиническому вопросу, в отношении которых проводится активный поиск во время анализа.

SNP (Single Nucleotide Polymorphism), однонуклеотидный полиморфизм – однонуклеотидный вариант в последовательности ДНК, относительно часто встречающийся в популяции.

SNV (Single Nucleotide Variant), однонуклеотидный генетический вариант - наследственное изменение, связанное с изменением одной пары нуклеотидов; обычно имеют только два аллеля; понятие свидетельствует о произошедшем изменении только в 1 нуклеотиде (букве) последовательности нуклеиновой кислоты по сравнению с эталонной последовательностью; может произойти как в одной цепи ДНК, так и во второй, поэтому при изменении нуклеотидов в обеих последовательностях ДНК говорят об изменении одной пары нуклеотидов (например, изменение нуклеотида только в одной цепи ДНК - GCATCGCTACC и GCATAGCTACC, изменение нуклеотида в двух цепях ДНК - GCATAGCTACC и GCATAGCTACC) ДНК или более.

STR (Short Tandem Repeat), короткий тандемный повтор - повтор двух или более пар нуклеотидов непосредственно примыкающих друг к другу в последовательности ДНК; длина короткого тандемного повтора обычно составляет от 2 до 10 пар оснований (например, (CATG) n) и обычно находится в некодирующей интронной области, то есть является мусорной ДНК; выявление коротких тандемных повторов используют при создании генетического профиля человека.

SV (Structural Variant), структурный вариант генома - любой генетический вариант, который изменяет структуру хромосомы; структурными считают такие варианты генома, которые имеют размер от 50 пар нуклеотидов и более (CNV), и могут быть представлены как: (1) дупликации - возникновение дополнительной копии участка; (2) делеции - утрата участка; (3) инверсии - поворот участка без его утраты; (4) транслокации - перенос участка с одной хромосомы на другую. Большинство структурных вариантов генома связывают с наследственными болезнями, однако, не все подобные изменения приводят к развитию заболеваний; установлено, что около 13% структурных вариантов генома обнаруживают у здоровых людей.

TP53 (Tumor Protein p53) - ген-супрессор опухолевого роста, расположен на коротком плече 17-й хромосомы и кодирует белок p53, его биологическая роль заключается в обеспечении стабильности генома и генетической однородности клеток в целостном организме; соматические мутации гена *TP53* встречаются при большинстве злокачественных новообразований человека, а наследственные мутации *TP53* предрасполагают к развитию широкого спектра ранних онкологий (*TP53*-ассоциированный опухолевый синдром).

UF (Unsolicited Finding) - известные патогенные варианты в болезнетворных генах, которые не связаны с первоначальным обоснованием для тестирования и которые были идентифицированы непреднамеренно.

VUS (Variant of Uncertain Significance), варианты неопределенной значимости - генетические варианты, которые были идентифицированы с помощью генетического тестирования, но их значение для функции или здоровья организма не известно.

WES (Whole-Exome Sequencing), полноэкзомное секвенирование - методика секвенирования всех экспрессируемых генов в геноме, известных как экзом;

один из методов NGS, идентифицирующих генетические изменения только в тех нуклеотидных последовательностях генома человека, которые могут быть связаны с изменениями в последовательностях белка; включает определение последовательности ДНК большинства экзонов, кодирующих белки, и может включать некоторые области ДНК, которые кодируют молекулы РНК не участвующие в синтезе белка; в ходе WES могут быть упущены некоторые клинически значимые мутации из-за неэффективного захвата определенных экзонов; в некоторых случаях тестирование экзона или его биоинформатического переанализа могут быть нацелены на конкретные гены, представляющие клинический интерес для данного заболевания; помогает врачу-генетику поставить правильный диагноз пациенту, в том числе при подозрении на наследственное моногенное заболевание.

WGS (Whole - Genome Sequencing), полногеномное секвенирование - методика единовременного определения полной последовательности ДНК генома организма за один раз; один из методов NGS, позволяет «прочитать» весь геном человека и анализировать генетические изменения в тех регионах генома, которые остаются неисследованными при проведении WES и помогает врачу-генетику поставить правильный диагноз пациенту; используется учеными для проведения полногеномного поиска ассоциаций.

Аллели – различные формы существования исследуемого гена или локуса, в диплоидном организме в норме существует 2 аллеля одного гена; могут различаться по размеру, быть протяженными (до нескольких тысяч пар оснований или иметь минимальный размер, соответствующий SNV), характеризуется уникальной последовательностью нуклеотидов, аллель дикого типа - норма, мутантный, если содержит мутацию.

Аналитическая специфичность - доля вариантов, правильно идентифицированных как совпадающие с эталоном варианты в конкретном образце.

Аналитическая чувствительность - доля вариантов, правильно идентифицированных как отличные от эталонной последовательности в конкретном образце.

Биологический образец (biological specimen) - проба ткани, биологической жидкости или иной субстанции, взятие которой осуществляют для определения, диагностики, лечения, смягчения или профилактики заболевания, расстройства или аномального физического состояния либо его симптомов.

Биоинформатический конвейер (bioinformatics pipeline) – последовательность программных инструментов и алгоритмов, которые используются для обработки и анализа данных секвенирования

Гемизиготность - термин характеризующий состояние аллелей гена и относится к случаю, когда ген представлен только одним аллелем, второго аллеля не существует (например, мужчины в норме гемизиготны по большинству генов на X- и Y-хромосомах); пациент может быть гемизиготным по определенному генетическому варианту, если унаследует

один аллель гена от одного из родителей, а от другого родителя его не унаследует (например, пациент (мужчина) унаследовавший мутацию, расположенную на X-хромосоме, от своей матери (X-сцепленное наследование), является гемизиготным по мутации).

Ген - базовый элемент наследственного материала, кодирующий белок или субъединицу белка и контролирующей его экспрессию; участок молекулы нуклеиновой кислоты, характеризующийся определенной нуклеотидной последовательностью и содержащий информацию о первичной структуре белка; представляет собой линейный участок ДНК, имеет начало и конец, может быть протяженным и коротким, сравним с инструкцией, состоящей из букв (нуклеотидов), для последующего синтеза белка или РНК.

Генетическая ассоциация - связь определенного генетического маркера с признаком, предполагает влияние данного генетического маркера на патогенез заболевания; маркерами могут быть генетические изменения в ДНК, чаще всего однонуклеотидные генетические варианты (SNV), с известным расположением на хромосоме; генетические маркеры могут помочь связать наследственное заболевание с ответственным геном и отследить наследование соседнего гена, который еще не был идентифицирован, но приблизительное местоположение которого известно; изучение генетических ассоциаций для конкретных заболеваний проводят с помощью GWAS-тестирования.

Генетический вариант - генетическое изменение в ДНК или РНК, выявленное при сравнении исследуемого генома с эталонным геномом; понятие употребляется в отношении мутаций и полиморфизмов; может быть связан с заменой как одного нуклеотида в ДНК или РНК человека (SNV), так и большого числа нуклеотидов (SV); для выявления у человека определенного генетического варианта, проводят сравнение нужной последовательности генома конкретного человека с эталонной, или референсной последовательностью; геном каждого человека по набору генетических вариантов является уникальным, поэтому индивидуумы отличаются друг от друга наборами генетических вариантов.

Геном – это полный набор генетической информации в организме, т.е. вся генетическая информация, сосредоточенная у человека в ядре клетки в 24 различных хромосомах (22 аутосомы, X- и Y-хромосомы), а также в митохондриальной ДНК.

Геномная медицина - использование геномной информации и технологий геномного секвенирования для определения риска заболевания и предрасположенности, диагностики и прогноза, а также выбора и определения приоритетности терапевтических вариантов.

Геномное секвенирование - термин включает использование секвенирования всего генома (WGS), секвенирования всего экзона (WES) и генных панелей (Gene panel/мультигенные панели).

Генотип человека - это сумма генетической информации, содержащейся в хромосомах; понятие применяют в более узком смысле в отношении комбинации аллелей исследуемого гена или локуса (например, если ребенок

унаследовал комбинацию генетических вариантов от отца, то можно сказать, что он унаследовал генотип отца).

Гетерозиготный – различие в аллелях для одного или нескольких генов в гомологичных хромосомах; термин характеризует состояние аллелей гена, т.е. такое генетическое изменение, которое произошло только на одном из двух аллелей, в отличие от гомозиготного генетического изменения; пациент может быть гетерозиготным по определенному генетическому варианту, если унаследует разные аллели от родителей (от одного из родителей - аллель с генетическим изменением, а от второго родителя – аллель без генетического изменения), в случае генетического изменения *de novo* (не было унаследовано от родителей) - гетерозиготность характеризует локализацию изменения только на одном из двух аллелей гена.

Глубина прочтения - число раз, которое нуклеотид был прочитан в процессе NGS-секвенирования; в результате анализа секвенирования образца ДНК, которое выдает пациенту врач-генетик, обычно приводится показатель среднего значения в расчете на нуклеотид (например, 20x или 100x), что необходимо для оценки качества покрытия, т.е. врач-генетик может определить насколько достоверно выявленный генетический вариант представлен в образце ДНК пациента.

Глубокое секвенирование – секвенирование, в результате которого общее количество прочтений во много раз превышает длину исследуемой нуклеотидной последовательности; в ходе процесса происходит прочтение нуклеотидной последовательности сотни и тысячи раз; это один из типов NGS, позволяющий исследователям анализировать однонуклеотидные генетические варианты и небольшие вставки/делеции, а также выявлять редкие типы раковых клеток, составляющие всего 1% от исходного образца.

Гомозиготный – имеющий идентичные аллели для одного или нескольких генов в гомологичных хромосомах; термин характеризует состояние аллелей гена с генетическим изменением сразу на обоих аллелях, в отличие от гетерозиготного генетического изменения (например, пациент может быть гомозиготным по определенному генетическому варианту, если унаследует одинаковые аллели определенного гена от обоих родителей), в случае генетического изменения *de novo* (не было унаследовано от родителей) гомозиготность характеризует только локализацию изменения сразу на обоих аллелях гена.

Горячая точка - участок, в котором частота возникновения мутаций (или рекомбинаций) очень велика, т.е. область молекулы ДНК, значительно более подверженная мутациям, чем другие области сходного размера.

Делеция (deletion) - мутация, в процессе которой часть хромосомы или последовательности ДНК теряется во время репликации ДНК.

ДНК (Deoxyribonucleic Acid; DNA) - молекула, кодирующая генетическую информацию в ядрах клеток.

Захват мишени (target capture) - методика захвата геномных участков изучаемой области из пробы ДНК перед секвенированием.

Митохондриальный геном - совокупность ДНК, сосредоточенная в митохондриях клетки.

Мозаицизм/генетический мозаицизм - состояние, при котором многоклеточный организм обладает более чем одной генетической линией в результате генетической мутации, т.е. различные генетические линии произошли от одной оплодотворенной яйцеклетки; мозаицизм является одной из нескольких возможных причин химеризма, при котором один организм состоит из клеток с более чем одним различным генотипом.

Моногенное заболевание – заболевание, вызванное одной или несколькими мутациями в одном гене, его развитие может возникать при мутациях только одного гена.

Мутация - генетический вариант хромосомы или ДНК, который связывают с развитием заболевания; термин означает «изменение», может возникнуть в организме человека из-за различных неблагоприятных факторов или передаться ему по наследству; мутации в ДНК могут нарушать функции белка или прекращать синтез белка, из-за чего возможно развитие заболевания; при подозрении на наследственное заболевание врач-генетик может назначить пациенту проведение ДНК-диагностики для поиска мутаций в определенном гене, нескольких генах или геноме пациента; в случае, когда мутация, вызывающая заболевание, уже установлена, врач-генетик может назначить поиск этой мутации у кровных родственников пациента для оценки риска развития заболевания и тактики дальнейшего лечения.

Мутация зародышевой линии (зародышевая мутация, конституциональная мутация, герминальная мутация) - это любая обнаруживаемая вариация в зародышевых клетках, которые при полном развитии становятся сперматозоидами и яйцеклетками; это единственные мутации, которые могут передаваться потомству в случае, когда либо мутировавший сперматозоид, либо ооцит объединяются, образуя зиготу, причем, после события оплодотворения зародышевые клетки быстро делятся, чтобы произвести все клетки в организме, в результате чего эта мутация присутствует в каждой соматической клетке и гаметах у потомства; мутация зародышевой линии отличается от соматической мутации.

Обследуемый (subject of care) - любой индивидуум, пользующийся медицинской помощью, или ее потенциальный пользователь.

Оппортунистический генетический скрининг (OGS) (термин использует ACMG) - рутинный и систематический поиск вторичных находок отличительная черта не столько в его контексте (общественное здравоохранение или здравоохранение), а отсутствие показаний для проведения конкретного теста или исследования у тех, кому предлагается скрининг; влечет за собой более ненадежный баланс выгод и рисков, ESHG продолжает рекомендовать осторожный подход к оппортунистическому скринингу.

Определение фазы (phasing) – этап биоинформатического анализа, который включает разделение копий каждой хромосомы, унаследованных от матери и

отца, на гаплотипы, предоставляя информацию о конкретной комбинации вариантов, присутствующих на каждой хромосоме.

Ортогональное подтверждение вариантов - подтверждение самого высокого качества с помощью ортогональных анализов (например, секвенирование по Сэнгеру) для подтверждения вариантов, идентифицированных с помощью секвенирования нового поколения (NGS); является стандартной практикой во многих лабораториях для снижения риска получения ложноположительных (FP) результатов.

Патогенный вариант – понятие в генетике означает способность генетического варианта вызывать заболевания; если такой генетический вариант передается от больного родителя с наследственным заболеванием к его ребенку, вероятность развития у ребенка соответствующего заболевания будет высокой.

Пенетрантность - частота (в процентах), с которой ген или комбинация генов проявляют себя в фенотипе носителей, т.е. это доля людей с определенными генетическими изменениями (например, мутацией в конкретном гене или в нескольких генах), у которых есть признаки определенного генетического заболевания. Полная пенетрантность – это развитие конкретного заболевания абсолютно у всех носителей определенных мутаций. Если у некоторых людей с мутациями не развиваются признаки заболевания, считается, что заболевание имеет пониженную (или неполную) пенетрантность; знание о пенетрантности для определенного заболевания помогает врачам в определении тактики генетического тестирования и лечения пациента.

Персонализированная медицина - адаптация лечения к индивидуальным особенностям каждого пациента, термин означает смещение акцента в принятии клинических решений на более индивидуальный подход, в значительной степени поддерживаемый молекулярной информацией, и не подразумевает, что для каждого человека может быть разработано уникальное лечение.

Полиморфизм - генетический вариант хромосомы или ДНК, встречающийся у всех или в отдельных группах людей; может быть представлен разными формами, может часто встречаться в геноме каждого человека или отдельной группы лиц (например, отдельной народности); локус гена считается полиморфным, если редкий аллель имеет частоту 1% или более; полиморфизм может быть связан с заменой как одного нуклеотида в ДНК или РНК человека (SNV), так и большого числа нуклеотидов (SV); геном каждого человека по набору полиморфизмов уникален; отдельные полиморфизмы не могут привести к развитию наследственного заболевания, однако, набор полиморфизмов конкретного человека может определять свойства его организма (например, его ответ на определенное лекарственное средство).

Прецизионная медицина - подход к лечению и профилактике заболеваний, направленный на достижение максимальной эффективности за счет учета индивидуальной изменчивости генов, окружающей среды и образа жизни;

всеобъемлющий термин, включающий более конкретные компоненты, связанные с использованием конкретных технологий и/или информации.

Псевдогены - участки ДНК, сходные по последовательности нуклеотидов с известным геном, но не кодирующие никаких продуктов.

Референсная последовательность (reference sequence) - цифровая база данных нуклеотидной последовательности, собранная учеными в качестве стандартного (репрезентативного) образца генома человека; эталонная (контрольная) последовательность для сравнения используется во всем мире при секвенировании нуклеиновых кислот конкретного человека; референсный геном человека поддерживается и совершенствуются Консорциумом Референсного Генома; на текущий период времени, референсной последовательностью ДНК генома человека считают последовательность 38-ой сборки.

Сегментарная дупликация - это блоки ДНК длиной от 1 до 400 кб, которые повторяются в нескольких участках генома, имея сходство более чем на 90%; многочисленные исследования выявили корреляцию между расположением сегментарных дупликаций и областями хромосомной нестабильности.

Секвенирование ДНК (DNA sequencing) - определение последовательности нуклеотидных оснований (аденин, гуанин, цитозин и тимин) в молекуле ДНК; как правило, описывается с 5'-конца.

Секвенирование по Сэнгеру - дидезоксинуклеотидный метод, или метод «обрыва цепи», был разработан Ф. Сенгером в 1977 году, используется для определения нуклеотидной последовательности ДНК, в результате реакции гибридизации синтетического олигонуклеотида (является праймером, поставляющим 3'-гидроксильную группу для инициации синтеза цепи, комплементарной матрице) длиной 17—20 звеньев со специфическим участком одной из цепей секвенируемого участка.

Соматическая клетка (somatic cell) - клетки тела, отличные от гамет.

Стратифицированная медицина - группирование пациентов в соответствии с риском заболевания или вероятной ответной реакцией на лечение, определяемой диагностическими тестами, для определения курса терапии.

Фармакогеномика - полигенный или полногеномный подход к выявлению генетических детерминант реакции на лекарство, основанный на информации, полученной в области технологий; изучает влияние генетических вариантов каждого человека в его ответе на лекарственное средство; при выборе лекарства для конкретного пациента, врач, кроме клинической картины, может опираться на результат генетического анализа, показывающий распределение генетических вариантов в геноме данного пациента, часто представляющих собой полиморфизмы; в совокупности, информация об определенных полиморфизмах позволяет назначить пациенту подходящую ему дозу препарата.

Фенотип - наблюдаемые свойства (структурные и функциональные) организма, образованные взаимодействием между генотипом организма и

факторами окружающей среды; понятие определяет внешне выраженные черты или характеристики человека (не только цвет глаз или волос, но и симптомы заболевания у пациента, развившиеся к определенному возрасту), по которым врач устанавливает диагноз пациенту.

Экзом - часть генома, сформированная экзонами; область генома, включающая весь белок-кодирующий регион генома (составляет примерно 1-2% генома человека), наиболее информативный при изучении причин наследственных болезней, в нем находят до 85% всех мутаций с помощью WES; чаще исследуют клинический экзом (часть экзома, для которой известно клиническое значение найденных в нем изменений).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДЗМ – Департамент здравоохранения города Москвы

МО – медицинская организация

ACMG (American College of Medical Genetics) (<https://www.acmg.net/>) - Американский колледж медицинской генетики и геномики

AMP (The Association for Molecular Pathology; <https://www.amp.org/>) - Ассоциация молекулярной патологии.

CAP (The College of American Pathologists; <http://www.cap.org/>) - Колледж американских патологоанатомов.

CCMG - Канадский колледж медицинской генетики, национальная организация медицинских и лабораторных генетиков

CDC - Центры по контролю и профилактике заболеваний.

ClinGen (<https://clinicalgenome.org/>) — клинический геномный ресурс, предназначен для обеспечения точной клинической интерпретации результатов геномных тестов

ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) - клинический геномный ресурс (ClinGen), одобренный FDA, предназначен для обеспечения точной клинической интерпретации результатов геномных тестов

CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute; <https://clsi.org/>) - Институт клинических лабораторных стандартов

ESHG (European Society of Human Genetics; <https://www.eshg.org/>) - Европейское общество генетики человека

FDA - Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США

GA4GH (Global Alliance for Genomics and Health; <https://www.ga4gh.org/>) - Глобальный альянс по геномике и здоровью

GenCC (The Gene Curation Coalition; <https://thegenc.org/>) - Коалиция по курированию генов

HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee; <https://www.hugo-international.org/>) - комитет Организации по геному человека (HUGO)

HGVS (Human Genome Variation Society; <http://www.hgvs.org/>) - общество по изучению вариаций генома человека

LoD (limit-of-detection) – предел обнаружения

Matchmaker Exchange

(https://dev.abcdef.wiki/wiki/Genomic_and_Medical_Data) - федеративная сеть баз данных, содержащих генетические варианты для поиска генетических причин редких заболеваний путем сопоставления схожих фенотипических и генотипических профилей

MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) - мультиплексная лигазно-зависимая амплификация зондов

NIPT – неинвазивное пренатальное тестирование

OMIM (Mendelian Inheritance in Man; <https://www.omim.org/>) - база данных заболеваний человека с менделевским наследованием

Panel App (<https://panelapp.genomicsengland.co.uk/>) – база данных целевых генетических панелей

ВВЕДЕНИЕ

Лабораторная медицина - неотъемлемая часть общественного здравоохранения и оказания медицинских услуг. Она опирается на многочисленные аналитические методы и своевременно предоставляет объективные данные медицинским специалистам для руководства профилактикой, диагностикой, лечением и мониторингом заболеваний.

Последние технологические достижения произвели революцию в современной лабораторной медицине и значительно повысили ценность ее роли в здравоохранении, в части, касающейся принятия клинических решений. Заслуживают внимание инновации в области геномики. Их интеграция с такими инструментами, как искусственный интеллект и интеллектуальный анализ больших медицинских данных, предоставляет более удобные и менее дорогие решения для хорошо зарекомендовавших себя технологий, что способствует сужению клиничко-лабораторного интерфейса.

Появление технологий секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) - мощный подход к расшифровке ряда заболеваний человека, включая рак. Они снизили стоимость эталонного секвенирования на порядки и значительно увеличили производительность, позволили получать глобальную геномную информацию о пациентах, в отношении которых могут быть предприняты клинические действия. Перечисленные преимущества предпочтительны для характеристики геномных aberrаций в исследовательских и диагностических целях. Для клинического использования скрининг всего генома или экзона является сложной задачей из-за большой области генома, которую необходимо секвенировать, связанных с этим затрат, сложности получаемых данных и отсутствия установленной клинической важности всех генов. Поэтому, для рутинного скрининга чаще применяют целевое секвенирование, включающее ограниченное количество генов с известной клинической значимостью. Этот процесс требует селективного обогащения геномных областей, содержащих искомые маркеры, с помощью одной из нескольких стратегий обогащения на основе праймеров или зондов, с последующим секвенированием обогащенных геномных областей.

Однако, преимущества технологий NGS, сопряжены с рядом проблем, которые необходимо должным образом решить, прежде чем превратить из исследовательских инструментов в инструменты рутинной клинической практики.

В контексте появления COVID-19, вспышек гриппа, кори и других инфекционных заболеваний, NGS – позволяет считывать и хранить информацию ДНК, информирующую должностных лиц общественного здравоохранения о путях передачи и скорости мутации вирусных патогенов, циркулирующих в популяции на той или иной территории, в определенный период времени. В задачи геномного секвенирования для нужд общественного здравоохранения включены: идентификация новых патогенов, отслеживание географического распространения инфекционных ПБА с

течением времени и обеспечение своевременного выявления и оценки мутаций, которые потенциально могут влиять на патогенность, передачу инфекции или применение контрамер (вакцины, терапевтические и диагностические средства).

В настоящее время ведутся работы по быстрой крупномасштабной диагностике. Однако, в клинической практике NGS чаще используют для диагностики и лечения различных заболеваний (онкологических, наследственных, вирусных и др.).

Лабораторная медицина находится в том состоянии, когда автоматизация и другие достижения повысили ее эффективность и точность до высокого уровня. Так например, достижения в области биоинформатики и информационных технологий способствуют разработке сложного машинного обучения и искусственного интеллекта, позволяющего выполнять интеллектуальный анализ больших данных, полученных с помощью передовых аналитических методов [1]. Другими словами, NGS - это такой лабораторный процесс, при котором несколько инструментов параллельно осуществляют работу, с использованием роботизированной системы отслеживания и искусственного интеллекта, связывая воедино все этапы аналитического процесса.

Инструменты информатики патологии в сочетании с появлением больших наборов данных в результатах клинических испытаний позволили реализовывать новые инициативы в области точной медицины и создавать биохранилища. В перспективе ожидается, что усовершенствование методов секвенирования следующего поколения заменит ряд лабораторных тестов, каждый из которых требует опыта, дорогостоящих и специализированных инструментов, на одну экономичную технологию и лаборатория транслоцируется из диагностической службы в профилактическую или первичную медико-санитарную помощь, где лечение будет подбираться в соответствии с конкретными потребностями каждого человека.

1. Общие положения

Настоящее руководство содержит рекомендации по использованию секвенирования нового поколения (NGS) в клиничко-диагностических и молекулярно-генетических лабораториях, подведомственных Департаменту здравоохранения города Москвы, занимающихся разработкой, проверкой и выполнением анализов NGS. Это руководство может быть полезно российским органам по аккредитации лабораторий, а также использоваться в качестве справочного материала по ключевым вопросам, которые должны учитываться профильными лабораторными специалистами и практикующими врачами, использующими услуги NGS. Рекомендации в этом документе охватывают процесс NGS от подготовки шаблона до клинической отчетности, включая валидацию и обеспечение качества лабораторных процессов.

Американский колледж медицинской генетики и геномики и Еврогенест опубликовали подробные рекомендации по использованию NGS в практическом здравоохранении [2, 3], которые рассмотрены в настоящем

документе, предназначенном для освещения вопросов в контексте применения технологии секвенирования нового поколения в практике российского здравоохранения. Клиническим лабораториям, выполняющим NGS, рекомендовано соответствовать критериям, изложенным в этом документе.

Применение настоящих рекомендаций позволит: обеспечить безопасность пациента и медицинского персонала при выполнении NGS исследований при обследовании на инфекционные заболевания (SARS-CoV-2, вирусы гриппа, кори и др.), генетические, онкологические и многие другие, получить валидированные результаты исследований, использовать их для верификации диагноза, проводить лечебные мероприятия, прогнозировать состояние пациента, а также, в случае необходимости, осуществлять эпидемиологический мониторинг.

2. Клинический диагноз и NGS

Секвенирование нового поколения (NGS) ускоренными темпами внедряется в клиническую диагностическую практику. Его часто воспринимают как следующий шаг в решении диагностических проблем пациентов с редкими генетическими заболеваниями и считают концом диагностической одиссеи, независимо от того, установлена причина заболевания или нет, поскольку большинство пациентов сталкивается с не (полностью) объяснимым результатом или результатом, имеющим неясное значение. Пациенты, прошедшие NGS уверены, что сделали все возможное и активный поиск диагноза может прекратиться, после чего ответственность за «еще не поставленный» диагноз возлагается на клиницистов. Различные типы результатов NGS с различными уровнями определенности могут потребовать от медицинских работников значительных усилий по интерпретации. Часты неопределенные значения полученных результатов, последствия которых, на текущий период времени, непредсказуемы. Несмотря на то, что диагностические ответы обычно довольно ясны (найден или не найден вариант), огромное количество данных, поступающих из NGS, предоставляет более сложные результаты с подвижными границами. По причине того, что наши знания о геноме и его интерпретации все еще находятся в стадии изучения и разработки, NGS пока приводит к менее стабильным результатам и диагнозам, хотя результаты медико-генетического тестирования часто высоко ценятся и воспринимаются однозначно.

О преимуществах геномного тестирования в первую очередь сообщают при редких заболеваниях, диагностике рака и выборе терапевтического препарата.

Секвенирование генома ранее ограничивалось исследовательской средой, однако, оно привело к улучшению показателей диагностики и лечения для пациентов с редкими заболеваниями и раком [4, 5, 6]. Растет число NGS-исследований сложных состояний (например, диабет, нейродегенеративные расстройства) [4] и оценки их полезности для скрининга на носительство [7, 8, 9]. Поэтому, вполне вероятно, что в ближайшем будущем населению будет предлагаться геномное тестирование в повседневной практике

здравоохранения. Однако, NGS сопряжено с многими этическими и практическими вопросами. Несмотря на сложность технологии, большинство анализов направлено исключительно на получение определенных типов результатов [10-14], которые могут восприниматься по-разному у симптоматических или бессимптомных лиц [15]. В данных NGS не исключена идентификация случайных находок (UF) и вариантов неизвестной значимости (VUS) [15, 16]. UF — это такие варианты генов, которые обнаруживаются во время геномного тестирования, но не связаны с исследуемым состоянием или симптомами [15, 16, 17] и потенциально могут влиять на биологических родственников и на медицинские показания [15, 16]. VUS у человека с редким заболеванием воспринимают, как потенциальное объяснение симптомов, что более приемлемо для него, чем для индивидуума без каких-либо текущих симптомов, поскольку вызывает ненужное беспокойство.

Лицам с определенным заболеванием (например, с онкологическим, генетическим, не диагностированным и редким заболеванием), с большей вероятностью будет предложено генетическое и геномное тестирование из-за большей клинической полезности [18]. Бессимптомным лицам может быть предложен скрининг на носительство (исследование конкретного генетического варианта) [7] или скрининг новорожденных (NBS) (исследование определенного набора метаболических состояний) [8, 9]. Следует учитывать, что геномное тестирование расширяет возможности выявления носителей, поэтому не исключена идентификация большого количества вариантов [7, 8, 9], ответственных за состояния, для которых в настоящее время нет лечения.

ВОЗ опубликовала в 1968 г. первоначальные критерии скрининга, которые по-прежнему актуальны [19]. Они утверждают, что должна быть узнаваемая латентная или ранняя симптоматическая стадия, а общая польза от скрининга должна перевешивать вред. К сожалению, большинство из критериев скрининга не соблюдается для геномного тестирования [20].

Задача клинических лабораторий состоит в обеспечении того, чтобы тестирование было клинически значимым, экономически эффективным и могло быть интегрировано в клиническую помощь.

Для успешного внедрения геномики в здравоохранение, рекомендовано разработать соответствующую политику и нормативно-правовую базу, уделяя особое внимание гармонизации регулирования в областях исследований и клинической помощи, а также принятию законодательства, регулирующего сбор, хранение и обмен информацией о персональных геномных данных [21, 22, 23, 24, 25, 26].

3. Мутации их отношение к болезни

ДНК живых организмов состоит из двухцепочечной антипараллельной цепочки из четырех различных дезоксирибонуклеотидов, где каждое основание в одной цепи соединяется с комплементарным ему основанием в противоположной цепи [27]. Эта структура является основой относительной стабильности генетически закодированной информации. Эволюционно

развился ряд клеточных механизмов для сохранения идентичности последовательности генома [28]. Тем не менее, неизбежны изменения из-за внутренних факторов [29] (например, ошибки в механизме репликации [30] или репликативные мутации ДНК-полимеразы [31]) и внешних факторов, еще больше увеличивающих генетическую изменчивость (например, заражение возбудителями через интеграцию вирусной ДНК [32] или воздействие окружающей среды (например, канцерогены, табак и УФ-излучение [33])). В совокупности, эти механизмы вносят существенный вклад не только в эволюционные процессы, но и в развитие болезней.

Важно различать два типа мутаций: (1) наследственные мутации затрагивают клетки зародышевой линии (передаются по наследству) и (2) соматические мутации затрагивают соматические клетки в определенном органе/ткани (не передаются следующему поколению). Эти два типа мутаций исследуются с использованием разных стратегий секвенирования.

В то время, как клеточные геномы затронуты в обеих линиях клеток, только мутации в зародышевой линии являются истинными генетическими изменениями, поскольку соматические абберации не наследуются. Патогенные мутации, распространяющиеся в зародышевой линии, в основном связаны с менделевскими расстройствами [34] и ранее были причинно связаны с раком только для нескольких десятков генов, включая *TP53* [35], *BRCA1/2* [36], *APC* [37] и некоторые другие [38]. Напротив, опухолевые заболевания в основном были обусловлены мутациями в соматических клетках, накопленных в течение жизни человека [39] из-за ошибок репликации или повреждений ДНК, которые не контролировались традиционными клеточными механизмами. Известно, что если одна из соматических мутаций дает преимущество в росте определенной популяции клеток, стимулируя клеточное деление или ингибируя апоптоз, то эта клональная популяция размножается и проявляется как болезнь. По мере увеличения числа соматических мутаций, увеличивается количество «драйверных» мутаций, дающих популяции избирательное преимущество. Однако, мутации в соматических клетках теперь чаще связывают и с нераковыми заболеваниями [40].

Поскольку многие изнурительные заболевания имеют сложное генетическое происхождение, необходимо определить взаимосвязь между множественными мутациями и их фенотипом. Нет двух одинаковых геномов, в том числе, из-за происходящих различных видов изменений, влияющих либо на отдельные положения в цепочке нуклеотидов в ДНК (однонуклеотидные варианты/SNV), либо на изменение более крупной структуры (структурные вариации/SV) или изменение числа копий (вариации числа копий/CNV)) ДНК. SNV могут изменять последовательность кодируемого белка в отдельных аминокислотных остатках, вводить стоп-кодоны или влиять на экспрессию, сплайсинг или стабильность мРНК. Изменения, обобщенные как SV, могут затрагивать более крупные участки последовательности и включать в себя делеции или вставки разного размера, которые в совокупности

называются вариантами числа копий (CNV), инверсии (структурные варианты с нейтральным числом копий) и транслокации. Однако, даже большие SV могут возникать без явных патологических последствий [41]

Рис.1. Общие структурные вариации в геноме [42].



4. Прогностическая способность теста NGS

Результаты секвенирования всего генома, идентифицировавшие лиц с клинически значимым риском 24 различных заболеваний [43], показали, что большинство индивидуумов получили отрицательные результаты тестов по 23 из них. Однако, около 90% испытуемых имели клинически значимую предрасположенность, как минимум, к одному заболеванию.

Ложноположительные результаты — еще одна важная проблема. Показано, что если распространенность заболевания составляет 1:100 000 и мы обследуем 10 миллионов человек с помощью теста NGS с чувствительностью и специфичностью 99,9%, то, с большей вероятностью, получим 10 000 ложноположительных результатов [44]. Кроме того, ложноположительные результаты могут потребовать последующих инвазивных процедур для определения границ результативных данных, из-за чего скрининг может быть не всегда полезен.

Другой большой риск - получение неожиданных случайных находок почти для всех, т.е. получение неожиданных положительных результатов в ходе геномного анализа. Американский колледж медицинской генетики предложил лишь минимальный список генов, при мутациях в которых лаборатория должна сообщать врачам, назначающим процедуру, независимо от показаний к секвенированию [45] и подчеркнул важность всестороннего претестового и послетестового медико-генетического консультирования пациентов. Клиническая применимость большинства технологий NGS при менделевских заболеваниях и распространенных многофакторных заболеваниях (например, диабет, гипертония, фармакогеномика и неонатальный скрининг), сталкивается с проблемами необходимости разработки технологий и программного обеспечения для вычислительного анализа, точности прогнозов, обучения медицинского персонала и оценки экономической эффективности.

Отмечено три основных недостатка клинической геномики [46]: чрезмерное тестирование, гипердиагностика и чрезмерное лечение. Необходимо учитывать тот важный факт, что при редком

заболевании положительная прогностическая ценность теста будет низкой, даже если тест обладает высокой чувствительностью и специфичностью.

Геномика не может быть напрямую переведена в исход генетического заболевания. Взаимосвязь между генотипом и фенотипом многомерна и включает в себя другие факторы, включая микробиом, тип образа жизни и различные физиологические параметры. Существуют другие серьезные препятствия: технические проблемы, связанные с геномным тестированием, разные результаты, полученные на разных платформах, необходимость стандартизировать получение образцов и интерпретация того, что следует считать положительным результатом.

5. Общие черты клинико-диагностического рабочего процесса NGS

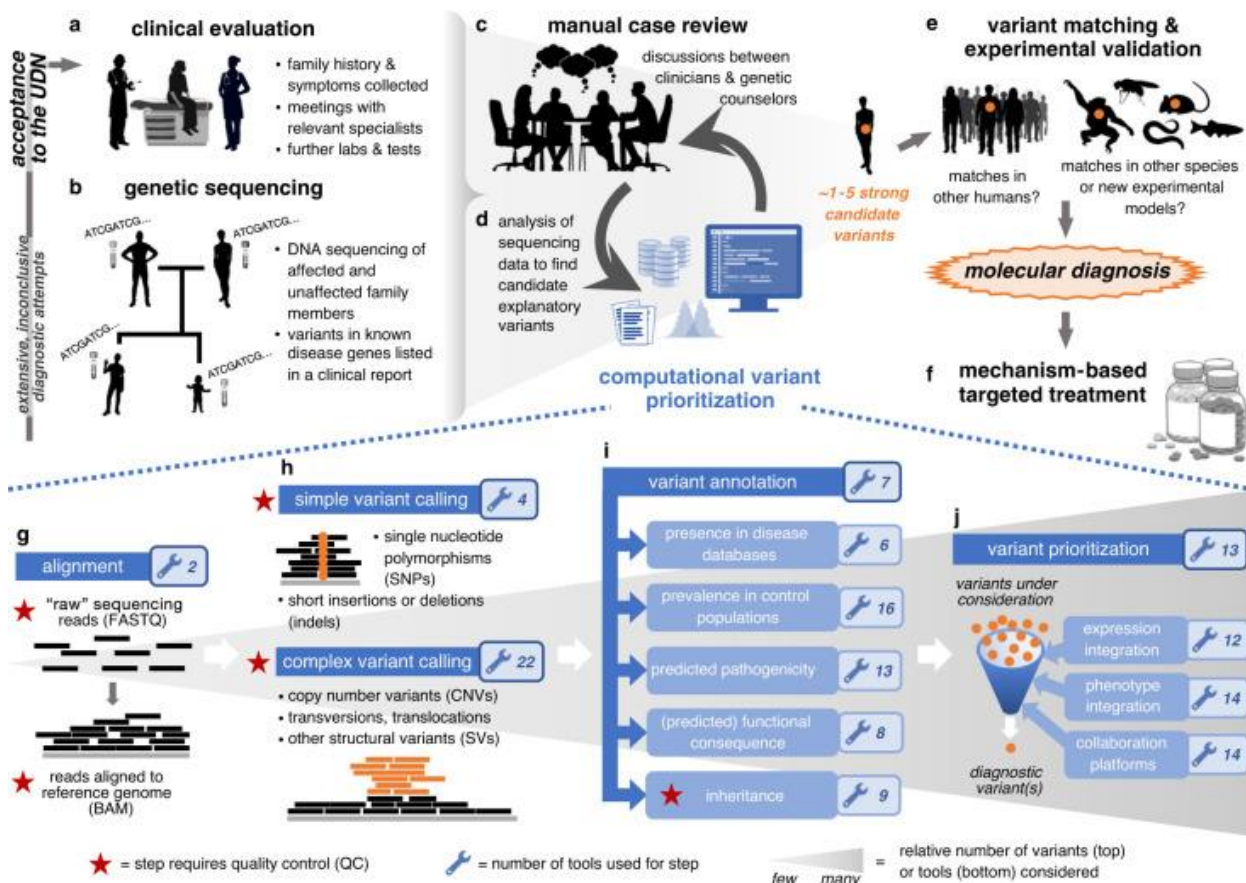
(на примере ES/GS диагностики редких и новых генетических состояний)

Пациент, как правило, в течение безуспешного многолетнего поиска диагноза уже прошедший большое количество различных тестов и наблюдавшийся у многих клинических специалистов, проходит индивидуальную клиническую оценку и молекулярно-генетическое тестирование в медицинской организации (рис. 2 а). В большинстве случаев забор образцов с биоматериалом для исследования (кровь, слюна и/или биопсийные образцы пораженных и здоровых членов семьи) осуществляют с помощью предназначенных устройств. Взятые образцы секвенируют и, по прошествии нескольких недель, полученные данные (результаты секвенирования) становятся доступными для клинициста. (рис. 2 б). В клиническом отчете, соответственно рекомендациям по классификации вариантов Американского колледжа медицинской генетики и геномики (ACMG) [47], перечисляют варианты в болезнетворных генах, связанные и не связанные с клиническим фенотипом, патогенные варианты, поддающиеся терапии, и статус носительства (наличие гетерозигот) для некоторых рецессивных менделевских состояний. Специалисты, выполняющие секвенирование, одновременно проводят анализ полученных данных, с целью выявления вариантов «сильных кандидатов», объясняющих симптомы у пациента (рис. 2 с, d). В случае, когда клинический отчет неубедителен, выполняется сравнительный анализ с ранее полученными собственными данными локальной лаборатории.

После того, как варианты-кандидаты определены, существует три способа установления их причинно-следственной связи: (1) запрашивается информация о лицах с генотипом, совпадающим с симптомами обследуемого пациента из баз данных, содержащих генетические варианты человека и соответствующую информацию о симптомах [48, 49, 50, 51] ; (2) одновременно, при необходимости, проводятся эксперименты для оценки эффекта вариантов-кандидатов *in vivo* в модельных организмах или клеточных линиях; (3) у пораженных пациентов подтверждается наличие вторичных фенотипов, на которые указывают фенотипические проявления у лиц с совпадающим генотипом или эксперименты *in vivo* (рис. 2 е). Причинные

варианты, выявленные на этих этапах, подтверждаются секвенированием по Сэнгеру, и, в идеале, приводят к молекулярному диагнозу пациента, с возможностью информирования о результативных терапевтических стратегиях (рис. 2. f).

Рис.2. Репрезентативный клинический рабочий процесс для выявления генетических вариантов, вызывающих заболевание [52].



a) пострадавший пациент проходит личное клиническое обследование, при котором при необходимости проводится расширенное фенотипирование и дополнительные тесты.

b) До или во время клинической оценки образцы соответствующих пораженных и здоровых лиц, являющихся членами семьи, отправляются на геномное секвенирование.

c, d) Данные секвенирования, предоставленные лабораторией, анализируются в сочетании с другой информацией в процессе обмена данными между биоинформатиками, клиницистами и генетическими консультантами, чтобы выделить варианты, которые могут объяснить заболевание пациента.

e) В базах данных, содержащих генетические варианты человека и соответствующую информацию о симптомах (например, Human Phenotype Ontology (HPO), Matchmaker Exchange) или других существующих базах, выполняют поиск идентифицированных в (c) вариантов, совпадающих с

сильными вариантами-кандидатами, которые также вводят в модельные организмы или клеточные линии, где возможно оценить фенотипическое воздействие *in vivo* (f).

f) При подтверждении варианта-кандидата в качестве причины заболевания, сразу предоставляют молекулярный диагноз, впоследствии пригодный к использованию для адаптации клинического ведения и молекулярной терапии.

g – j) Повторяющиеся шаги в вычислительных рабочих процессах для обработки данных геномного секвенирования для выявления, фильтрации и определения приоритетных генетических вариантов, которые объясняют симптомы болезни пострадавшего человека.

Вычислительные инструменты, используемые для поиска объясняющих генетических вариантов, постоянно меняются с появлением новых технологий и этиологий заболеваний. Несмотря на эти усовершенствования последовательностей алгоритмов биоинформатической обработки, основные роли, которые вычислительные инструменты играют в общем процессе приоритизации вариантов, можно разделить на следующие категории: (1) сопоставление показаний секвенирования с эталонным геномом человека (рис.2 g), (2) варианты, присутствующие у человека из показаний к секвенированию (рис.2 h), (3) аннотирование этих вариантов с соответствующей информацией (рис.2 i), (4) фильтрация и определение приоритетных вариантов, которые могут вызвать состояние пациента (рис. 2 j).

6. Виды NGS-анализов, применяемых в клинической практике

Три основных вида NGS-анализа разного уровня [53].

Все три NGS-анализа имеют преимущества перед секвенированием по Сэнгеру в их способности одномоментно секвенировать огромное количество последовательностей ДНК. Следует отметить, что каждый из них имеет определенный уровень по возрастанию сложности при практическом применении: (1) панели генов, нацеленных на заболевание (целевое/таргетное секвенирование), (2) секвенирование экзома (ES), (3) секвенирование генома (GS).

6.1. Панели генов исследуют таргетный набор генов, связанных с определенным фенотипом (например, потеря слуха) или показаниями (например, управление деторождением). Чувствительность и специфичность диагностических генных панелей частично зависят от охвата последовательностей целевых областей и типов вариантов, которые могут быть обнаружены. Концентрация на ограниченном наборе генов снижает затраты на достижение надлежащего охвата (покрытия) интересующих участков ДНК за счет эффективного использования возможностей секвенирования и снижения требований к биоинформатической обработке и хранению данных.

Панельные тесты могут максимизировать клиническую чувствительность за счет оценки кодирующих и клинически значимых некодирующих областей целевых генов с помощью NGS в совокупности с применением вспомогательных анализов (например, секвенирование по Сэнгеру) или других методов обнаружения вариации числа копий (CNV) и других сложных перестроек для дополнения отсутствующего участка ДНК в панели [54].

Разработаны международные рекомендации: (1) по включению генов и выполнению технических и отчетных процедур для диагностических панелей (ACMG) [55], (2) по определению фенотип-генотипических ассоциаций (клинический геномный ресурс ClinGen; www.clinicalgenome.org), (3) по использованию краудсорсингового инструмента для обмена, загрузки, просмотра и оценки панели генов (веб-сайт PanelApp <https://panelapp.genomicsengland.co.uk/panels/>).

Диагностические генные панели оптимальны для четко определенных клинических проявлений, являющихся генетически гетерогенными (например, врожденная потеря слуха), для которых патогенные варианты генов, ассоциированных с заболеванием, составляют значительную часть случаев. Количество вариантов с потенциальной клинической значимостью примерно пропорционально размеру анализируемой области-мишени.

Вторичные/случайные находки в генных панелях обычно не ожидаемы, но широкие панели (например, панели эпилепсии или панрака) могут идентифицировать клинически значимые результаты, не связанные с показанием к тесту. Ограничивая тест теми генами, которые имеют отношение к данному заболеванию, можно оптимизировать панель для максимального охвата соответствующих областей гена(ов) [55]. Если панель, нацеленная на заболевание, содержит гены нескольких перекрывающихся фенотипов, лаборатории могут ограничить анализ подмножеством генов, связанных с конкретным фенотипом (например, генами гипертрофической кардиомиопатии в широкой панели генов кардиомиопатии), чтобы свести к минимуму количество вариантов неопределенной значимости (VUS), т.к. оценка клинической значимости многих из них очень сложна.

6.2. Секвенирование экзома (ES) исследует кодирующие экзомные, а также близлежащие интронные области генома и требует обогащения этих областей методами захвата или амплификации. Хотя экзом составляет примерно 1–2% генома, он содержит большинство SNV и небольших вставок/делений, ответственных, как уже доказано, за менделевские заболевания. Глубина охвата экзома неравномерна, поэтому аналитическая чувствительность ES может быть ниже, чем у некоторых генных панелей, нацеленных на конкретное заболевание. Ожидается, что секвенирование экзома будет иметь более высокий общий диагностический результат, несмотря на то, что секвенирование по Сэнгеру и другие технологии, обычно используемые для дополнения панелей генов, его удорожают. Аналитическая чувствительность и специфичность ES могут быть

снижены из-за недостаточного охвата или качества покрытия определенных регионов.

2.3. Секвенирование генома (GS) исследует более 90% генома и имеет ряд преимуществ перед диагностическими генными панелями и ES. В отличие от ES, GS не требует методов обогащения перед секвенированием, поэтому обеспечивает более равномерное покрытие экзома. GS обладает повышенной способностью одновременно обнаруживать SNV и CNV, а также сложные варианты, такие как сбалансированные/несбалансированные структурные перестройки (например, транслокации, инверсии и вставки) и повторяющиеся расширения [56]. Охват некодирующих областей ценен для определенных фармакогенетических вариантов и обнаружения вариантов, вызывающих моногенные и полигенные заболевания [57], а также для оценки полигенного риска [58] и создания данных о последовательности митохондриального генома, их анализа и интерпретации. Хотя охват GS более равномерен, глубина считывания обычно ниже, чем у диагностических панелей генов и ES, что может ограничивать обнаружение мозаицизма [59]. Стоимость генерации и хранения данных для GS выше, чем для ES.

В отличие от генных панелей, ES или GS обеспечивают широкий подход для сопоставления обнаруженных вариантов с клиническим фенотипом, определенным лабораторией и поставщиком медицинских услуг [60]. ES может выполняться при отсутствии выявленных клинически значимых вариантов в генах, ассоциированных с определенными заболеваниями, с целью расширения анализа до оставшейся части экзома, если первоначальный анализ не является информативным.

Технологии ES/GS наиболее подходят в следующих сценариях: (1) когда фенотип сложный и генетически гетерогенный; (2) когда фенотип имеет необычные черты, атипичное клиническое течение или неожиданный возраст начала болезни; (3) когда фенотип связан с недавно описанными генами болезни, для которых тестирование, направленное на болезнь, недоступно; (4) когда было проведено целенаправленное тестирование одного гена/панели генов, которое не дало диагностических результатов; (5) когда последовательное тестирование может привести к задержке лечения; или (6) когда фенотип не соответствует выявленному генетическому состоянию, что предполагает возможность более чем одного генетического диагноза, что задокументировано в 4–7% положительных случаев [61, 62, 63, 64]. Если ES/GS не устанавливает диагноз, полученные данные NGS-тестирования можно проанализировать повторно. Необходимо принимать во внимание потенциальное значение вторичных находок при ES/GS.

NGS с использованием платформ для секвенирования коротких фрагментов ДНК (коротких чтений) [65] наиболее часто используют в клинико-диагностических и молекулярно-генетических лабораториях для диагностики наследственных заболеваний и обнаружения соматических вариантов приобретенного рака. Методологию NGS часто применяют для обнаружения вариантов в митохондриальных геномах, для исследования бесклеточных

нуклеиновых кислот, циркулирующих в периферической крови при неинвазивном пренатальном тестировании (NIPT) или обнаружении циркулирующей опухолевой ДНК. Анализы на основе NGS используют для оценки полных геномов, экзотов, панелей конкретных генов, отдельных генов или повторяющихся вариантов «горячих точек». Выбор мишени зависит от конкретного применения и клинической полезности теста, что является важной концепцией в системе здравоохранения.

Ответственность за выбор подходящего теста на основе NGS возлагается на поставщика (заказчика) медицинских услуг. Учитывая большое количество тестов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/>), доступных для клинициста, клиническая лаборатория должна предоставлять рекомендации по выбору теста.

Поставщики - специалисты клинических специальностей, заказывающие тест, должны оценить его чувствительность, специфичность, стоимость и время выполнения исследования для каждой клинической ситуации. Клиническая чувствительность и диагностическая ценность подходов к NGS-тестированию не оценены в полном объеме и продолжают сопоставляться [66, 67, 68, 69, 70, 71, 72]. Лаборатории должны быть доступны для консультаций по телефону, предоставлять для каждого из выполняемых ими NGS-исследований: определение, предполагаемое использование и общие рекомендации по заказу тестов на своем официальном сайте, а также делиться диагностическим опытом.

7. Технологии секвенирования нового поколения

NGS состоит из 3-х основных этапов: подготовка проб, секвенирование и анализ данных [73].

Процесс начинается с выделения геномной ДНК из образца пациента и выбора подходов (целевые панели и ES) для стратегии обогащения, заключающейся в сосредоточении на подмножестве геномных мишеней. Набор коротких фрагментов ДНК (100–500 пар оснований), окруженных адаптерами, является необходимым для большинства доступных в настоящее время платформ NGS.

В целях преобразования образца ДНК в подходящий формат для секвенирования, необходим ряд этапов обработки. Разработано несколько коммерческих платформ секвенирования, каждая из которых способна параллельно секвенировать миллионы фрагментов ДНК. Отличия методов NGS каждой платформы приводят к различиям в общей емкости секвенирования, длине считываемой последовательности, времени его выполнения, а также в конечном качестве и точности данных. Эти характеристики влияют на выбор платформы для конкретного клинического применения.

После завершения этапа секвенирования, результирующие прочтения интерпретируются с помощью комплекса алгоритмов бионформатической

обработки, предназначенных для обнаружения вариантов последовательности ДНК.

Ниже кратко приведены часто используемые этапы подготовки образцов, платформы для секвенирования и методы анализа данных.

Основная пробоподготовка. NGS может быть выполнен на любом типе образца, содержащего ДНК, если качество и количество полученной ДНК являются достаточными. Лаборатория должна указать требуемый тип пробы и количество ДНК на основе данных валидации. Учитывая сложность процедур и вероятность ручных операций, необходимо принятие мер для предотвращения перепутывания проб и для подтверждения окончательных результатов.

Генерация библиотеки. Это процесс создания случайных фрагментов ДНК в определенном диапазоне размеров, содержащих адаптерные последовательности на обоих концах. В каждой конкретной платформе адаптеры дополняют праймеры для ПЦР и секвенирования. Фрагментация геномной ДНК может достигаться несколькими методами, каждый из которых имеет сильные и слабые стороны. Для большинства панелей различных платформ перед секвенированием необходима ПЦР-амплификация библиотеки.

Штрихкодирование (баркодирование). ДНК-штрихкодирование - молекулярная маркировка образцов уникальными кодами на основе последовательностей из трех или более пар оснований, что позволяет объединять образцы пациентов. Таким образом, снижается стоимость обработки каждого образца. Количество образцов, пригодных к объединению, зависит от желаемого охвата (покрытия) секвенируемой области. Штрих-коды используют как часть адаптера или добавляют в процедуру обогащения ПЦР (включен в большинство протоколов).

Целевое обогащение. Если выполняется целевое секвенирование, а GS не выполняется, то гены или интересующие области определяют перед секвенированием. Мишени могут варьироваться от относительно небольшого числа генов (все гены, связанные с конкретным заболеванием) до всего экзона (все известные экзоны, кодирующие белки). Подходы к обогащению мишени выполняют методами, основанными на ПЦР (одиночная, мультиплексная или капельная) или на гибридизации олигонуклеотидов (твердофазные зонды или зонды в растворе).

Платформы для секвенирования. Доступные коммерческие платформы (секвенаторы) основаны на способности проводить множество параллельных химических реакций таким образом, чтобы можно было анализировать отдельные фрагменты. Химические реакции включают секвенирование путем синтеза или секвенирование путем лигирования с обратимыми терминаторами (захват шариков и обнаружение ионов). Каждая платформа характеризуется определенными параметрами, относящимися к требованиям лабораторного проведения тестов, включая мощность прибора, стоимость прибора, время работы, длину считывания и стоимость образца.

Анализ данных. Учитывая огромное количество данных о последовательностях ДНК, создаваемых платформами NGS, крайне важно разработать точные и эффективные алгоритмы обработки и анализа данных, что требует обширной биоинформатической и аппаратной поддержки.

Анализ данных NGS состоит из четырех основных операций: (1) определение оснований, (2) выравнивание прочтений, (3) определение вариантов и (4) аннотирование вариантов.

Определение оснований - это идентификация конкретного нуклеотида, присутствующего в каждом положении в одном прочтении последовательности; эта процедура обычно интегрирована в программное обеспечение прибора с учетом специфики технологии процесса.

Выравнивание прочтений - это правильное позиционирование прочтений коротких последовательностей ДНК (часто 50–400 пар оснований) вдоль генома по отношению к эталонной последовательности.

Определение вариантов - это обнаружение вариантов ДНК в анализируемой последовательности в сравнении с эталонной последовательностью. Точность определения вариантов сильно зависит от глубины охвата последовательностей; увеличенное покрытие улучшает детекцию вариантов. Поскольку некоторые регионы могут иметь низкое покрытие, важно отслеживать позиции, в которых отсутствуют данные о последовательности ДНК или наблюдается их неоднозначное определение, что позволяет определить ограничения тестирования.

Аннотация варианта дополняет информацию о каждом обнаруженном варианте. Алгоритмы аннотаций определяют место нахождения варианта: внутри гена (например, в нетранслируемой области, экзоне, интроне) или рядом с ним и вызывает ли вариант изменение аминокислоты в коде белка. При идеальном раскладе, аннотация будет включать дополнительную информацию, облегчающую интерпретацию ее клинической значимости, т.е. наличие варианта в определенных базах данных, степень эволюционной консервативности кодируемой аминокислоты и прогноз того, является ли вариант патогенным из-за его потенциального влияния на функцию белка, с использованием *in silico* алгоритмов.

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Нормативные требования

Деятельность лабораторий в части, касающейся проведения молекулярно-биологических и молекулярно-генетических исследований, осуществляется на основании лицензии, предоставляемой в порядке, установленном законодательством Российской Федерации, в соответствии с Положением о лицензировании медицинской деятельности Федерального закона от 04.05.2011 № 99-ФЗ «О лицензировании отдельных видов деятельности» и санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями I – IV группы патогенности.

Лаборатории на территории РФ, выполняющие работы с биологическим материалом от больных с подозрением на инфекционные заболевания (в том числе COVID-19, грипп, корь и др.), должны обязательно соблюдать требования нормативно правового акта:

- Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2021 г. N 4 "Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней" (с изменениями и дополнениями), введены в действие с 1 сентября 2021 г. и действуют до 1 сентября 2027 г..

Несоблюдение требований вышеназванного нормативного документа приводит к возникновению угрозы жизни и здоровью человека, способствует распространению новых случаев инфекционных заболеваний. За нарушение санитарного законодательства предусмотрена дисциплинарная, административная и уголовная ответственность (ст. №1, № 39, № 55 ФЗ России №52 от 30.03.1999 «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»; ст 248 УК РФ).

В лабораториях, выполняющих методы амплификации нуклеиновых кислот ПБА, проведение работ организовать в соответствии с общими правилами, установленными в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности».

Организацию комплекса мероприятий по биологической безопасности в медицинской организации в целом обеспечивает ее руководитель, а по подразделениям - их заведующие.

2. Общие требования к организации NGS

2.1. Общие требования к лабораториям

Требования к организации лабораторных помещений, к оснащению, к оборудованию, к штатной численности персонала лабораторий, к проведению молекулярно-биологических и молекулярно-генетических исследований, в том числе с ПБА I-IV групп патогенности методами, основанными на полимеразной цепной реакции (ПЦР) и геномном секвенировании (по Сэнгеру и NGS), к реагентам и расходным материалам регламентируют действующие документы:

- Приказ Министерства здравоохранения РФ от 18 мая 2021 г. N 464н «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований», с изменениями и дополнениями от 23 ноября 2021 г.

- Приказ Минздрава России от 23.11.2021 N 1088н «О внесении изменений в приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 18 мая 2021 г. N 464н Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований (Зарегистрировано в Минюсте России 30.11.2021 N 66103)», Стандарт оснащения клинико-диагностической лаборатории 3 уровня А

Основное оборудование, Молекулярно-генетические исследования; Приложение N 8, Стандарт оснащения микробиологической лаборатории.

- Приказ Минздрава РФ от 21.04.2022 N 274Н "Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи пациентам с врожденными и (или) наследственными заболеваниями", редакция от 21.04.2022 - действует с 31.12.2022, Приложение 3 «Стандарт оснащения медико-генетической консультации (Центра), 8. Стандарт оснащения молекулярно-генетической лаборатории.

Требования к организации работ:

- каждая лаборатория должна определить технологии, подходящие для выполнения молекулярно – генетических исследований, которые она предлагает клиницисту (заказчику), с учетом соблюдения баланса стоимости теста с выгодой для пациента;

- подготовку помещения для установки и эксплуатации системы секвенирования выполнять в соответствии с требованиями соответствующего руководства для пользователя по подготовке рабочего места, с соблюдением техники безопасности;

- каждая лаборатория должна выполнять молекулярно-генетические исследования на основе технологии NGS в соответствии со стандартными операционными процедурами (СОПами), прописанными для всех этапов выполнения анализа (от взятия биоматериала до выдачи результата анализа заказчику) и логистики процессов, в целях обеспечения внутреннего и внешнего контроля качества результатов, а также соблюдения юридических и этических норм Российского законодательства и защиты прав пациента;

- оборудование, реагенты и расходные материалы для проведения исследований с помощью технологии NGS при клиническом применении должны иметь регистрационное удостоверение Росздравнадзора для применения на территории Российской Федерации.

Требования к описанию структурированной информации о клиническом геномном секвенировании в электронных медицинских картах выполнять в соответствии:

- с правилами представления структурированного отчета о клиническом геномном секвенировании для занесения в электронный медицинский архив с упором на геномные данные, созданные посредством технологии секвенирования нового поколения, утверждены ГОСТ Р 58505—2019/ ISO/TS 20428: 2017 ИНФОРМАТИЗАЦИЯ ЗДОРОВЬЯ (Элементы данных и их метаданные для описания структурированной информации о клиническом геномном секвенировании в электронных медицинских картах).

2.2. Требования к специалистам, выполняющим NGS

Исследование материала, подозрительного и/или содержащего микроорганизмы I – IV групп патогенности, имеют право проводить специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим, ветеринарным и иным образованием, окончившие

соответствующие курсы специализации с освоением методов безопасной работы с ПБА I-II групп и/или с микроорганизмами III – IV групп патогенности, получившие дополнительное специальное образование на лицензированных курсах повышения квалификации по ПЦР-диагностике и NGS-секвенированию. Требования к знаниям и умениям специалистов должны соответствовать образовательным стандартам и другим нормативным документам, действующим на территории Российской Федерации.

Клиническое тестирование на основе NGS должны выполнять лица, имеющие соответствующую профессиональную подготовку и сертификат.

Руководитель лаборатории (уполномоченное лицо) должен: (1) иметь сертификат врача-лабораторного генетика и/или врача-генетика; повышение квалификации в области геномики и биоинформатики, молекулярной генетике или фармако-генетике; (2) уметь проводить экспертную оценку вариаций последовательностей и доказывать причинно-следственные связи; (3) обладать техническими знаниями в области технологий NGS и биоинформатики.

Лабораторные специалисты, предлагающие услуги NGS, должны: (1) быть в курсе научных достижений в области клинической генетики для оценки взаимосвязи между генами, вариантами и фенотипами заболеваний; (2) проводить экспертизу исследуемого образца; (3) уметь разрабатывать, проверять тест и критически оценивать полученные данные, что требует подробных практических знаний аналитических процедур, интерпретации данных, методов биоинформатики и управления данными.

Допускается привлечение дополнительного персонала с послевузовским образованием (докторская степень, степень магистра в области генетического консультирования или в смежной области) и/или дополнительной подготовкой в области знаний ассоциации генов и болезней, интерпретации вариантов, для помощи в изучении литературы и других данных, использующихся при оценке вариантов, до их проверки руководителем лаборатории или уполномоченным лицом.

Рекомендована периодическая оценка компетентности лабораторного персонала.

Руководитель лаборатории несет полную ответственность за оценку данных и профессиональную интерпретацию вариантов в контексте фенотипа субъекта.

2.3. Порядок от заказа до получения результата клинического геномного секвенирования

Порядок от заказа до получения результата [74]:

1. Клиницист размещает заказ на проведение NGS, с применением системы электронного медицинского архива.
2. После размещения заказа ответственное отделение выполняет запрос на секвенирование ДНК в службу секвенирования.
3. Служба секвенирования может находиться внутри медицинского

- учреждения или за его пределами.
4. При подтверждении заказа служба секвенирования запрашивает образец от пациента.
 - 5, 6. В отделении медицинской организации осуществляется взятие образца у пациента.
 7. Разрешены к использованию предварительно взятые образцы, например образец из биобанка, образцы, взятые по предыдущим заказам на лабораторные или патологические исследования. Биоматериал пациентов доставляют в лабораторию.
 8. Служба секвенирования осуществляет прием биоматериала, проводит исследование и анализ полученных данных.
 9. Выполняется подготовка отчета.
 10. Отчет направляют в запросившую его медицинскую организацию.
 11. В отчет вносят изменения по электронному медицинскому архиву.
 12. Лаборатория уведомляет клинициста об изменениях.
 13. В результате, направивший заказ клиницист ставит диагноз или проводит соответствующее лечение. Пациенту разрешено получить копию заключения.

3. Рекомендации по проведению процедур, предшествующих внедрению NGS в клиническую практику лаборатории

3.1. Надлежащее использование NGS предусматривает:

- получение фактических данных, позволяющих количественно оценить медицинскую полезность и экономическую эффективность;
- адаптацию использования анализов NGS к конкретным клиническим случаям;
- поддержку создания инновационных моделей для интеграции исследований и разработок в клиническую помощь;
- продвижение масштабируемых данных и разработанных систем для обучения;
- информирование медицинских работников и пациентов об ограничениях и потенциале NGS в медицине.

3.2. Для лаборатории рекомендованы организационные мероприятия:

- оценка клинической полезности молекулярно-генетического теста;
- выбор технологии и платформы NGS;
- разработка диагностической маршрутизации (маршрутизация генетических тестов в лаборатории для конкретного заболевания) [75];
- разработка плана действий для обеспечения правильного анализа вариантов;
- создание вариантов отчетов в диагностической настройке.

3.3. При оценке клинической полезности тестирования NGS рекомендовано учесть [76]:

- влияние на диагностическое мышление и принятие решений клиницистом (отслеживание изменений в дифференциальном диагнозе, влияние на

диагностический путь, изменения в прогностической достоверности и своевременности диагностической информации);

- влияние на терапевтическое руководство и вмешательства, регламентированные нормативными документами, в зависимости от полученных результатов NGS (индивидуальный подход);
- состояние здоровья пациента и связанных с ним исходов (время госпитализации, случаи госпитализации, заболеваемость и выживаемость для конкретного заболевания) и исходы, не связанные со здоровьем (знания, психосоциальная реакция, личная польза, качество решения), на которые прямо или косвенно может повлиять результат теста;
- воздействие на общество (социальные эффекты, влияющие на семью, социальную приемлемость и соотношение цены и качества теста);
- сбалансированность затрат на получение информации о генотипе с затратами и последствиями на индивидуальном и общественном уровнях.

3.4. При выборе технологии рекомендовано учесть [77]:

1. Особенности NGS с короткими прочтениями:

- длина фрагмента: 300–500 п.н.;
 - расходы: низкая стоимость 1 нуклеотида;
 - тип образца/требования к образцу: стандартные методы взятия; фрагментированная ДНК из фиксированных или исторических образцов пригодна для исследования.
- 1.1. Возможности коротких прочтений для обнаружения вариантов:
- SNV, небольшие вставки: технология отработана технически и биоинформатически; высокая чувствительность и воспроизводимость;
 - делеции (до $\sim 1/2$ длины короткого чтения): есть вероятность обнаружения, но требуется подтверждение;
 - дублирование/вставка (до \sim короткой длины) 1/31/3: есть вероятность обнаружения, но требуется подтверждение;
 - CNV: на основе глубины/покрытия с использованием специализированных методов биоинформатики;
 - структурные варианты (инверсии, транслокации): выявляют с помощью специализированных методов биоинформатики;
 - короткий тандемный повтор (STR): обнаружение ограничено небольшим количеством повторов, окруженных уникальной последовательностью; большее количество повторов обнаруживают с помощью специализированных методов биоинформатики;
 - неуникальные регионы: выявляют с помощью специализированных методов биоинформатики;
 - охват геномных регионов: обнаружение ограничено уникальными регионами;
 - справочный материал: хорошо себя зарекомендовал;
 - контрольные образцы: много доступных; подтверждение ортогональное, легко выполняемое секвенированием по Сэнгеру для SNV и indels;
 - клиническое использование: широкое клиническое применение.

2. Особенности NGS с длинными прочтениями:

- длина фрагмента: 10–30 кб, что типично, но возможно > 100 кб, в зависимости от метода;
- расходы: более высокая стоимость за базу;
- тип образца/требования к образцу: требуются специальные методы изоляции для сохранения длинных фрагментов; ДНК из фиксированной ткани или исторических образцов непригодна из-за фрагментации.

2.1. Возможности длинных прочтений для обнаружения вариантов:

- SNV, небольшие вставки: точность и чувствительность сравнимы с технологией короткого считывания; точность и чувствительность определения indels ниже, чем у технологии короткого считывания;
- делеции (до $\sim 1/2$ длины короткого чтения): обнаруживают из-за длины чтения;
- дублирование/вставка (до \sim короткой длины) 1/31/3: обнаруживают из-за длины чтения;
- CNV: обнаруживают из-за длины чтения;
- структурные варианты (инверсии, транслокации): обнаруживают из-за длины чтения;
- короткий тандемный повтор (STR): выравнивание в большинстве повторяющихся областей возможно из-за длины чтения;
- неуникальные регионы: выравнивание в большинстве гомологичных областей возможно из-за длины чтения;
- охват геномных регионов: выравнивание наибольшей части геномных регионов;
- справочный материал: появляется в доступе;
- контрольные образцы: в доступе несколько хорошо охарактеризованных образцов; подтверждение ортогональными методами для больших или сложных типов вариантов различается и трудно выполнимо;
- клиническое использование: наилучшая клиническая практика пока не установлена.

3.5. При выборе подходящей платформы рекомендовано оценить [78, 79]:

- стоимость секвенатора;
- время работы;
- длину прочтения;
- использование по назначению;
- регион (ы) для секвенирования;
- требуемую глубину охвата (покрытия);
- пропускную способность;
- частоту ошибок;
- прогнозируемый объем пробы;
- требования к срокам выполнения работ;
- стоимость выполнения секвенирования;
- обеспечение анализа и интерпретации;

- стоимость анализа и хранения данных.

3.6. При выборе платформы для секвенирования рекомендовано учесть характеристики [80]:

1. Метод Сэнгера:

- преимущества: широко доступен, прост в использовании, низкокзатратен, если требуется исследовать небольшое число мишеней;
- недостатки: крайне низкая пропускная способность, ампликоны (часто не более 1000 п.н.) должны быть индивидуально амплифицированы и секвенированы, дорогостоящий метод для анализа полных геномов, не подходит для метагеномики;
- длительность рабочего цикла: обычно несколько часов;
- пропускная мощность: 100 Кб – 2 Мб за один прогон;
- сравнение затрат: относительно невысокая стоимость при использовании немногочисленных мишеней.

2. *Illumina* (iSeq, MiniSeq, MiSeq, NextSeq, HiSeq, NovaSeq):

- преимущества: возможно достичь крайне высоких показателей производительности (выхода) секвенирования, очень высокая точность, секвенаторы iSeq портативны, методы обработки данных четко установлены;
- недостатки: высокая стоимость приобретения и технического обслуживания, за исключением *Illumina* iSeq, по сравнению с некоторыми другими платформами, максимальная длина считывания 2 x 300 п.н.;
- длительность рабочего цикла: 10–55 ч, в зависимости от прибора;
- пропускная мощность: 1,2–6000 Гб, в зависимости от прибора;
- сравнение затрат: высокая стоимость пусконаладочных работ и технического обслуживания, умеренные эксплуатационные расходы.

3. *Oxford Nanopore Technologies* (Flongle, MinION, GridION, PromethION):

- преимущества: портативная аппаратура, прямое секвенирование, получение данных в режиме реального времени, низкая стоимость пусконаладочных работ и технического обслуживания, есть возможность прекратить секвенирование, как только будет получен достаточный объем данных, достижима крайне высокая длина считывания;
- недостатки: трудности со считыванием гомополимерных участков, частота ошибок считывания составляет $\approx 5\%$ (при использовании проточных ячеек R9.4), для получения высокоточных консенсусных последовательностей решающее значение имеет применение надлежащих биоинформационных алгоритмов, метод пригоден для определения внутривидовых вариаций только при использовании репликативного секвенирования;
- длительность рабочего цикла: результаты доступны немедленно, процесс считывания и наблюдения по мере необходимости можно продолжать в течение ряда дней;
- пропускная мощность: от < 2 Гб для проточных ячеек Flongle до 220 Гб для PromethION, на котором можно использовать до 48 проточных ячеек;
- сравнение затрат: не требуется техническое обслуживание, низкие затраты

на запуск прибора, умеренные эксплуатационные расходы.

4. *Ion Torrent*:

- преимущества: короткий рабочий цикл секвенирования;
- недостатки: трудности со считыванием гомополимерных участков, дорогостоящая аппаратура, в типичных случаях максимальная длина считывания около 400 п.н.;
- длительность рабочего цикла: 2 часа – 1 день, в зависимости от чипа и устройства;
- пропускная мощность: 30 Мб–50 Гб в зависимости от чипа и устройства;
- сравнение затрат: умеренная стоимость.

3.7. *При оценке затрат и полезности клинического анализа NGS учитывать:*

- общую стоимость исследования, которая может включать рефлексорное тестирование или каскадное семейное тестирование и пренатальную диагностику;
- возможность выявления нарушений в генах, мало связанных с клиническими проявлениями болезни, что способствует большому количеству вариантов неизвестного клинического значения (VUS);
- необходимость выявления и регистрации вариантов только тех генов, для которых достаточно доказательств участия в исследуемом заболевании;
- время, затрачиваемое на оценку/интерпретацию выявленных вариантов, включая случайные находки, а также стоимость генетического консультирования до и после тестирования;
- в случае клинического подозрения на специфическое заболевание с четко определенным фенотипом или известным набором соответствующих генов, анализ целевого набора генов обеспечит более рентабельный подход;
- в случае применения генной панели *in silico*, анализ затрат должен включать необходимость ортогонального тестирования для обеспечения адекватного охвата ключевых генов в случае отрицательного результата теста.

3.8. *Рекомендации по организации предтестового и послетестового медико-генетического консультирования [81]*

1. *Предтестовое консультирование*

- должно проводиться врачом-генетиком или аффилированным консультантом-генетиком и должно включать процесс получения информированного согласия;
- перед началом WGS/WES участники должны быть проинформированы об ожидаемых результатах тестирования, вероятности и типе случайных находок, которые могут быть получены, а также о том, какие результаты будут или не будут раскрыты;
- в рамках предтестового консультирования следует проводить четкое различие между клиническим и исследовательским тестированием;
- во многих случаях результаты будут включать варианты неизвестного значения, которые могут быть предметом дальнейшего изучения, поэтому

для этих случаев должен быть разработан протокол, утвержденный экспертным советом учреждения, и должно быть получено соответствующее предварительное обоснованное согласие участника.

2. Послетестовое консультирование

- генетические услуги и другие соответствующие вмешательства специалистов, связанные с клинически значимыми результатами, должны быть доступны для всех специалистов, и в том числе лиц, проходящих тестирование;
- пациентам должна быть предоставлена возможность не получать определенные данные генотипа или вторичные находки;
- при возникновении исключительных обстоятельств, их необходимо рассматривать разумно в каждом конкретном случае путем консультаций между врачом, назначающим лечение, и заведующим лабораторией;
- принятие соответствующих медицинских решений должно осуществляться квалифицированным клиническим генетиком, работающим непосредственно с пациентом и его семьей;
- клинические лаборатории должны обмениваться данными WGS/WES-генотипирования в общедоступных базах данных для быстрой генерации информации, в целях улучшения лечения.

3.9. Рекомендации по разработке контрольных списков (информационных бюллетеней) для заказчиков различных клинических профилей согласно показаниям, адаптированных для пациентов и их потребностей [82]

1. *Контрольный список перед тестом* должен определять стратегии коммуникации для заказчиков и информировать пациентов:
 - об аналитических и интерпретационных ограничениях тестирования;
 - о потенциальных последствиях результатов теста для биологических родственников;
 - об объеме вариантов данных, доступных в конкретном тесте;
 - о широком спектре доказательств, подтверждающих эти варианты;
 - о выборе и последствиях принятия или отклонения этой информации.
2. *Контрольный список после теста* должен подсказать врачу и пациенту план действий:
 - при постановке окончательного диагноза;
 - при постановке *возможного* диагноза;
 - при отсутствии диагноза;
 - при необходимости оценки вторичных находок;
 - при необходимости повторного анализа генотипа пациента;
 - при необходимости дополнительного исследования для пациента и/или членов его семьи.

4. Разработка и проверка теста

4.1. План мероприятий:

1. Создать стратегию по разработке тестов.
2. Определить заведомо известные варианты, которые будут обнаружены в исследуемых генах или областях генома.

3. Установить к использованию различные комбинации приборов, реагентов и биоинформатических алгоритмов.
 4. Оценить преимущества и ограничения выбранной технологии секвенирования.
 5. Рассмотреть возможную потребность в дополнительных вспомогательных технологиях для адекватного покрытия целевого спектра патогенных вариантов и количество времени, необходимое для исследования.
 6. Прогнозировать время оборота теста с учетом п.5.
 7. Определить компоненты для тестирования, каждый из которых далее помечать как реагент, специфичный:
 - для анализа/ASR: последовательности нуклеиновых кислот и аналогичные реагенты, которые посредством специфического связывания или химических реакций с веществами в образце предназначены для использования в диагностических целях;
 - для исследовательского использования/IUO: реагенты, инструменты или тест- системы, используемые в клинических исследованиях или исследованиях с участием одного или нескольких субъектов для определения безопасности и эффективности устройства;
 - только для исследовательского использования/RUO: не для диагностических процедур.
 8. Установить уровень валидации для каждого компонента, использованного для тестирования NGS, в зависимости от предполагаемого клинического применения [83]
 9. Разработать этапы проведения полной валидации каждого теста NGS.
 10. Установить предел обнаружения (LoD, требует серии разведений охарактеризованного образца) для определения соответствующей глубины секвенирования и проверки биоинформатических алгоритмов; для соматического тестирования – обязательно, для выявления конституциональных/зародышевых мутаций – не обязательно.
 11. Во избежание ложноположительных результатов, предусмотреть проведение валидации с помощью подтверждающего тестирования, идентифицирующего каждый класс вариантов, на основе специфических для лаборатории показателей качества, взятых из большого и разнообразного набора данных, и визуальной проверки выравнивания считываний.
 12. При отсутствии валидированного подхода, лаборатории должны выполнять ортогональное подтверждение вариантов [84].
 13. Предусмотреть возможность случаев, когда альтернативный тест не подтверждает результат NGS.
 14. Учитывать затраты на разработку тестов, аналитическую чувствительность и специфичность, а также сложность анализа.
- 4.2. *Справочные материалы* [77].
- Лаборатория должна:*
1. Использовать эталонные/референсные материалы для валидации

испытаний, контроля качества и проверки квалификации.

2. Принимать во внимание, что внутренние пробы, оцененные ортогональными методами, также пригодны к использованию в качестве стандартных образцов.

4.3. Биоинформатические конвейеры (алгоритмы).

Лаборатория должна:

1. Разработать и оптимизировать биоинформатические конвейеры отдельно от процессов «мокрой лаборатории», в ходе первоначальной разработки теста путем анализа данных, содержащих известные варианты последовательностей различных типов (например, SNV, небольшие вставки, внутригенные или крупные CNV, структурные варианты).
2. Развертывать оптимизированный биоинформатический конвейер при каждом анализе результатов сквозного тестирования.
3. Документировать все данные о валидации, предоставленные поставщиком и провести независимую валидацию при использовании программного обеспечения, разработанного на коммерческой основе.
4. Документировать все аппаратное обеспечение, программное обеспечение, базы данных (включая версии и дополнительные системы) а также любые модификации, в случае использования на этапе валидации теста.

4.3.1. Определение оснований [77].

Лаборатория должна:

1. Использовать программное обеспечение с наличием модулей для определения оснований (для уменьшения числа ошибок, связанных с конкретной платформой): в секвенатор встраивается соответствующий алгоритм для конкретной платформы → каждое основание связано с показателем качества, обеспечивающим оценку достоверности (аналогично Phred).

4.3.2. Выравнивание прочтений [77].

Лаборатория должна:

1. Выбрать один или несколько биоинформатических инструментов с открытым исходным кодом для выравнивания прочтений на референсный геном.
2. В случае, если процесс выравнивания затруднен (захваченные области включают гомологичные последовательности), улучшить его за счет более длинных или парных считываний концов.
3. Проводить выравнивание с полным референсным геномом, даже при тестировании ES, чтобы уменьшить неправильное картирование (выравнивание) прочтений из-за нецелевого захвата, если уникальный выбор целевых мишеней не обеспечен.

4.3.3. Определение вариантов и аннотация [77].

Лаборатория должна:

1. Принимать во внимание, что увеличение глубины секвенирования и удаление повторяющихся прочтений повышает точность определения одного или нескольких вариантов.

2. Использовать алгоритмы для обнаружения вставок и делеций, внутригенных или крупных CNV, экспансии повторов, вариантов в областях высокой гомологии, митохондриальных вариантов и структурных хромосомных перестроек (например, транслокаций, инверсий):
 - локальное повторное выравнивание после глобального выравнивания обеспечивает более точное определение вариантов типа indel;
 - большие делеции и дубликации обнаруживаются сравнением области фактической глубины считывания с ожидаемой глубиной считывания с помощью картирования считывания парных концов (независимые считывания, которые связаны с одним и тем же фрагментом библиотеки);
 - транслокации и другие структурные перестройки также идентифицируются картированием парных концов (соединенные фрагменты с больших геномных расстояний).
3. Добиться, чтобы программное обеспечение аннотировало вариант с соответствующими данными: координаты генома, номенклатура кодирующей последовательности, номенклатура белка и положение относительно гена (генов) (например, нетранслируемая область, экзон, интрон).
4. Обеспечить включение в аннотацию дополнительной информации (из внешних источников), облегчающей определение ее аналитической достоверности и клинической значимости (например, показатели качества и частота аллелей во внутренних и внешних наборах данных).

4.3.4. Определение фазы [77].

Лаборатория должна:

1. Проводить корректировку биоинформатических конвейеров: если очень сложно аннотировать два варианта, расположенные близко друг к другу, последствия двух замен следует рассматривать вместе (например, два соседних изменения триплетного кодона для данной аминокислоты могут отличаться от каждого изменения, рассматриваемого отдельно), хотя каждый вариант замены обычно заносят в таблицу отдельно.
2. Проводить мануальное курирование: если в одном и том же гене идентифицировано более одного варианта, важно определить их расположение (на одной и той же хромосоме (в цис) или противоположных хромосомах (в транс)), фазу можно определить по стандартным прочтениям NGS, если разница в геномных позициях для вариантов меньше длины прочтения.
3. Применять новые технологии на основе секвенирования с короткими прочтениями для определения фазы у одного человека.

4.3.5. Форматы файлов [77].

1. Данные прочтения последовательности, предоставляемые в результате теста NGS, должны соответствовать одному из широко используемых форматов (файлы BAM - для выравнивания, файлы FASTQ - для прочтений последовательностей) или иметь возможность легко преобразовываться в

стандартный формат вариантов (VCF).

2. Многие форматы геномных файлов поддерживаются GA4GH в качестве международных стандартов (<https://www.ga4gh.org/genomic-data-toolkit/>).

4.3.6. Процессы фильтрации вариантов.

1. Для упрощения и автоматизации конвейеров фильтрации на основе отчетных данных, необходимых для данного теста, рекомендованы различные подходы:
 - процессы фильтрации изначальных вариантов должны максимизировать аналитическую чувствительность и минимизировать ложноотрицательные результаты;
 - для повышения специфичности проводить последующую фильтрацию, т.е. лаборатория должна установить серию фильтров с параметрами включения и исключения вариантов (т. е. фильтровать в сравнении с фильтрацией извне), основанных на условных свойствах, точно и надежно идентифицирующих варианты, подлежащие вынесению в отчет для данного теста;
 - проводить ручным способом просмотр вариантов, отфильтрованных из данного теста, в случае необходимости.

4.4. Анализ и оптимизация данных перед проверкой [77].

1. В ходе оптимизации всех условий анализа, лаборатория должна сначала определить базовые параметры и их минимальные пороговые значения, определяющие приемлемое качество секвенирования для каждого типа образца, посредством систематической оценки проведенного анализа NGS.

4.5. Требования к образцу [77].

Лаборатория должна:

1. Рассматривать любой образец биоматериала, содержащий ДНК, как пригодный для исследования анализами NGS.
2. Установить типы образцов и минимальное количество исходной ДНК, необходимое для конкретного анализа NGS и используемой платформы.
3. Определить приемлемые параметры для каждого типа образца (например, объем, количество, устройство для сбора биоматериала), т.к. требования к качеству ДНК и обнаружению вариантов различаются, в зависимости от типа образца.
4. Принимать к тестированию ранее выделенную геномную ДНК, если определен ее первоначальный источник (например, кровь, слюна).

4.6. Требования к ДНК и обработка [77].

Лаборатория должна:

1. Установить минимальные количественные требования к ДНК для проведения теста, с учетом количества ДНК, которое может потребоваться для подтверждающих и последующих процедур.
2. Утвердить письменные протоколы выделения и количественного определения ДНК (например, флуорометрия, спектрофотометрия) для получения надлежащего качества, количества и концентрации ДНК.

3. Рассчитать нижний предел обнаружения ДНК (L_{LoD}, наименьшее количество ДНК, приемлемое для теста), т.е. наименьшее количество аналита, которое будет генерировать не менее 95% положительных результатов среди всех истинно положительных результатов.
4. Определить начальный нижний L_{LoD} и верхний LoD (U_{LoD}) пределы обнаружения с помощью оценки серийных разведений различных исходных ДНК из нескольких типов образцов.
5. Определить L_{LoD} и U_{LoD} для каждого предполагаемого типа варианта, включая образцы со смешанным содержимым (например, мозаицизм, химеризм, митохондриальная гетероплазмия), полученные в результате объединения двух образцов чистой ДНК с разным процентным содержанием.
6. Ввести окончательный L_{LoD}, представленный показателем охарактеризованных образцов в сочетании с исследуемыми образцами при аналитической валидации, чтобы гарантировать сохранение качества и рабочих параметров во всех окончательных спецификациях анализа.

4.7. *Покрытие [77].*

Лаборатория должна:

1. Учитывать, что большая глубина покрытия обеспечивает высококачественные чтения последовательностей.
2. Установить минимальную глубину прочтения, необходимую для определения вариантов, и сообщать об аналитических характеристиках, связанных с минимальным порогом, который гарантирован для определенных целевых генов или регионов.
3. Принять во внимание, что средняя глубина покрытия легкодостижима в качестве альтернативы общей производительности анализа.
4. Рассмотреть другие полезные показатели качества данных: процент прочтений, выровненных с геномом, процент уникальных прочтений (до удаления дубликатов), процент оснований, соответствующих целевым последовательностям, однородность покрытия и процент целевых участков без покрытия.
5. Указывать трудно секвенируемые области генома, как техническое ограничение теста и уменьшить его влияние на клиническую чувствительность с помощью вспомогательных технологий, дополняющих окончательное тестовое предложение.

4.8. *Аллельная фракция и зиготность [77].*

Лаборатория должна:

1. Определить долю мутантного аллеля для отличия истинных от ложноположительных вариантов, обычно имеющих низкую аллельную фракцию.
2. Определить зиготность.
3. Обнаружить мозаицизм или гетероплазмию.
4. Иметь представление как зиготность определяется биоинформатическим конвейером, как она представлена и установить долю мутантного аллеля,

необходимую для окончательного определения зиготности на основе эмпирических данных.

5. Исследовать фракции аллелей ортогональными методами для определения неоднозначной зиготности или потенциального мозаицизма.
6. Пересмотреть охват гомозиготных варинатов, чтобы различить истинную гомозиготность от потенциальной гемизиготности (у организма один или несколько генов не парные, т. е. не имеют аллельных партнёров) из-за делеции второго аллеля.
1. Отдельно анализировать качество покрытия различных типов вариантов, т.к. она может различаться.

4.9. Факторы, влияющие на качество данных.

Лаборатория должна:

1. Определить факторы, влияющие на клинические образцы, снижающие качество или количество результирующих данных о последовательности: (1) различные подходы к подготовке NGS-библиотек, химические процессы секвенирования и платформы, способствующие низкой частоте ошибок, (2) загрязнители, уменьшающие количество геномной последовательности, доступной для анализа, (3) значительную межоператорскую изменчивость на начальном этапе оптимизации, снижающую безупречность анализа для клинического применения.

4.10. Установление показателей контроля качества и параметров производительности перед валидацией [77].

Лаборатория должна:

1. Разработать показатели контроля качества на установленных параметрах производительности в ходе предварительной разработки анализа, которые будут применяться при валидации и в производстве.
1. Выбрать показатели контроля качества: (1) для контроля целостности образца и данных для демонстрации того, что каждый анализ соответствует требуемой глубине покрытия и качеству для целевых областей (например, генома, экзома или панели) и (2) для типов вариантов, определенных в дизайне теста.
2. Задokumentировать, что анализ NGS обеспечивает правильную идентификацию *известных* вариантов нескольких типов.
3. Принимать во внимание: (1) максимальное увеличение количества вариантов различных типов в целевых регионах обеспечивает достоверность и надежность анализа, (2) варианты, включенные в анализ, не обязательно должны быть патогенными, поскольку это не влияет на их выявляемость, однако, отсутствие большого количества установленных патогенных вариантов при разработке и валидации тестов может привести к непредвиденным погрешностям анализа.
4. Оценить и соблюдать на этапе оптимизации, а также официально задokumentировать во время валидации: точность, воспроизводимость, аналитическую специфичность, аналитическую чувствительность, предел

обнаружения и клиническую чувствительность для каждого типа варианта, о котором лаборатория планирует сообщать.

5. Указать показатели производительности (п.4) для всего анализа в целом и для каждого сообщаемого типа варианта, когда это уместно (например, SNV, CNV, вставки и делеции).

4.10.1. Точность [77].

Лаборатория должна:

1. Измерять точность обнаружения для разных типов вариантов, включая события разного размера в пределах типа варианта, путем вычисления положительных и отрицательных прогностических значений на основе заданного набора истинности с включенными доверительными интервалами.
2. Установить параметры для достаточной повторяемости и воспроизводимости.
3. Принимать во внимание, что в зависимости от сложности анализа ожидаемо некоторое отличие в описании варианта.
4. Контролировать надежность анализа (точность, чувствительность, специфичность) сразу после секвенирования и принимать адекватные меры контроля качества для оценки в критических точках (например, подготовка библиотеки).

4.10.2. Аналитическая специфичность и чувствительность [77].

1. Аналитическая специфичность должна быть >98%.
2. Аналитическая чувствительность должна быть >98%.

4.10.3. Клиническая специфичность и чувствительность.

Лаборатория должна:

1. Для целевых панелей: (1) установить предполагаемую клиническую чувствительность теста на основе комбинации параметров аналитических характеристик целевого набора генов и типов вариантов, обнаруживаемых для искомого заболевания, (2) максимизировать клиническую специфичность, исключая гены с ограниченными или спорными данными связи с фенотипом, сводя к минимуму обнаружение VUS.
2. Учитывать, что для ES/GS: у лиц с не выявленными (и, возможно, негенетическими) нарушениями невозможно рассчитать теоретическую клиническую чувствительность или специфичность теста, из-за его зависимости от применяемого метода NGS-диагностики и показаний для тестирования.

4.11. Тестовая проверка [77].

Лаборатория должна:

1. Подготовить и выполнить план валидации от начала до конца для всех допустимых типов проб.
2. Обеспечить соответствие характеристик эффективности анализа (аналитическая чувствительность и специфичность, правильность и

прецизионность) пороговым значениям, заранее определенным в плане валидации.

4.11.1. Пример первоначальной валидации/проверки теста [77].

1. Первый тест, разработанный лабораторией, обычно подлежит более подробной всесторонней проверке, чем последующие тесты, выполненные на той же платформе с использованием той же базовой схемы биоинформатического конвейера.
2. На практике может потребоваться секвенирование большего числа образцов для проверки достаточности количества каждого типа варианта.

4.11.2. Биоинформатика [77].

Лаборатория должна:

1. Контролировать выдачу биоинформатическим конвейером ожидаемых результатов, полученных с помощью оборудования для секвенирования.
2. Установить воспроизводимость выбранного аналитического конвейера таким образом, чтобы заданный стандартный ввод давал один и тот же результат при каждом запуске.
3. Принять во внимание, что дополнительные ограничения конвейера (например, недостаточная точность идентификации последовательности в повторяющихся областях генома) могут быть выявлены во время проверки и должны обсуждаться в сводке проверки.

4.11.3. Оценка показателей качества [77].

Лаборатория должна:

1. Контролировать на протяжении всей валидации показатели контроля качества, установленные на этапе предварительной валидации для каждого анализа.
2. В случае выявления отклонений от ожидаемых значений, внести изменения в протокол выполнения процедур на этапе валидации испытаний, с последующим обсуждением в сводке по валидации.

4.11.4. Внедрение теста NGS в практическую деятельность лаборатории

Лаборатория должна:

1. Обобщить окончательную оценку всех установленных рабочих параметров, с целью поддержки внедрения клинического испытания в практическую деятельность.
2. Описать в сводке валидации и отразить в окончательной утвержденной версии теста любые отклонения или дополнительные ограничения производительности теста, выявленные во время валидации.
3. В случае несоответствия теста нескольким параметрам производительности, провести повторную оптимизацию, с последующими валидационными исследованиями.
4. После проверки пригодности теста для практического использования, проанализировать 2–3 тестовых образца в рабочем лабораторном процессе, чтобы выявить любые непредвиденные нарушения.

4.12. Проверка измененных компонентов теста или платформы [77]

4.12.1. Контроль версий

Лаборатория должна:

1. Проверить и задокументировать тесты посредством контроля версий.
2. Регистрировать даты и время внесения изменений для контроля за эффективностью клинических испытаний.
3. Указать в разделе «Методы» клинического отчета варианты теста и/или его компоненты.

4.12.2. Изменения условий анализа, реагентов, инструментов и аналитических алгоритмов.

Лаборатория должна:

1. Проверить до запуска в практическую деятельность лаборатории любые изменения в реагентах, оборудовании и программном обеспечении, способные повлиять на точность окончательного результата теста (например, новый химический анализ секвенирования, новые инструменты, новые партии реагентов для захвата, новые версии программного обеспечения), провести сквозную проверку с использованием ранее проанализированных образцов или хорошо охарактеризованных контролей, причем лучше применять одни и те же возобновляемые и хорошо охарактеризованные образцы.
2. Повторно определить аналитическую производительность и другие параметры (например, покрытие).
3. Провести сравнение новых партий реагентов с предыдущими или с подходящим эталонным материалом до или одновременно с их использованием в практической деятельности лаборатории.
4. Провести дополнительный анализ ранее полученных данных для определения сильных и слабых сторон аналитических конвейеров с течением времени, что может помочь в разработке тестов в будущем, несмотря на дорогостоящее хранение данных.
5. Повторно проверить любые изменения или улучшения конвейера анализа данных, соизмеримо со сложностью или величиной изменений (например, изменения в выравнивании и базовом определении варианта потребуют более тщательной проверки, чем обновления версий загруженных баз данных).

4.12.3. Добавлен/изменен тестовый контент

Лаборатория должна:

1. Принимать во внимание, что в случае каких либо изменений обеспечения валидированного теста (включение анализа дополнительных генов в тестовую панель с использованием информации о покрытии в ранее проверенной библиотеке, платформы и конструкции биоинформатического конвейера; использование новой библиотеки с применением проверенной платформы и последовательности алгоритмов биоинформатического конвейера; обновление оборудования или анализа (например, реагентов, алгоритмов биоинформатической обработки или обновлений программного обеспечения) в ранее проверенной панели)), может быть

достаточным проведение сокращенной сквозной валидации или валидации *in silico* (3–10 образцов).

2. Создать отдельный пакет документации по валидации и задокументировать дату внедрения в практическую деятельность лаборатории.
3. Проводить проверку состава генов в панелях каждые 6 месяцев.

4.13. Рекомендации по проведению распределенного тестирования [77].

1. Некоторые процедуры лабораторного исследования могут выполняться в сторонней лаборатории (например, секвенирование выполняется в одной лаборатории, а анализ и составление отчета – в другой). В таком случае лаборатория должна убедиться, что сторонняя лаборатория аккредитована и лицензирована, применяет в работе согласованные показатели проверки и качества, предоставляет способ уведомления о процедурных отклонениях и отклонениях в качестве.
2. В соответствии с международными руководствами, валидация любого теста, проводимого при распределенном тестировании, должна включать комплексную валидацию, включающую процедуры «мокрой лаборатории» и биоинформатики.
3. Любое распределительное тестирование должно быть указано в плане управления контролем качества лаборатории и включать типы данных, подлежащих передаче.

4.14. Стандарты отчетности [77].

4.14.1. Время оборота

Лаборатория должна:

1. Разработать стандартные операционные процедуры (СОПы) для определения приоритетности тестов NGS и сроков выполнения (ТАТ).
2. Соблюдать условие, что ТАТы должны быть клинически приемлемыми и позволять проводить быстрое тестирование.
3. Разработать план уведомления поставщиков услуг (заказчиков), в случае значительной задержки получения результата.

4.14.2. Фильтрация и интерпретация данных

4.14.2.1. Фильтрация вариантов

Лаборатория должна:

1. Применять метод фильтрации для исследований ES/GS.
2. Использовать стратегии автоклассификации для очень больших панелей, нацеленных на заболевания.
3. Уравновешивать чрезмерную фильтрацию, непреднамеренно исключая варианты, являющиеся причиной заболевания, с недостаточной фильтрацией, предоставляющей слишком много вариантов для экспертного анализа.
4. Применять поэтапный подход: на начальном этапе фильтрации идентифицировать доброкачественные варианты и варианты, вызывающие заболевание, после чего провести другую фильтрацию, основанную на фенотипических ассоциациях и моделях наследования.

5. Описать свои методы фильтрации и оценки вариантов, включая ограничения каждого метода, независимо от подхода.

4.14.2.2. Дополнительная ориентированная на пациента фильтрация данных ES/GS

1. Заказчик/поставщик медицинских услуг должен предоставить подробную информацию о фенотипе пациента, чтобы помочь лаборатории в анализе и интерпретации результатов теста, что важно при исследовании панелей, ориентированных на большое количество генов, ES и GS.
2. Интерпретацию и приоритизацию вариантов в лаборатории можно улучшить за счет повторяющегося процесса взаимодействия с заказчиками анализов NGS, с целью пересмотра полученных данных генотипа на предмет наличия ассоциации с конкретными клиническими признаками возможных потенциальных диагнозов у пациента.
3. Заказчики молекулярно-генетических исследований должны взаимодействовать с лабораторией, даже если ES/GS не является диагностическим, т.к. лабораторные специалисты учитывают фенотип при приоритизации вариантов.
4. Информация о фенотипе индивидуума может помочь сообщить о вариантах с сомнительным фенотипическим соответствием (актуально для детей раннего возраста, у которых могут не проявляться все диагностические признаки синдрома).
5. Лаборатории должны поддерживать и регулярно обновлять списки генов с соответствующими уровнями доказательности, связывая их с дискретными фенотипами и/или состояниями.
6. Списки генов подлежат проверке не реже одного раза в 6 месяцев.
7. Для более быстрого анализа данных, с использованием фенотип-ориентированной фильтрации, рекомендовано хранить информацию о фенотипах пациентов со структурированной онтологией.

4.14.2.3. Классификация вариантов

1. Классификация вариантов требует специальной подготовки для оценки ассоциации «ген – заболевание» и доказательств клинической значимости вариантов.
2. Потенциально клинически значимые варианты рекомендовано оценивать и классифицировать в соответствии с передовой практикой, изложенной в руководствах ACMG/AMP.
3. Оценка варианта должна включать основанную на доказательствах оценку патогенности варианта, а также его потенциальную роль в фенотипе индивидуума.
4. Для ES, GS и тестов, охватывающих широкий спектр фенотипов (например, кардиомиопатия или умственная отсталость), рекомендовано оценивать корреляцию между фенотипами, которые, как известно, связаны с вариантом и фенотипом индивидуума.
5. В случае идентификации нескольких вариантов потенциального клинического значения, интерпретация должна обсуждать вероятное

соответствие каждого варианта фенотипу, включая возможность параллельных диагнозов, приводящих к потенциальному смешанному фенотипу, и в соответствии устанавливать приоритетность вариантов.

6. Лаборатории должны депонировать интерпретированные варианты с подтверждающими доказательствами и критериями в национальную базу данных, что позволит выявлять различия в интерпретации и даст возможность быстро обмениваться и накапливать знания, улучшающие диагностику и лечение.

4.15. *Рекомендации по сообщению о результатах диагностического NGS [77]*

Лаборатория должна:

1. Рассмотреть целенаправленный подход к анализу данных секвенирования нового поколения.
2. Иметь четкое представление о клиническом фенотипе пациента для эффективности целенаправленного подхода, с использованием целевого захвата генов или секвенирования экзона с биоинформатической фильтрацией.
3. Отсрочить выполнение экзомного или широкопанельного секвенирования до получения от клинициста клинической информации о пациенте в достаточном объеме, исключение допустимо для новорожденных, находящихся в отделениях интенсивной терапии, где анализ критичен по времени и фенотип пациента может быстро меняться.

14.15.1. *Сообщение о вариантах неопределенной значимости (VUS)*

Лаборатории предложены категории идентификации VUS : (1) в генах, связанных с клиническим фенотипом, когда недостаточно доказательств патогенности; (2) в генах еще не связанных с заболеванием, но их биологическое функционирование в некоторой степени известно [85]; (3) в генах, которые, как известно, вызывают заболевание, но не имеют отношения к клиническому вопросу (т. е. UF неопределенного значения).

Лаборатория должна:

1. Ограничить анализ генами, которые, как известно, вызывают заболевание, независимо от того, связаны ли они с клиническим вопросом [86].
2. Сообщать «только явно причинные варианты или очень сильные варианты-кандидаты, которые предполагают или предсказывают функциональные нарушения и требуют дальнейшего тестирования семьи» [87].
3. Сообщать о VUS (1) категории (т. е. когда ген известен, имеет отношение к клиническому вопросу, но не имеет достаточных доказательств патогенности).
4. Учитывать, что решение о необходимости сообщать об одном VUS в гене с аутосомно-рецессивным типом наследования будет зависеть от уровня охвата этого гена (т.е. вероятности того, что другой потенциально причинный вариант был пропущен в анализе) или известной частоты мутаций, которые невозможно обнаружить с помощью этой конкретной технологии, и степени, в которой VUS может быть частью ответа для

пациента.

5. Сообщать клиницистам о VUS, идентифицированном в генах, еще не связанных с заболеванием, но при наличии доказательств того, что вариант может быть причиной фенотипа пациента.
6. Сообщать о VUS (2) категории (т. е. когда ген еще не связан с заболеванием, но его биологическое функционирование в некоторой степени известно).
7. Не сообщать о VUS в генах, не связанных с фенотипом пациента, в том числе в известных болезнетворных генах, не связанных с клиническим вопросом.
8. Сообщать о VUS, таким образом, чтобы отличать их от вероятно патогенных или патогенных мутаций (например, на отдельной странице отчета или в таблице), причем доказательства должны быть представлены в отчете с изложением причин их классификации.
9. Передавать в соответствующую базу данных любые зарегистрированные VUS вместе с фенотипическими данными, чтобы помочь в диагностике других пациентов.

4.15.2. Сообщение о случайных и вторичных находках

Лаборатория должна:

1. Использовать термины «случайные/UF» или «вторичные/SF» находки, в зависимости от цели идентификации, для описания неожиданно выявленных клинически значимых вариантов.
2. Тщательно продумать, о каких вариантах сообщать во вторичных результатах.
3. Продумать действия после получения непредвиденных результатов.

4.15.2.1. Сообщение о случайных или незапрошенных UF

[88, 89]

Лаборатории рекомендовано:

1. Сообщать о UF клиницисту, если они указывают на серьезную, но излечимую или предотвратимую проблему со здоровьем, чтобы клиницист мог передать результаты пациенту, но при условии, что информированное согласие на такое сообщение было получено от пациента до проведения секвенирования [90].
2. Не сообщать о незапрошенных результатах, если они не имеют последствий для здоровья пациента или его семьи.
3. Сообщать о выявлении статуса носительства у взрослого, независимо от отношения к клиническому вопросу, только в том случае, если до тестирования было получено информированное согласие, т.к. знание своего статуса носителя может увеличить репродуктивные возможности.
4. Избегать сообщений о незапрошенных результатах, когда нет достаточных доказательств патогенности (например, VUS).
5. Сообщать родителям случайные результаты у несовершеннолетних, указывающие на риск пенетрантного состояния, требующего медицинского вмешательства [91].
6. Сообщать родителям о незапрошенных результатах у детей, которые (а)

имеют отношение к их здоровью в детстве или подростковом возрасте и (б) требуют принятия медицинских мер.

7. Сообщать UF результаты у детей, указывающие на риск возникновения заболеваний у взрослых, если они имеют серьезные последствия для здоровья члена семьи или ребенка в течение их жизни.
8. При принятии решения о сообщении результата, необходим учет вероятности возникновения риска, опасности для жизни и наличия доступа к лечению или эффективному методу профилактики в каждом конкретном случае и только с информированного согласия родителей до тестирования.
8. Если у детей выявлен статус носительства какого-либо состояния, об этом следует сообщить, если перед тестированием было получено информированное согласие родителей, т.к. знание своего статуса носителя может увеличить репродуктивные возможности.

4.15.2.2. Сообщение о вторичных результатах SF.

Лаборатории рекомендовано:

1. Не осуществлять активный поиск вторичных находок с применением NGS, т.к. (1) он не имеет отношения к основному вопросу, (2) он представляет собой оппортунистический скрининг, и если скрининг населения должен быть реализован, то соответственно критериям ВОЗ или связанным с ним критериям [92].
2. В случае, когда лаборатория примет решение проводить поиск вторичных находок, то его следует проводить отдельно от первоначального анализа и только при получении от пациента предварительного информированного согласия на отдельный анализ, причем согласие должно быть «оптимальным» и сопровождаться адекватным генетическим консультированием.
3. Не проводить у детей оппортунистический скрининг на наличие вторичных находок, независимо от желания родителей получить эту информацию.

14.16. Повторный анализ данных и повторное консультирование [77]

1. Лаборатории не обязаны регулярно проводить повторный анализ данных.
2. Если лаборатория информирована, что статус конкретного варианта был реклассифицирован с патогенного или вероятно патогенного на доброкачественный или вероятно доброкачественный вариант или наоборот, то лаборатории рекомендовано выявлять пациентов с этим вариантом из своей базы данных, чтобы выдать новый отчет направившему врачу.
3. Любые другие запросы на повторный анализ данных должны быть инициированы самим пациентом через направившего либо через лечащего врача.

4.17. Письменный отчет [77]

1. Все лабораторные отчеты должны соответствовать федеральным, государственным и нормативным стандартам.

2. Первичные результаты диагностического теста должны быть представлены в начале отчета в виде краткой интерпретации, указывающей на наличие или отсутствие вариантов, соответствующих фенотипу.
3. Лаборатории разрешены утверждения «положительный» или «клинически важный результат», для описания обнаруженного варианта, объясняющего клинические данные (первичные данные) или требующего медицинское вмешательство; «отрицательный» - не было идентифицировано никаких вариантов, имеющих отношение к фенотипу; «неопределенный» - существует неопределенность в отношении связи между фенотипом и выявленным вариантом (вариантами), причем варианты должны приоритизироваться в соответствии с их клинической значимостью по отношению к фенотипу.

4.18. *Отчеты о вариантах (см. Приложение 1)[77]*

Лаборатории рекомендовано:

1. Во все отчеты включать список выявленных клинически значимых вариантов, аннотированных в соответствии с номенклатурой Общества вариаций генома человека (varnomen.hgvs.org) и классифицированных в соответствии с рекомендациями ACMG/AMP.
2. Привести названия генов в соответствие с утвержденной номенклатурой Комитета по номенклатуре генов HUGO (HGNC) (www.genenames.org).
3. Для каждого варианта внутри гена включить следующие элементы: хромосомная координата (например, chr1:1234567), название гена, эталонный транскрипт (NM/ENST), зиготность (гетеро/гомо/гемизигота), изменение на уровне нуклеотида (с.), аминокислотная замена (р.) и идентификационный номер варианта в базе данных dbSNP (rs) если имеет место, и клиническая значимость варианта (патогенный/ вероятно патогенный/ вариант с неопределенным значением).
4. Реализовать выбор формы отчета по усмотрению заведующего лабораторией, ввиду отсутствия установленных правил.
5. Включить для каждого варианта за пределами кодирующих областей элементы: геномные координаты (со строением генома (например, GRCh37), или более сложным альтернативным контигом (например, GRCh37.p13 chr 6 альтернативный локус HSCR6_MHC_APD_CTG1)), изменение нуклеотидов, зиготность и классификацию вариантов.
6. В интерпретационном отчете связать каждый представленный вариант с показанием к тестированию.
7. Для вариантов, потенциально объясняющих фенотип пациента, включить название расстройства или фенотипа, используя стандартизованную нозологию МКБ-10 (при наличии).
8. В отчет включить дополнительную информацию о варианте, не связанном с основным клиническим показанием для тестирования.
9. Описывать варианты, которые исключаются из отчета (например, для лабораторий типично сообщать только о патогенных и вероятно патогенных вариантах в тестах на носительство или на оценку риска у

здоровых людей, но при этом включать VUS, если они находятся в генах с установленной или вероятной ассоциацией с фенотипом пациента или семейным анамнезом).

10. Подробно изложить в материалах, предоставляемых заказчикам услуг, и в индивидуальном отчете информацию о вариантах, которые исключаются из отчета, т.к. заказчики услуг могут потребовать оценку определенных генов с помощью генной панели, ES или GS.
11. Учесть, что незарегистрированные доброкачественные варианты, вероятные доброкачественные варианты и дополнительные VUS должны быть доступны по запросу врача или пациента.

14.19. Методы отчетности [77]

Отчеты по тестированию должны содержать:

1. Краткую информацию о методологии и всех ограничениях теста, включая соответствующие версии баз данных и последовательности алгоритмов биоинформатической обработки.
2. Для панелей генов, нацеленных на заболевание – проанализированные гены, ключевые показатели качества и список проанализированных генов без полного покрытия.
3. Фактическое покрытие, если полное покрытие не достигнуто.
4. Сообщения о любых ограничениях в анализе конкретных генов или типов вариантов (таких как CNV), если метод анализа не включает все гены или типы вариантов, относящиеся к показанию для тестирования.
5. Для ES/GS - описание процесса анализа данных и среднюю и/или минимальную глубину покрытия экзона или генома для конкретного образца.
6. Статистические данные о средней и/или минимальной глубине покрытия по всей когорте тестируемых образцов.
7. По запросу для GS, в дополнение к покрытию генома - отдельное значение покрытия для экзона.
8. По запросу анализа конкретного гена - покрытие гена, а также любые дополнительные ограничения, связанные с аналитическим обнаружением вариантов в этом гене, т.к. лаборатория может анализировать варианты в генах, ограниченно связанных или не связанных с заболеванием, гены-кандидаты или гены неопределенного значения (GUS).
9. Отметку об отсутствии связи варианта с заболеванием и сообщение о варианте, как о VUS, причем вариант в GUS не следует классифицировать, как патогенный или вероятно патогенный, если лаборатория решит сообщить о варианте в GUS (например, о варианте *de novo* в гене без зарегистрированной связи с заболеванием).

4.20. Выдача данных по запросу пациента [77]

Лаборатории рекомендовано:

1. Предоставлять заполненные отчеты по результатам проведенного исследования физическим лицам по запросу.

2. Включать в объем передаваемых данных «полную информацию о вариантах гена, полученную в результате теста» и необработанные данные секвенирования.
3. Раскрывать информацию, с предоставлением элементов данных, отмечая, что данные о вариантах могут включать доброкачественные варианты, ранее не зарегистрированные редкие варианты, ложноположительные варианты и другие потенциально возможные вторичные/случайные результаты.
4. Интерпретировать значимость выявленных вариантов пациенту - необязательно.

4.21. *Реклассификация вариантов и повторный анализ данных*[77]

Лаборатории рекомендовано:

1. Предлагать повторный анализ данных ранее выполненных у себя генетических тестов.
2. Провести повторный анализ с описанием тестов и отдельных отчетов с описанием процедур реклассификации на уровне варианта и повторного анализа на уровне случая.
3. Предлагать заказчикам медицинских услуг проведение периодических опросов, чтобы определить, как изменились знания о ранее зарегистрированном варианте, что привело к переклассификации (например, переклассификация VUS в патогенный или доброкачественный вариант).
4. Если лаборатория инициирует повторную классификацию вариантов, она должна разработать подходы для обеспечения своевременного информирования об этих обновлениях (например, через изменение отчетов по результатам тестирования, особенно для клинически значимых нарушений, таких как реклассификация патогенного варианта в VUS).
5. Предложить заказчику повторно связаться с индивидуумом, если изменение значимо с медицинской точки зрения для него или его семьи.
6. Для выполнения повторного NGS-анализа, проверить текущий конвейер биоинформатики на соответствие любым различиям в структуре данных по сравнению с первоначальным анализом (например, покрытие библиотеки, секвенатор).
7. Учесть, что повторное секвенирование лучше, чем переанализ старых данных генотипирования, полученных на устаревших платформах с пониженной точностью.

4.22. *Хранение данных, безопасность и маршрутизация данных*[77].

Лаборатории рекомендовано:

1. Гарантировать, что хранилище данных соответствует требованиям и позволяет отслеживать историю изменения содержания отчета, независимо от используемого хранилища (локального или облачного).
2. Четко определять типы файлов, подлежащих хранению и период времени их хранения.

3. Организовать процесс хранения данных соответственно национальным, федеральным, государственным законам и правилам.
4. Учитывать, что правила и законы, касающиеся хранения данных секвенирования несовершеннолетних, могут отличаться от правил для взрослых и требуют хранения записей аналитических систем и протоколов испытаний не менее 2 лет.
5. Рассмотреть возможность хранения файлов основного типа (например, файлов BAM или FASTQ с сохранением всех прочтений) минимум в течение 2 лет.
6. Рассмотреть вопрос о хранении файлов VCF и окончательного отчета об испытаниях в течение 5 лет, учитывая вероятность повторного анализа в будущем.
7. Поддерживать внутреннюю базу данных вариантов, проанализированных и классифицированных, с использованием стандартов ACMG/AMP.

5. Рекомендации для клинико-диагностических и молекулярно-генетических лабораторий по техническим процедурам NGS

Рекомендации по техническим процедурам NGS [93]:

Выделение и количественное определение нуклеиновых кислот

В настоящее время разработаны руководства по валидации допустимых типов образцов и методов экстракции нуклеиновых кислот для тестирования NGS [94-96].

Лаборатории должны самостоятельно идентифицировать типы образцов, которые соответствуют цели проводимого исследования (например, кровь, буккальные клетки, культивированные клетки или фиксированные формалином, залитые в парафин (FFPE) или свежие ткани) и проводить валидацию (типов образцов и методологии выделения нуклеиновых кислот) с учетом требований.

Целевое обогащение и создание библиотеки

1. *Определить целевую область NGS-анализа. Области, не соответствующие показателям качества анализа, протестировать альтернативным методом или удалить из заявленной целевой области.*
2. *Во время валидации, проводимой для каждого конкретного метода и его предполагаемого использования, определить показатели качества анализа для успешного обогащения и подготовки библиотеки.*

Целевое обогащение - это процесс, посредством которого части генома отбираются для секвенирования. В настоящее время в клинических лабораториях используют три способа обогащения мишеней: (1) обогащение для всех кодирующих последовательностей в геноме (обогащение областей экзона); (2) обогащение кодирующих последовательностей отдельных или выбранных генов (панелей генов); (3) области генома с известными клинически значимыми вариантами (панели горячих точек).

Стратегии обогащения могут сочетать подходы, такие как целевые панели генов, которые также содержат варианты «горячих точек». При целевом

обогащении необходимо учитывать ряд переменных, включая долю целевого прочтения, стоимость за образец, имеющееся оборудование, способ хранения данных, процесс обогащения, доступные аналитические биоинформатические инструменты/ресурсы и вероятность обнаружения вторичных находок.

В лабораториях широко используют методы обогащения мишеней на основе амплификации и на основе гибридизации.

Методы обогащения мишеней на основе амплификации применяют высокомультиплексированные праймеры ПЦР для создания продуктов ПЦР размера, подходящего для платформы секвенирования (например, 150–400 п.н.). Однако, в ходе ПЦР случается выпадение аллелей, из-за присутствия SNV в сайтах связывания праймеров, что приводит к появлению областей с низкой глубиной считывания и/или непредвиденной гомозиготности в результатах NGS.

Обогащение мишени на основе гибридизации использует комплементарные олигонуклеотидные «приманки» ДНК или РНК, специфичные для мишени, в целях гибридизации и захвата геномной ДНК (фрагментированной ферментативно или посредством физического сдвига). Области, трудно поддающиеся оценке с помощью любого метода, включают участки с псевдогенами, регионы с большим количеством нуклеотидных повторов и GC-богатые области (например, экзон 1 многих генов). Такие регионы необходимо протестировать альтернативным методом (например, секвенированием по Сэнгеру) или удалить из отчета по результатам тестирования. Альтернативный метод тестирования должен быть предусмотрен для оценки последовательности в критических областях (например, содержащих варианты «горячих» точек) или при необходимости обеспечения надлежащего качества. Лаборатории должны определить собственные критерии для выполнения тестирования альтернативным методом [97].

Уникальную последовательность нуклеотидов (штрих-код/индекс) часто добавляют к фрагментам ДНК из каждого образца при подготовке библиотеки, чтобы обеспечить одновременное секвенирование нескольких образцов. Любые два штрих-кода должны отличаться более чем одной парой оснований, во избежание ошибок во время синтеза или секвенирования, которые могут привести к преобразованию одного штрих-кода в другой и, таким образом, к неправильному определению последовательности. Лаборатории должны определить показатели качества и пороговые значения для целевого обогащения, включая сведения о штрих-кодах, если они используются. Должны быть реализованы методы, обеспечивающие сохранение идентичности образца на протяжении всего процесса NGS, например, использование стандартов с добавлением синтетической ДНК или панели SNP [98-100].

Генерация (создание) библиотек

3. Определить для каждого конкретного метода тестирования метрики оценки качества данных генерации последовательности.

Основным подходом к генерации последовательностей нуклеиновых кислот во многих клинических лабораториях является NGS с короткими прочтениями с использованием секвенирования путем синтеза (SBS) [101].

Каждая платформа SBS имеет определенные ограничения, связанные с генерацией последовательностей, которые необходимо учитывать при проверке и реализации теста.

Клинические лаборатории должны иметь полное представление о химических процессах, лежащих в основе генерации последовательности для каждой используемой платформы NGS, а валидация должна включать оценку известных ограничений, связанных с конкретной платформой, имеющих отношение к тесту. Должны быть определены соответствующие индикаторы и приемлемые пороги качества данных во время генерации последовательности NGS: средняя и минимальная глубина считывания, доля оснований выше заданного показателя качества, процент считываний с адекватным качеством отображения и другие параметры и пороги, которые определяют допустимый запуск для каждого конкретного теста

Минимально приемлемая глубина считывания для всех нуклеотидов в области-мишени должна быть установлена до валидации. Она будет зависеть от технологии, используемой для секвенирования, метода захвата и желаемой чувствительности анализа (например, различий в чувствительности для обнаружения зародышевых и соматических вариантов).

Рекомендации по биоинформационному анализу и вариантной аннотации ***Выравнивание последовательности***

- 4. Идентифицировать метрики качества выравнивания последовательностей и определить пороговые значения для приемлемого выравнивания.*
- 5. Уделить внимание снижению риска неправильного определения вариантов путем соответствующего исследования геномных участков с известной гомологией, таких как псевдогены.*

Чтения последовательности, сгенерированные на первичной фазе биоинформатического анализа, сопоставляют или выравнивают относительно референсной последовательности с применением различных алгоритмов.

С учетом того, что инструменты различаются способностью точно выравнивать последовательности, следует определить ключевые показатели качества для выравнивания (например, показатели качества отображения или % сопоставления (доля сопоставления)) и установить пороговые значения для определения приемлемости выравнивания последовательностей для определения вариантов.

Во время валидации лаборатория должна определить целевые области генома, при биоинформатическом анализе которых могут возникать ошибки. Области с известной гомологией к другим геномным областям (например, псевдогенам) или сегментарные дубликации должны быть исследованы для предотвращения выявления потенциальных ложноположительных или ложноотрицательных вариантов. Лаборатории должны проверить области

генома, включенные в анализ NGS, чтобы выявить потенциальные проблемы в выравнивании и оценить качество картирования в этих областях [98].

Определение вариантов

6. Провести оценку биоинформационных инструментов на предмет их способности надежно обнаруживать клинически значимые типы вариантов.

Обнаружение различных типов клинически значимых вариантов по данным NGS (SNV, indels, CNV и т. д.) может потребовать использования биоинформационных инструментов, специфичных для интересующих типов вариантов. В то время, как SNV обычно идентифицируются путем выравнивания нуклеотидной последовательности [99, 100], инсерции и делеции требуют разных подходов. В случае наличия вариантов с инсерцией/делецией (indel) существует риск ошибки при идентификации варианта из-за несоответствия прочтений с референсным геномом либо фильтрации прочтений, содержащих большие вставки или делеции, плохо согласующиеся с эталонной последовательностью. Ключевым аспектом оценки инструментов определения indel является экспериментальное определение максимального размера идентифицированной вставки или делеции, а затем установление его в качестве верхнего предела обнаружения размера.

Для идентификации вариантов CNV на уровне экзонов, общий подход основан на гипотезе, что глубина считывания NGS в геномной области коррелирует с количеством копий этой области в образце. Для этого может потребоваться сравнение глубины считывания тестового образца с глубиной считывания эталонного образца (или объединенных эталонных образцов). Необходимо учитывать размер CNV, который можно обнаружить с помощью биоинформатических подходов. Например, одни типы CNV (большие делеции) могут быть адекватно обнаружены в то время, как другие типы CNV (менее 1 т.п.н.), находящиеся в областях с высоким содержанием нуклеотидов GC или дупликациями, могут не обнаруживаться. Лаборатории должны определить пределы размеров (верхний и нижний) CNV, которые могут быть достоверно обнаружены.

Во время валидации лаборатория должна определить надежность обнаружения для каждого ожидаемого типа варианта и любые связанные с этим ограничения. В некоторых случаях лабораториям может потребоваться проверка вариантов с использованием ортогональных методов во время текущего клинического тестирования [102].

Аннотация вариантов и интерпретация

7. Лаборатории должны использовать утвержденные руководства по классификации и интерпретации вариантов.

Общие концепции аннотации, классификации и интерпретации вариантов могут быть применены унаследованным, соматическим и митохондриальным вариантам генома (таблица 1). Опубликованы руководства по классификации и интерпретации клинической значимости наследственных [103] и

соматических [104, 105] вариантов. Подобные рекомендации для митохондриального генома не доработаны, хотя содержат полезные комментарии [103]. Отмечено, что на данный период времени отсутствует конкретное руководство по интерпретации CNV по данным NGS, но если CNV обнаружены и установлены приблизительные контрольные точки CNV, то можно применить руководство [106] по интерпретации конституциональных/зародышевых CNV, идентифицированных с помощью технологий хромосомных микрочипов (ХМА). Руководство по классификации CNV рекомендует включать в отчет все гены, входящие в область CNV. В зависимости от метода NGS, максимальный размер CNV может быть не установлен, особенно для целевых панелей, которые могут не включать соседние гены.

Таблица 1. Концепции, относящиеся к интерпретации вариантов наследственных генетических нарушений, приобретенных соматических мутаций при раке и нарушений митохондриального генома

Типы вариантов	Различные концепции интерпретации
Унаследованные варианты зародышевой линии (герминальные)	<ul style="list-style-type: none"> • Варианты, как правило, гетерозиготные или гомозиготные, в редких случаях варианты могут быть соматически мозаичными (раннее постзиготное событие). • Оценка патогенности вариантов в диагностике, прогнозе, профилактике, репродуктивном планировании или лечении • Варианты полезны для семейного тестирования, включая определение статуса носителя или выявление других членов семьи из группы риска. Варианты также могут быть полезны для определения геномных участков с отсутствием гомозиготности (из-за кровного родства или однородительской дисомии).
Приобретенные соматические варианты	<ul style="list-style-type: none"> • Частота обнаруживаемого вариантного аллеля может иметь широкий диапазон в опухолевой ткани • Оценка вариантов для использования в диагностике или в прогностических или терапевтических целях • Как правило, нет семейного риска, хотя могут быть идентифицированы варианты с аллельными

Типы вариантов	Различные концепции интерпретации
	частотами, соответствующими гетерозиготным или гомозиготным вариантам зародышевой линии
Варианты митохондриального генома	<ul style="list-style-type: none"> • Частота обнаруживаемого вариантного аллеля может иметь широкий диапазон в тестируемой ткани (из-за гомоплазии или гетероплазии) • Оценка вариантов патогенности в диагностике или прогнозе требует анализа гаплогрупп • Семейный риск только по материнской линии • Варианты полезны для семейного тестирования, включая определение статуса носителя или выявление других членов семьи из группы риска

Анализ доли вариантного (мутантного) аллеля

8. Для наследственных заболеваний лаборатории должны определить долю альтернативного аллеля, соответствующую гетерозиготному и гомозиготному состоянию.
9. Для оценки соматических мутаций при раке или нарушений митохондриального генома лаборатории должны определить нижний предел доли альтернативного аллеля.
10. В случае оценки соматических мутаций при раке или нарушений митохондриального генома, лаборатории должны определить точность анализа в клинически значимом диапазоне ожидаемых частот вариантных аллелей.

Клиническое NGS-тестирование должно обнаруживать варианты в пределах клинически значимых долей (или фракций) мутантных аллелей, специфичных для тестируемого расстройства. Существенным фактором, влияющим на долю вариантных аллелей, является количество прочтений уникальных последовательностей в конкретной паре оснований, при этом большее количество прочтений уникальных последовательностей (более высокая глубина прочтений) позволяет улучшить обнаружение вариантов при низких долях вариантных аллелей.

Валидация NGS для наследственных заболеваний должна обеспечивать обнаружение гетерозиготных и гомозиготных вариантов и пределы долей вариантного аллеля для каждой зиготности. В некоторых случаях может быть обнаружена доля вариантного аллеля сильно ниже ожидаемого уровня, что в контексте наследственного заболевания может свидетельствовать о соматическом мозаицизме при сопоставлении с псевдогенами или

сегментарными дупликациями. Лаборатория должна разработать внутренний курс подхода к диагностике потенциально соматического мозаицизма при тестировании на наследственные заболевания. В клинических отчетах следует указать, будет ли обнаружен мозаицизм и назвать расчетный нижний предел доли вариантного аллеля, обнаруживаемой с помощью анализа, если это имеет место.

В случае исследования соматических мутаций при раке и нарушений митохондриального генома, варианты могут быть обнаружены с частотами вариантных аллелей в диапазоне от 1% до 100%. Поэтому, эти анализы требуют определения надежного нижнего предела обнаружения доли вариантного аллеля. В некоторых случаях может потребоваться проверка вариантов, обнаруженных NGS с низкой долей мутантного аллеля, чтобы отличить их от ошибок приборов. В части касающейся, лаборатории должны определить сценарии, в которых необходима дополнительная проверка. Кроме того, при обнаружении доли вариантных аллелей в клинически значимом диапазоне следует оценить точность анализа NGS. Это может быть достигнуто повторным тестированием образцов с различными долями аллелей, ранее идентифицированных ортогональными методами, или использованием серий разведений ДНК из двух клеточных линий [107].

В случае исследования соматических мутаций в опухолевых образцах, когда доля мутантного аллеля приближается к гетерозиготности (около 50%) или гомозиготности (до 100%) в гене с известным онкоассоциированным риском, рекомендовано генетическое консультирование и дальнейшее обследование на наличие герминальной мутации в геномной ДНК (из крови, буккального эпителия) для оценки наследственного риска рака. Обратите внимание, что методы тестирования, тип и качество исходного материал могут влиять на долю мутантного аллеля, идентифицированного в ткани при исследовании соматических мутаций в образцах опухоли.

Хранилище данных

11. *Лаборатории должны сохранять файлы с выявленными вариантами в формате VCF и другие типы данные, интерпретируемые для создания окончательного клинического отчета. При отсутствии отечественных стандартов хранения, VCF подлежит хранению не менее 2 лет. Особое внимание следует уделить сохранению «сырых» данных в течение определенного периода времени.*
12. *Лаборатории должны обеспечить соответствие хранения данных (включая облачное хранилище, в случае использования) в соответствии с российским законодательством о конфиденциальности.*

Хранение данных секвенирования в клинических лабораториях

Важно определить конкретные файлы с результатами NGS, которые следует сохранить для возможного переанализа в будущем.

Описаны приблизительные размеры различных файлов с данными NGS [108]. Необработанные данные последовательности, сгенерированные прибором (формат FASTQ), содержат считанные последовательности и данные о

базовых показателях качества [109]. Во время вторичного анализа создается файл Sequence Alignment/Map (SAM), в котором хранятся выравнивания прочтений относительно референсной последовательности [110]. Сопутствующий файл - Binary Alignment/Map (BAM), сохраняет ту же информацию, что и файл SAM, в качестве дублирующей в сжатом формате. Последним значимым форматом данных является файл VCF, который представляет собой общий формат, используемый для хранения информации о выявленных вариантах (например, хромосомная позиция, замена на уровне нуклеотида и и.д.) и может содержать дополнительные аннотации (например, частота минорного аллеля в контрольной популяции, местоположение относительно гена, описание варианта согласно HGVS), созданный биоинформационным конвейером [111].

Подходы к хранению файлов должны учитывать интересы пациента согласно закону о хранении персональных данных и юридические обязательства. Например, для данных тестирования несовершеннолетних может потребоваться более длительное время хранения, чем для взрослых; также для данных тестирования на наследственные заболевания, которые могут иметь значение для семьи пациента, может потребоваться более длительное хранение, чем для тестирования на приобретенные заболевания. Хотя файлы VCF различаются по размеру, они меньше файлов FASTQ и BAM [108] и более пригодны для длительного хранения. Лаборатории должны сохранять файл VCF наравне с другими окончательными лабораторными данными для документирования вариантов на момент составления отчета. Срок хранения VCF минимум 2 года. Следует рассмотреть вопрос о восстановлении некоторой формы необработанных данных (например, файлов BAM) в течение определенного периода времени, например, одного цикла проверки контроля качества.

Для составления наиболее оптимального способа хранения файлов FASTQ/SAM/BAM, необходимо провести анализ затрат и результатов. Хотя сохранение файлов FASTQ потенциально позволяет проводить повторный анализ с использованием текущих или улучшенных конвейеров, их большой размер может быть недоступен для хранения. Файлы BAM меньшего размера (или сжатые версии, такие как CRAM) [112] и более доступны для хранения вместо файлов FASTQ в течение определенного периода после создания отчета, для возможности просмотра отдельных прочтений, содержащихся в отчете, в случае необходимости. Однако, если лаборатория намерена провести повторный анализ данных позднее этого периода (например, повторный анализ данных экзозома), то это потребует сохранения файлов FASTQ. В качестве более рентабельной альтернативы, учитывая высокую стоимость длительного хранения файлов FASTQ/SAM/BAM, предложено повторное NGS-тестирование пациента в будущем.

Использование облачных серверов так же является вариантом для анализа и хранения данных [113].

При любом хранении файлов с генетическими данными, связанными с информацией, позволяющей установить личность, лаборатории должны гарантировать, что хранение (включая облачное хранилище) соответствует российскому законодательству о конфиденциальности.

Рекомендации по тестовой валидации или проверке

Общие вопросы для проверки

13. *Валидация или верификация анализов NGS должна охватывать весь сквозной процесс, включая этапы пробоподготовки и биоинформатического анализа данных*
14. *Валидация или верификация необходимы при изменении ранее валидированного протокола NGS и должны соответствовать степени модификации.*

Валидация анализа NGS подтверждает, что требования для конкретного предполагаемого протокола были выполнены. Проверка должна охватывать сквозной процесс, включая этапы «мокрой» части, выполняемой в лаборатории, и биоинформатического анализа данных и, как правило, ограничиваться оценкой внутренних характеристик, утвержденных Росздравнадзором медицинских устройств для диагностики *in vitro* или подтверждением того, что анализ соответствует определенным показателям качества после незначительного изменения теста.

Выбор образцов для проверки зависит от типа генетического теста и должен включать образцы той же ткани или типа опухоли, которые будут тестироваться в ходе клинического анализа. Другие источники контрольных образцов могут включать хорошо охарактеризованные клеточные линии для получения дополнительных вариантов в целевой области [114].

При обнаружении соматических вариантов следует использовать контрольные образцы с клинически значимым диапазоном долей вариантных аллелей для целевых регионов [115].

Лаборатории должны учитывать необходимость проведения валидации при изменении ранее валидированной технологии анализа NGS, например, при добавлении гена в ранее валидированную панель или изменении версии одного биоинформатического конвейерного инструмента. Схема валидации должна определять аспекты, на которые может повлиять предстоящее изменение, и должным образом оценивать эти аспекты на протяжении всего сквозного процесса NGS.

Оценка аналитической чувствительности и специфичности

15. *Валидация крупнопанельных или полногеномных анализов NGS должна включать не менее 60 вариантов, в том числе не менее 10 вариантов каждого конкретного типа, которые должны быть обнаружены с помощью клинического анализа.*
16. *Валидация полногеномных анализов NGS должна включать использование хорошо охарактеризованных образцов, для которых известны консенсусные варианты.*
17. *Минимальная глубина прочтения, необходимая для желаемой*

чувствительности, должна быть установлена для каждого анализа.

При расчете аналитической чувствительности необходимо учитывать два фактора: тип варианта, который может быть обнаружен прибором, и минимальная глубина прочтения, необходимая для обнаружения варианта. Количество вариантов, включенных в валидацию, будет влиять на статистическую достоверность расчетной аналитической чувствительности. В руководстве по оценке достоверности исследования секвенирования ДНК [116] определено, что размер выборки из 60 вариантов обеспечивает максимальную чувствительность 95 % (в пределах доверительного интервала 95 %), когда все 60 вариантов обнаруживаются при использовании новой технологии, а размер выборки из 300 вариантов увеличивает максимальную чувствительность до 99% (в пределах доверительного интервала 95%). Аналогичным расчетом для онкологических панелей подсчитано, что для уверенности в 95 % с надежностью не менее 95 % минимальное количество вариантов для валидации составляет 59. Таким образом, рекомендовано, чтобы валидация методологии включала валидацию для каждого типа варианта (например, SNV), в общем количестве не менее 60 вариантов. Учитывая сложность выявления определенных типов вариантов (например, indels), рекомендовано, чтобы из общего числа 60 вариантов анализировалось не менее 10 вариантов каждого клинически значимого типа. Руководство по расчету доверительных интервалов для аналитической чувствительности предлагает в случаях, когда целевое количество вариантов невозможно обнаружить во время валидации (например, из-за редкости определенных типов вариантов), продолжать идентификацию дополнительных вариантов ортогональным методом до тех пор, пока цель не будет достигнута.

Требуется установить чувствительность анализа при уменьшении глубины прочтения, поскольку варианты, обнаруженные во время проверки, скорее всего, не будут обнаружены в областях с меньшей глубиной прочтения. Рутинный метод уменьшения глубины считывания включает субдискретизацию последовательности хорошо охарактеризованных выборок до долей исходной глубины [114], после чего скорость обнаружения достоверно представленных вариантов можно оценить при различной глубине считывания [117]. Как только заданный порог определен, лаборатория может подтвердить количество проб, которые можно объединить, достигнув при этом минимальной глубины считывания.

При оценке специфичности требуется рассчитать долю вариантов, идентифицированных с помощью анализа NGS, которые не присутствуют в проверочных образцах (т. е. ложноположительные результаты). Существует ряд ограничений, которые могут привести к завышению количества ложноположительных результатов, включая (1) варианты, возникающие во время культивирования клеточных линий, (2) различия в чувствительности между NGS и другими методами (например, секвенирование по Сэнгеру) для обнаружения мозаичных вариантов, (3) выпадение аллеля в методах на основе

амплификации. Приемлемая специфичность теста будет варьироваться в зависимости от клинического применения и зависеть от того, подтверждено ли наличие варианта другим методом до формирования клинического отчета. План эксперимента для валидирующих исследований зависит от типов вариантов, являющихся клинически значимыми. Например, рекомендовано, чтобы повторяющиеся варианты, которые, как известно, являются причиной значительной доли диагнозов при конкретном заболевании, были включены в образцы, протестированные во время валидации. Если это невозможно, то в качестве альтернативы предложено, чтобы тестируемые геномные области, содержащие эти варианты, соответствовали минимальным параметрам качества, для обеспечения обнаружения вариантов. Остальные варианты, не связанные с заболеванием, могут быть включены в метрики валидации, поскольку ожидается, что рабочие характеристики для обнаружения конкретного типа варианта (например, SNV) будут эквивалентны как патогенным, так и доброкачественным вариантам.

Разработка и валидация клинических экзомных или полногеномных тестов должны следовать тем же общим принципам, что и при генных панельных тестах. Кроме того, проверочные образцы должны включать хорошо охарактеризованные клеточные линии [114]. При расчете чувствительности и специфичности секвенирования всего экзома или всего генома, лаборатория должна использовать параметры, позволяющие маркировать и исключать варианты с повторяющимися последовательностями (например, сегментарные дубликации) из областей генома и мишени со значительной гомологией в других областях генома (например, псевдогены), которые могут привести к ложноположительным и ложноотрицательным результатам.

Рекомендации по непрерывному обеспечению качества **Общая гарантия качества**

После клинического применения анализа NGS реагенты, оборудование и программное обеспечение подлежат непрерывному контролю качества (QA) для обеспечения производительности теста и валидности данных, как и для всех клинических анализов. Многие требования к обеспечению качества одинаковы, независимо от конкретного клинического применения или методологического подхода. Проверку качества и соответствующие средства контроля рекомендовано применять к методу, применяемому для NGS-тестирования, или используемой методике, а не к каждому конкретному гену в анализе.

Контрольные образцы

18. Все анализы NGS должны сопровождаться процедурами контроля за потенциальным загрязнением.

Например, не использовать шаблонный контроль на этапах протокола, где риск контаминации наибольший (например, при подготовке библиотеки до момента секвенирования).

19. Должны быть включены элементы управления чувствительностью, чтобы обеспечить поддержание нижнего предела обнаружения, если

применимо.

Например, использование шага конвейера биоинформатики для мониторинга вариантов с низкой долей мутантного аллеля при тестировании на наследственные заболевания, или профилактические меры, например, использование чередующихся штрих-кодов между постановками.

В некоторых сценариях, таких как тестирование соматического или митохондриального генома, лаборатория должна установить график тестирования контроля для определения чувствительности, чтобы обеспечить поддержание утвержденного нижнего предела идентификации мутаций. Рекомендовано выбирать контроли для валидации, содержащие конкретные варианты или типы вариантов для регулярной проверки эффективности анализа.

Постоянное обеспечение качества биоинформатического анализа

20. Лаборатории должны установить процедуру внедрения и отслеживания версий программного обеспечения и мониторинга обновлений.

Лаборатория должна установить процедуру мониторинга доступности обновлений программного обеспечения, а в случае обнаружения новой версии применяемого ПО, установить критерии для внедрения: обзор для оценки характера изменения версии (критическое, полезное или ненужное), связанных с ним рисков, возможного влияния на процесс биоинформатического анализа и необходимости проверки.

Необходимость валидации или верификации должна основываться на степени внесенных изменений и на основе потенциального риска ошибок в результате изменениях. Если необходима валидация или верификация, любые изменения настроек по умолчанию должны быть задокументированы с использованием ПО для контроля версий. Также может потребоваться проверка других составляющих или всего биоинформатического конвейера, в зависимости от используемых методов биоинформатического анализа. При необходимости, проверка обновлений программного обеспечения может выполняться с использованием контрольных электронных наборов данных, архивных данных или посредством анализа биологических образцов.

21. Используемые референсные последовательности и базы данных подлежат периодической проверке, чтобы убедиться в использовании соответствующих версий.

Помимо обновлений биоинформатического ПО, обновлениям подлежат референсные последовательности и базы данных, используемые в анализе. Рекомендовано периодически проверять используемые референсные последовательности или базы данных, чтобы гарантировать применение соответствующей версии. Любые изменения следует документировать посредством ПО для контроля версий.

Текущая оценка и обновление анализов NGS

22. Лаборатории должны определить процедуры для периодической оценки клинической полезности каждого целевого анализа NGS.

Например, изучить литературу или проконсультироваться с коллегами-клиницистами или другими экспертами на предмет обновленной информации об эффективности анализов NGS.

23. Если в списки анализируемых генов в анализе NGS, вносятся изменения, лаборатории должны сообщать об этих изменениях клиницистам.

Добавление новых генов в панели или изменение используемых подходов к фильтрации не требует от лаборатории автоматического переанализа или составления нового отчета для лиц, кому был проведен анализ до внесения изменений. Лаборатория должна направить конкретный запрос направляющему поставщику медицинских услуг на повторный анализ данных или повторное тестирование образца, или повторную выдачу отчетов, а детали этого процесса должны содержаться в нормативах лаборатории.

24. Лаборатории должны пересматривать классификацию ранее зарегистрированного варианта только по запросу поставщика медицинских услуг, действующего от имени пациента.

Изменение клинической значимости варианта не уникально при NGS и происходит больше из-за широкого применения анализа и существующих пробелов в знаниях о влиянии варианта на структуру и функцию белка. Изменение классификации вариантов может вызвать опасения относительно повторного контакта с пациентами/семьями. Лаборатории должны разработать политику повторного пересмотра классификации вариантов, консультируясь с поставщиками медицинских услуг, администраторами медицинских организаций и/или регулирующими органами [118].

NGS-тесты и клинические ограничения

Клиническая интерпретация и представление результатов NGS

Интерпретация и отчетность результатов NGS принципиально не отличаются от других генетических результатов. Отчетность должна соответствовать передовым стандартам, утвержденным для других крупномасштабных клинических тестов (например, микрочип). Подробная информация об общем анализе должна быть доступна по запросу, но отчеты об испытаниях должны быть краткими. Отчеты о вариантах должны соответствовать номенклатуре HGVS и обеспечивать четкое документирование используемых эталонных транскриптов и построений генома.

Информация, которая должна быть предоставлена в клиническом отчете или доступна в других форматах (например, версия информации, доступная в Интернете) для заказа поставщиками медицинских услуг, в зависимости от конкретного выполняемого анализа:

- целевые области генома, соответствующие показателям контроля качества;
- целевые области генома не соответствующие показателям контроля качества;
- ортогональные методы, используемые для увеличения областей, в которых не были соблюдены метрики контроля качества;

- минимальная глубина прочтения, при которой данные принимались для отчетности;
- чувствительность анализа, определяемая минимальной глубиной считывания;
- типы обнаруживаемых вариантов (например, SNV, indels, CNV);
- максимальный размер обнаруживаемых вариантов вставки и делеции;
- самая низкая доля вариантного аллеля, обнаруживаемая с помощью анализа (нижний предел обнаружения);
- ограничения, в том числе для обнаружения вариантов в гомологичных, повторяющихся или GC-богатых областях.

Обмен данными в генетическом сообществе приветствуется, поскольку имеет решающее значение для постоянного мониторинга новых вариантов, обнаруженных с помощью диагностических тестов. При внесении вариантов в базы данных, лаборатории должны иметь представление о курировании и соблюдать законодательные требования о конфиденциальности.

Специалисты, ответственные за окончательную интерпретацию и отчетность для NGS, должны иметь соответствующие полномочия и привилегии для надзора за тестированием NGS и интерпретацией данных NGS. Поскольку NGS - новая технология, влияющая на все области лабораторной медицины, отечественные учебные программы должны предусматривать компетенции и требования к обучению для конкретных приложений NGS.

Случайные и вторичные находки

25. Лаборатории должны определить и распространить свой внутренний алгоритм выявления случайных или вторичных результатов и сообщения о них.

Анализы NGS могут идентифицировать случайные или вторичные результаты. ACMG дает четкие рекомендации в отношении случайных находок в контексте наследственных заболеваний [119]. Для тестирования опухолевой ткани на соматические варианты, важного для лекарственной терапии, может выявить варианты, обуславливающие предрасположенность к наследственным типам рака, имеющие отношение к раку пациента [120]. В отсутствие тестирования мутаций зародышевой линии окончательная информация о потенциальном характере варианта не может быть получена из анализа только опухоли. Лаборатории должны определить критерии NGS-тестов опухоли, которые могут ориентировать на подозрение на наличие герминального варианта, и установить правила последующего ведения пациента в таких случаях. Последующее ведение может включать в себя обращение к направляющему врачу с предложением направления к клиническому генетику или информирование в отчете о том, что рекомендуется генетическое консультирование пациента для определения статуса конкретного гена или варианта.

6. Рекомендации по организации клинико-диагностического секвенирования с помощью целевого анализа панелей генов/ WES

(в контексте редких и моногенных заболеваний) [121].

Текущее состояние

Доступные платформы NGS часто претерпевают изменения в связи с появлением новых технологий и появлением новых молекулярных мишеней, но это не должно препятствовать их внедрению в диагностику, из-за потенциальной общей полезности для пациента. Непозволительно предлагать низкокачественную NGS-диагностику, т.к. недостаточно валидированные тесты представляют угрозу для пациентов, их использование в клинико-диагностических условиях недопустимо.

1. *NGS не следует внедрять в клиническую практику без приемлемой валидации тестов.*

Необходимо заранее определить цель диагностического теста, то есть для исключения или подтверждения диагноза, поскольку различие является значительным, зависит в основном от полноты теста и требует не только разных настроек, но, что более важно, другого взгляда на диагностику.

2. *Лаборатория должна четко указать, что предлагаемый тест может использоваться либо для исключения, либо для подтверждения диагноза.*

Диагностическая/клиническая полезность

Преимущество внедрения NGS в диагностике заключается в одновременном тестировании многих генов за относительно короткое время и при относительно низких затратах, что позволяет устанавливать больше молекулярных диагнозов.

Ограничения NGS зависят от платформы и методов обогащения (если таковые имеются) и должны учитываться, поскольку они будут влиять на выбор метода обогащения и платформы для секвенирования, а также определять, какие дополнительные тесты (если таковые имеются) потребуются для получения качественных результатов.

3. *Цель и полезность теста или анализа должны быть определены в начале валидации, а резюме должно быть включено в отчет о валидации.*

«Диагностический результат» определяется как вероятность того, что патогенный вариант будет идентифицирован и может быть поставлен молекулярный диагноз. Значение рассчитывается для когорты пациентов. Он устанавливает эффективность NGS в первую очередь с клинической точки зрения и может быть хорошим индикатором эффективности теста (помимо его аналитических аспектов) и его клинической полезности.

4. *При рассмотрении лабораторией возможность внедрения NGS в диагностику, в первую очередь, следует учитывать диагностический результат.*

На практике диагностические лаборатории предпочтительно будут предлагать генные панели. При разработке диагностического теста, должны быть определены условия включения гена в панель. В идеале, этот вопрос должен решаться на уровне сообщества междисциплинарным образом. Цель состоит

в составлении списка генов, которые должны быть включены во все диагностические панели, что важно для гармонизации генетического тестирования, а также для пациентов и практикующих врачей, которые хотели бы видеть равный доступ и единообразные услуги.

5. *Для диагностических целей в анализ следует включать только гены с известной (т.е. опубликованной и подтвержденной) взаимосвязью между aberrантным генотипом и патологией.*

Существует твердое мнение, что для генов, ответственных за значительную часть дефектов, называемых «ядерными генами», чувствительность не должна снижаться при переходе от Сэнгера к NGS. Серьезная проблема возникает в отношении генов *BRCA1* и *BRCA2*, где, как сообщается, чувствительность секвенирования по Сэнгеру плюс анализ делеций/дупликаций достигает 99%. Это рассуждение в равной степени применимо и к другим генам с высокой диагностической ценностью. Добавление дополнительных генов, безусловно, повысит диагностический результат, но это не должно происходить за счет отсутствующих мутаций, которые могли быть обнаружены ранее. Таким образом, возрастающая скорость обнаружения является ключевым определяющим фактором при определении списка основных генов и при устранении пробелов.

6. *Во избежание малоинформативного тестирования, в интересах пациентов клинические и лабораторные эксперты должны составить «списки генов основных заболеваний».*

Лаборатории будут применять различные (технические и диагностические) параметры для тестов NGS, независимо от руководящих принципов. Действительно, слишком много переменных все еще не могут быть исправлены с помощью директивных указаний. Поэтому рекомендована простая рейтинговая система для диагностики NGS, гарантирующая справедливую оценку и несложное сравнение между тем, что предлагают разные лаборатории:

Тест типа А: лаборатория гарантирует >99% точность покрытия целевых регионов и обнаружения вариантов кодирующей области и фланкирующих интронных последовательностей и дополняет все допущенные пробелы тестирования секвенированием по Сэнгеру (или другим дополнительным анализом секвенирования), и, в зависимости от используемой платформы, выполняет дополнительный анализ, например, экспансии повторов.

Тест типа В: лаборатория точно описывает, какие регионы секвенированы с >99% точностью покрытия целевых регионов и обнаружением вариантов и дополняет некоторые пробелы с помощью секвенирования по Сэнгеру (или другого).

Тест типа С: зависит исключительно от качества секвенирования NGS, при этом не предлагается дополнительное секвенирование по Сэнгеру (или другое).

7. *Простая рейтинговая система на основе охвата и результатов*

диагностики должна позволять сравнивать предложения диагностических исследований между лабораториями.

Информированное согласие и информация для пациента и врача

Последствия диагностического теста на основе NGS зависят от процедур, платформ, процессов фильтрации и хранения данных, используемых в лаборатории. Таким образом, крайне важно, чтобы направляющий врач был полностью информирован об ограничениях и возможных неблагоприятных последствиях генетического теста.

8. *Лаборатория должна предоставить для каждого теста NGS: болезни, на которые он направлен, название тестируемых генов, исследуемые регионы этих генов, аналитическую чувствительность и специфичность и, если возможно, заболевания, не относящиеся к клиническому фенотипу, что может быть вызвано мутациями в тестируемых генах.*

Последствия теста, основанного на NGS, связаны с возможностью получения случайных и вторичных находок. В генах, связанных с тестируемым заболеванием, обнаруживаются случайные находки, в то время как вторичные находки выявляют в генах заболеваний, не связанных с этиологией тестируемого заболевания.

9. *Процесс анализа в диагностических лабораториях должен быть сосредоточен на исследуемой генной панели, чтобы избежать возможности получения вторичных находок, и пройти соответствующую валидацию.*

Вероятность случайных находок в панели генов очень мала и, в основном, зависит от задействованных генов. Однако, могут быть обнаружены гетерозиготные мутации в рецессивных состояниях, что позволит выявить носителей заболевания. Это будет иметь последствия для консультирования, репродуктивного выбора и т.д..

10. *Лаборатории должны предоставлять информацию о вероятности незапрашиваемых результатов.*

Перед внедрением теста на основе NGS клинический (генетический) центр должен разработать «протокол незапрошенных и вторичных результатов», соответствующий решениям этического комитета. На уровне лаборатории, института или на национальном уровне необходимо решить следует ли предлагать пациентам варианты согласия или отказа от получения дополнительной информации, помимо первоначального результата диагностики. В протоколе также должно быть указано, сообщать или нет о нежелательных результатах и статусе носителя. Лаборатория должна убедиться, что она может управлять различными предлагаемыми вариантами.

11. *Если клинический центр или лаборатория решат предложить пациентам протокол отказа от участия в программе по получению статуса носителя несвязанных заболеваний и вторичных находок, все логистические вопросы должны быть покрыты.*

Кроме того, необходимо предварительное генетическое консультирование, которое должно включать обсуждение как ожидаемых результатов, так и возможных нежелательных и вторичных результатов. Должна быть предоставлена адекватная информация.

12. Внутренняя политика в отношении распространения случайных и вторичных находок должна быть ясной для пациента.

13. Пациентам рекомендуется предоставить письменный информационный буклет или информацию, доступную в Интернете.

Проверка

Качество образца представляет собой комбинацию многих параметров, таких как количество полученных данных, доля дубликатов ПЦР и покрытие. В диагностических условиях необходимо анализировать только образцы хорошего качества. Таким образом, важно определить критерии для характеристики высококачественных целевых генных панелей, экзомов или геномов.

14. Все показатели качества NGS, используемые в диагностических процедурах, должны быть точно описаны.

Технология NGS требует мониторинга характеристик, специфичных для прогона и анализа/образца. Данные мониторинга не обязательно сообщать, но их следует использовать для постоянной проверки.

15. Диагностическая лаборатория должна внедрить структурированную базу данных для соответствующих показателей качества для (1) платформы, (2) всех анализов и (3) всех обработанных образцов.

Необходимо использовать метод отслеживания образцов, поскольку рабочие процессы NGS очень сложны и включают несколько этапов обработки как в условиях лаборатории, так и во время вычислительного анализа.

16. Аспекты отслеживания образцов и установки штрих-кода для идентификации образцов следует рассматривать во время оценки анализа и включать в валидацию платформы.

Во время валидации платформы лаборатория должна убедиться, что все ее устройства и реагенты удовлетворяют требованиям производителей. Ограничения каждой технологии должны быть выявлены и учтены при разработке тестов и анализе данных. Лаборатории могут различать функции (для проверки), которые относятся к платформе, конкретному тесту или конвейеру анализа.

17. Точность и прецизионность должны быть частью общей проверки платформы и работу не нужно повторять для отдельных методов или тестов.

Очевидно, что у каждой технологии секвенирования есть свои сильные и слабые стороны. Инструменты биоинформатики должны отражать эти характеристики.

18. Конвейер биоинформатической обработки должен быть адаптирован к используемой технической платформе.

Во время проверки конвейера диагностические характеристики должны быть измерены путем оценки аналитической чувствительности и специфичности. Например, алгоритмы, оптимизированные для обнаружения SNP, менее точны для (небольших) вставок или удалений. Лаборатория должна показать, что она знает о таких особенностях и что конвейеры для обнаружения вариантов адекватно протестированы.

19. Аналитическая чувствительность и аналитическая специфичность должны устанавливаться отдельно для каждого типа варианта во время валидации конвейера.

Любые изменения в химических компонентах и реакциях, протоколах обогащения или платформе биоинформатического анализа потребуют повторной проверки.

20. Диагностическая лаборатория должна валидировать все части биоинформатического конвейера (инструменты, являющиеся общественным достоянием, или коммерческие программные пакеты) со стандартными наборами данных всякий раз, когда вносятся соответствующие изменения (новые версии).

Собственная база данных, содержащая все соответствующие варианты, представляет собой важный инструмент для выявления артефактов, специфичных для платформы, отслеживания результатов проверки и предоставления прокси-сервера для обмена базами данных и метаанализами, специфичными для локуса. Как правило, эта база данных должна допускать дополнительные аннотации (например, ложноположительные результаты, опубликованные мутации, разделение вариантов и т. д.), которые значительно упрощают процесс диагностики.

21. Диагностическая лаборатория должна внедрить/использовать структурированную базу данных для всех соответствующих вариантов с текущими аннотациями.

Хранение данных должно соответствовать стандартным открытым форматам файлов FASTQ, BAM и VCF, которые также следует использовать для обмена данными с другими лабораториями. При сохранении результатов анализа, должны сохраняться максимально полные файлы журналов, чтобы весь анализ от данных FASTQ до диагностического отчета был воспроизводимым. К сожалению, пока нет (международного) консенсуса в отношении того, что следует хранить. Однако хранение должно соответствовать национальным требованиям и здравому смыслу.

22. Диагностическая лаборатория должна принять меры для долгосрочного хранения всех соответствующих форматов данных.

Перед запуском любого анализа необходимо определить клиническую цель, то есть все кодирующие области плюс консервативные сайты сплайсинга. Клиническая цель зависит от диагностического теста и определенной генной панели.

23. Отчетный диапазон, то есть объем исследования для выявления значимые варианты согласно цели клинического поиска, должен быть

определен во время разработки теста и должен быть доступен клиницисту (либо в отчете, либо в цифровом виде).

24. *Требования к «регистрируемому диапазону» зависят от цели анализа.*

Например, анализ секвенирования экзома, для достижения высокого диагностического результата, не требует дополнительного анализа для высокого покрытия всех охватываемых областей генома, но требует четкого информирования врача о том, что тест нельзя использовать для исключения определенного клинического диагноза. Эффективность диагностического теста должна оцениваться с точки зрения точности, аналитической чувствительности, аналитической специфичности и прецизионности. В принципе, это не ново, но обычно считается громоздким. Однако нормы ISO очень строги в этом отношении.

25. *При каждом внесении существенных изменений в тест, необходимо проверять параметры качества и проводить повторный анализ образцов. Лаборатория должна заранее определить, какие образцы и количество случаев необходимо анализировать при каждом обновлении метода.*

Составление отчетов

Крайне важно сообщать результаты NGS в ясной и последовательной форме, поскольку лабораторные отчеты могут быть прочитаны как экспертами, так и неспециалистами. С практической точки зрения, клинически значимые выводы, соответствующие тесты и данные о качестве тестов должны быть размещены на первой странице (Приложение 1).

26. *В отчете об анализе NGS должны быть представлены идентификация и диагноз пациента, краткое описание теста, сводка результатов и основные результаты на одной странице.*

Необходимо сообщать обо всех патогенных (класс 5) и вероятно патогенных (класс 4) вариантах. Сообщать или не сообщать о неклассифицированных вариантах (UV — класс 3), будет зависеть от характеристик варианта и внутренних протоколов лаборатории. Последнее должно быть понятно лабораторным специалистам и направляющим клиницистам.

27. *Лаборатория должна установить и задокументировать свой внутренний протокол в соответствии с международными рекомендациями для сообщения о генетических вариантах до проведения анализа такого типа.*

28. *Необходимо собрать данные об UF, с целью окончательной классификации и этих вариантов.*

Необходима деятельность сообщества по сбору и обмену доступной информацией с целью однозначной классификации вариантов на патогенные (класс 5) или доброкачественные (класс 1). Политика, принятая лабораторией или институтом в отношении случайных и вторичных находок, должна быть отражена в лабораторной практике и в отчете.

29. *Лаборатории должны иметь четко определенный протокол для рассмотрения случайных и вторичных находок до запуска*

теста.

Диагностическая лаборатория не должна быть перегружена запросами на анализ «старых» данных с учетом новых результатов и прогресса в этой области. Диагностический запрос — это контракт на определенный момент времени. Лаборатория сможет предложить только то, что известно и подтверждено в данный момент времени.

30. *Лаборатории не нужно систематически проводить повторный анализ старых данных и сообщать о новых результатах, даже если изменится основная панель генов болезни.*

С другой стороны, если в какой-то момент лабораторией или сообществом специалистов по заболеванию будет принято решение переклассифицировать вариант из одного класса в другой, лаборатория несет ответственность за повторный анализ имеющихся данных, составления отчета на основе новых данных, а также повторное обращение к лечащим врачам пациентов, для которых, возможно, имеет значение новый статус варианта. В такой ситуации необходима систематизированная база данных, эффективно связывающая пациентов и выявленные у них варианты, позволяющая извлекать затронутые случаи при переклассификации вариантов.

31. *Чтобы иметь возможность мониторинга клинических характеристик, лаборатория должна создать локальную базу данных вариантов при различных заболеваниях, при которых предлагается тестирование на основании клинических показаний.*

Различие между исследованием и диагностикой

С увеличением возможностей полногеномного тестирования в диагностических и исследовательских целях, грань между диагностикой и исследованиями стирается. Таким образом, важно описать, что можно и нужно делать с диагностическими данными пациентов, для какого типа анализа требуется согласие на исследование (дополнительное). Однако, это не исключает предложения о проведении дополнительных исследований в ходе диагностического поиска. Но различие между исследованием и диагностикой должно быть всегда ясным.

32. *Диагностический тест – это любой тест, направленный на ответ на клинический вопрос, связанный с состоянием здоровья пациента.*

33. *Исследовательский тест основан на гипотезе, и результат может иметь ограниченную клиническую значимость для пациента, включенного в проект.*

34. *Результаты диагностического теста, особенно путем анализа всего экзоса или генома, могут генерировать гипотезы.*

Использование данных экзоса или генома, полученных с помощью NGS, в диагностических условиях допустимо, если целью является получение генетического диагноза, а анализ ограничен генами, которые, как известно, связаны с (этим) заболеванием.

35. *Диагностические тесты, основной целью которых является поиск диагноза у одного пациента, должны проводиться в аккредитованной*

лаборатории.

При участии в исследовательском проекте пациенты и их семьи должны знать, что такой проект может привести к диагностике или прогностической информации о генетическом заболевании. В исследованиях клинически значимые результаты должны быть перенесены в медицинскую карту пациента только после подтверждения в диагностических условиях.

36. Результаты исследований должны быть подтверждены в аккредитованной лаборатории до того, как они будут переданы пациенту.

Большинство лабораторий создали базу данных частот вариантов всех локально секвенированных и/или проанализированных образцов (и, в идеале, здоровых родителей), чтобы упростить интерпретацию вариантов. Поскольку такая база данных не содержит конфиденциальной информации, соображения, основанные на правилах конфиденциальности, не перевешивают важность таких данных для улучшения диагностики и здравоохранения.

37. Следует предоставить частоты всех вариантов, обнаруженных у здоровых людей, секвенированных в диагностических и/или исследовательских условиях.

В идеале все варианты, обнаруженные в генах, сцепленных с заболеванием, должны быть включены в базы данных патогенных вариантов и связаны с клиническими данными пациента. Критерии и аргументы, используемые для классификации вариантов, также должны быть четко описаны.

38. Все зарегистрированные варианты должны быть переданы путем отправки в федеративные, региональные, национальные и/или международные базы данных.

7. Рекомендации организации клинико-диагностического секвенирования с помощью WGS/WES

(в контексте редких заболеваний) [122]

- 1. Рекомендовано внедрить анализ WGS в медицинские организации, что существенно повысит качество, эффективность и/или диагностический результат.*
- 2. Диагностические WGS для редких заболеваний и при раке (а также другие подходы к генетическому тестированию) должны выполняться только в аккредитованных лабораториях.*
- 3. NGS непозволительно внедрять в клиническую практику без валидации тестов.*
- 4. Подтверждение, интерпретация и сообщение пациенту о результатах, полученных в условиях молекулярно-генетического исследования, всегда следует выполнять после повторного тестирования (предпочтительно) независимого образца от пациента.*

Диагностическая маршрутизация

Цель диагностического маршрута - выбор наиболее эффективной и актуальной диагностической стратегии для установления молекулярного диагноза (по времени и по стоимости). Хотя WGS и WES все чаще внедряются

в качестве диагностических тестов первого уровня, врачи, направляющие пациента на исследование, должны знать о существовании более эффективных диагностических тестов для конкретных заболеваний.

Диагностическая маршрутизация описывает поток образцов и доступных генетических тестов для данного заболевания в блок-схеме и дает представление о диагностических процессах и возможностях [123]. Диагностический маршрут может включать в себя различные лабораторные методики (например, MLPA), секвенирование по Сэнгеру и NGS), а также нацеливаться на разные гены. В этом контексте классические генетические тесты могут предшествовать WGS и другим NGS-тестам. Диагностические пути, в которых определенные гены могут быть проанализированы до WGS, в основном связаны с высокой частотой мутаций в этих генах для определенного заболевания, например, *FBN1* при классическом синдроме Марфана, *SCN1A* при синдроме Драве/SMEI или *CFTR* при муковисцидозе.

5. *Лаборатория должна предоставить врачу информацию о том, для какого типа вариантов валидирован генетический тест.*
6. *Следует учитывать ограничения WGS и сообщать об этом лечащему врачу.*
7. *В диагностических целях следует указывать только те гены, для которых была подтверждена четкая связь с заболеванием. Варианты генов с неизвестной функцией могут быть перечислены в независимом исследовательском отчете.*
8. *Диагностическое тестирование должно давать ответ на клинический вопрос. Рекомендовано отдавать предпочтение анализу одной (или более) генной панели *in silico* с применением стратегии фильтрации, а также использовать тестирование «трио» для нарушений, часто вызываемых вариантами *de novo*.*
9. *Для интерпретации вариантов генов, вызывающих моногенное заболевание, следует использовать «5-уровневую систему классификации».*
10. *Большие CNV следует интерпретировать с использованием баз данных, включая цитогеномные aberrации.*
11. *Рекомендуется анализировать и сообщать о вариантах вне экзона только в том случае, если они (вероятно) патогенны. Отчет о VUS (варианты неопределенного значения) должен сообщаться только в том случае, если последующие исследования могут дать более полное представление о патогенности.*
12. *Для интерпретации вариантов необходимо иметь клиническую информацию о пациенте (и родителях при проведении трио-анализа), желательно в стандартизированных терминах, таких как HPO (онтология фенотипа человека (<https://hpo.jax.org/app/>)).*
13. *Диагностическая лаборатория должна внедрить и использовать структурированную базу данных для всех классифицированных*

вариантов с текущими аннотациями.

14. *Следует обмениваться о выявленных вариантами, отправляя их в федеративные, региональные, национальные и/или международные базы данных, доступные лабораторным генетикам и исследователям.*

Биоинформатическая обработка

При реализации последовательности алгоритмов биоинформатической обработки, используемого для анализа данных WGS, необходимо учитывать нижепредставленные рекомендации, в том числе по форматам данных, процедурам хранения и проверки. Конвейер биоинформатической обработки определяется как все программное обеспечение, используемое от анализа необработанных данных до аннотации/приоритизации вариантов.

15. *Следует использовать самую последнюю аннотированную версию референсного генома.*
16. *Следует использовать стандартные форматы данных.*
17. *Конвейер биоинформатической обработки должен быть адаптирован к используемой технической платформе.*
18. *Рекомендуется разработать и определить протокол для поддержания в актуальном состоянии инструментов биоинформатики, используемых для обнаружения и аннотации вариантов.*
19. *Для проверки и стандартизации инструментов биоинформатики следует использовать оптимально охарактеризованные эталонные (контрольные) образцы.*
20. *Диагностическая лаборатория должна периодически проверять все части биоинформатического конвейера (инструменты, являющиеся общественным достоянием, или пакеты коммерческого программного обеспечения) со стандартными наборами данных и при каждом внесении соответствующих изменений (новые версии).*
21. *Следует принять параметры качества для мониторинга аналитического процесса (при контроле процесса) и для оценки качества используемых методов. Для кодирующих регионов общее качество данных должно быть, по крайней мере, таким же, как в данных WES (секвенирование полного экзома). Все показатели качества NGS, используемые в процедурах диагностики, должны быть точно описаны и сохранены в базе данных.*
22. *Конвейер биоинформатической обработки должен быть проверен для всех, подлежащих вынесению в отчет, типов вариантов, включая как минимум SNV (однонуклеотидный вариант), небольшие вставки/делеции и CNV (вариации числа копий, являющиеся изменениями, приводящими к аномальному количеству копий одного или нескольких генов).*
23. *Все варианты WGS должны быть аннотированы.*
24. *Частоты вариантов должны вноситься во внутреннюю базу данных.*
25. *Диагностическая лаборатория должна внедрить протокол для*

долгосрочного хранения всех соответствующих наборов данных.

Оценка качества

Валидация и оценка качества WGS - это внутренняя проверка и сравнение результатов тестирования, проводятся для обеспечения соответствия результата продукта (или его части, или набора результатов) эксплуатационным потребностям пользователя.

В данном контексте речь о производительности и использовании метода тестирования, а не о проверке или подтверждении (наличия) варианта.

Большинство аспектов валидации и верификации применимы на текущий период времени [121].

26. *Отчетный диапазон должен быть определен во время разработки теста и должен быть доступен клиницисту.*
27. *При диагностическом тестировании ДНК из разных типов биологического материала (например, кровь, слюна), каждый тип биоматериала должен проходить валидацию отдельно, как для «мокрых», так и для других лабораторных процедур.*
28. *При каждом внесении серьезных изменений в тест, необходимо проверять параметры качества, а набор проверочных образцов необходимо повторно запускать как часть проверки.*
29. *Аспекты отслеживания образцов и установки штрихового кодирования для идентификации образцов следует рассмотреть во время оценки анализа и включить в валидацию платформы.*
30. *Варианты, соответствующие предварительно определенным показателям качества, не требуют подтверждения вторым методом.*

Этические соображения

Внедрение WGS увеличило вероятность обнаружения вариантов, предрасполагающих к заболеванию, отличному от исходного клинического вопроса (случайные или вторичные находки; UF или SF). Так например, существует возможность обнаружения таких заболеваний, как болезнь Гентингтона (при условии, что лаборатория способна обнаруживать экспансии повторов). Хотя риск и тип UF различны для WGS, информация, касающаяся запроса клиницистов, по существу не меняется, поскольку первоначальный запрос отличен от клинического значения вторичных находок.

31. *Лаборатории должны иметь четко определенный протокол для вынесения в отчет случайных находок до начала выполнения анализа.*
32. *До проведения клинического WGS, клиницисты должны предоставить генетическое консультирование и получить информированное согласие.*
33. *Лаборатория должна предвидеть возможные дополнительные исследования в результате обнаружения случайных находок.*
34. *Лаборатория не должна систематически проводить переанализ данных и сообщать о новых результатах, за исключением*

- случаев, касающихся прямого запроса или для обеспечения качества.
35. *Результаты диагностического теста, особенно путем анализа всего генома, могут быть неокончательными для постановки молекулярного диагноза, но могут послужить основанием для выдвижения гипотез об этиопатогенезе заболеваний.*
 36. *Данные WGS могут использоваться в исследовательских целях только с надлежащего информированного согласия пациента.*

Составление отчетов

Отчет о генетическом тесте должен давать четкий, краткий, точный, полностью интерпретируемый и авторитетный ответ на клинический вопрос [124, 125].

37. *Для каждого NGS-теста лаборатория должна предоставить: диагностическую стратегию, типы обнаруженных генетических вариантов, их отчетный диапазон, аналитическую чувствительность и точность.*
38. *В отчете о NGS-анализе на одной странице должны быть указаны: идентификация пациента и причина направления, краткое описание теста, сводка результатов и основные результаты.*
39. *В каждом отчете следует указывать сборку референсного генома и версию транскрипта эталонного гена.*
40. *При наличии, следует указать ссылку на OMIM (база данных заболеваний человека с менделевским наследованием (<https://www.omim.org/>)).*
41. *Лаборатория должна установить и задокументировать свои процедуры, выполняемые типы анализов NGS, в соответствии с международными рекомендациями, для сообщения об искомых генетических вариантах до проведения анализа.*
42. *VUS следует сообщать только в том случае, если фенотип, связанный с соответствующим геном (болезни), совпадает с клиническими особенностями пациента и при наличии возможности провести последующие исследования для получения дополнительной информации о патогенности варианта.*
43. *Следует сообщать о результатах исследований, которые не подтверждаются или исключаются клиническим диагнозом.*
44. *Отчеты WGS должны быть предоставлены лечащему врачу. В отчет должны быть включены рекомендации по направлению пациента и членов его семьи на генетическое консультирование.*

8. Рекомендации по организации геномного секвенирования для целей общественного здравоохранения (эпидемиологический надзор) [80].

До начала организации процесса геномного секвенирования следует конкретизировать:

- каковы ожидаемые результаты от геномного секвенирования;
- какой биоматериал будет исследоваться для получения ожидаемых результатов;

- какие метаданные или дополнительные источники данных будут иметь решающее значение;
- кто участники процесса (заинтересованные стороны и лица), какова их зона ответственности и как обеспечить механизм их эффективного взаимодействия;
- соответствует ли разработка проекта по геномному секвенированию национальным и международным нормам права и этическим принципам;
- имеется ли в полном объеме финансовое и ресурсное обеспечение процесса геномного секвенирования (оборудование, расходные материалы и подготовленные кадры для проведения всех этапов анализа (отбор образцов, лабораторные процедуры секвенирования, биоинформационный, филогенетический и другие виды анализа));
- как обеспечить в полном объеме процесс обмена данными между заинтересованными сторонами/лицами;
- как достичь поставленные цели, не создавая препятствия для других направлений клинической лабораторной диагностики, во избежание дублирования усилий;
- как оценить программу на предмет экономической эффективности и клинической пользы.

Контрольный перечень мероприятий по организации программы секвенирования для общественного здравоохранения (эпидемиологический мониторинг)

1. *Определить цель программы секвенирования.*
 - 1.1. Определить клиничко-диагностическую информацию, которую может предоставить секвенирование, в дополнение к другим существующим подходам, оценить ее большую или меньшую эффективность относительно затрат.
2. *Определить и привлечь заинтересованные стороны/лица.*
 - 2.1. Составить перечень ключевых действующих лиц.
 - 2.2. Обсудить цели программы с руководителями групп заинтересованных сторон и определить обязанности каждой группы.
 - 2.3. Предусмотреть возможность обмена учебными материалами о потенциале и требованиях в отношении секвенирования с заинтересованными сторонами.
 - 2.4. Определить каналы сотрудничества между ключевыми заинтересованными сторонами, необходимые для обеспечения оперативного перемещения образцов, направления запросов на получение и использование результатов.
 - 2.5. Обеспечить четкие и надежные связи между заинтересованными сторонами.
3. *Технические мероприятия.*
 - 3.1. В ходе консультации с руководителями групп по выявлению случаев и анализа, определить уровень геномной выборки и метаданные, необходимые для достижения поставленных целей.
 - 3.2. Выбрать соответствующие протоколы подготовки образцов и библиотек.
 - 3.3. Выбрать соответствующие биоинформационные протоколы.
 - 3.4. Выбрать соответствующие аналитические протоколы.

4. *Логистика*

- 4.1. Определить место проведения секвенирования и анализа (например, в клинико-диагностической лаборатории ДЗМ, в привлеченной коммерческой или научной лаборатории).
 - 4.2. Определить источники финансирования для обеспечения лабораторного секвенирования, анализа и хранения данных.
 - 4.3. Обеспечить наличие достаточного количества реагентов и компьютерных мощностей, а также устойчивое бесперебойное снабжение этими материалами и оборудованием.
 - 4.4. Обеспечить наличие достаточной численности подготовленных кадров, обладающих требуемой квалификацией для осуществления программы на каждом ее этапе.
 - 4.5. На всех этапах процесса обеспечить надлежащую стабильность образцов, посредством поддержания холодной цепи или принятием других необходимых мер.
 - 4.6. Обеспечить надлежащий сбор и хранение метаданных, их достоверную привязку к биологическим образцам.
 - 4.7. Предусмотреть возможность дополнительной нагрузки, которую создаст секвенирование на действующие службы общественного здравоохранения, и разработать меры по ее снижению.
 - 4.8. Для крупномасштабных программ секвенирования определить пути оптимизации обмена данными и образцами между участвующими группами (например, оценить возможность использования идентификации по единственному образцу и идентичных форматов метаданных).
- #### 5. *Обеспечение безопасной и этичной среды.*
- 5.1. Провести надлежащую этическую оценку процессов генерирования, использования и хранения данных о последовательностях и, связанных с ними, метаданных.
 - 5.2. Оценить риски, связанные с процедурами секвенирования, для обеспечения надлежащей биобезопасности на всех этапах.
 - 5.3. Оценить риски, связанные с процедурами секвенирования, для обеспечения надлежащей биозащищенности в соответствии с национальным и региональным законодательством.
 - 5.4. Рассмотреть возможность кадровых перестановок, включая необходимость перераспределения персонала или трудоустройства дополнительных работников для поддержания индивидуальной рабочей нагрузки на разумном уровне.
 - 5.5. При необходимости, обеспечить безопасность маршрутизации кадрового персонала на рабочие места и безопасность на рабочем месте в соответствии с требованиями Роспотребнадзора.
 - 5.6. Предусмотреть меры, необходимые для поддержания программы секвенирования, в случаях, когда ключевые сотрудники по уважительной

причине вынуждены отсутствовать на рабочем месте.

6. *Обмен данными.*

6.1. Согласовать между всеми заинтересованными сторонами те последовательности и метаданные, которые поступят в открытый доступ, через какие платформы и в какие сроки (Приложение 2, Приложение 3).

6.2. Согласовать между всеми заинтересованными сторонами вопрос о возможности предоставления доступа к тем или иным метаданным для ограниченного числа пользователей, с разработкой стратегии их безопасной передачи.

6.3. Обеспечить соответствие процесса обмена данными требованиям национальных и международных правовых норм и правил.

7. *Оценка эффективности программы.*

7.1. Предусмотреть возможность регулярного проведения оценки эффективности программы секвенирования, с учетом имеющихся достижений и ограничений.

7.2. Обеспечить внедрение системы мониторинга и оценки для определения эффективности программы секвенирования по техническим показателям (контроль качества и др.) и по показателям эффективности для достижения поставленных целей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ [126]

1. Технологические разработки дают возможность клинического применения целевой панели генов и секвенирования экзона, а также секвенирования всего генома.
2. Методы секвенирования, по-прежнему, имеют свои плюсы и минусы в отношении: глубины результирующих данных, биоинформационных трудностей анализа полученной информации, возможности дополнительных выводов и т.д..
3. Фильтры с заранее заданными параметрами (выбор мишеней для панели генов и секвенирование экзона) и фильтры с программным кодированием (WGS и WES) помогают сократить пространство поиска, ограничивая усилия биоинформатики по анализу всех полученных данных, по дополнительным и второстепенным находкам, имеющим прямое медицинское значение, и важным для контроля заболеваемости.
4. С этической точки зрения остается спорным вопрос о целесообразности невынесения в заключение всех возможных дополнительных результатов тестирования, т.к. некоторые из них могут иметь клиническое значение для человека.
5. Результат генетического теста, актуальный на текущий период времени, через несколько лет может быть модифицирован, даже если данные тестирования останутся прежними, поскольку научные открытия могут по-новому связывать или опровергать ассоциации болезней с определенными вариантами.
6. Процесс консультирования лиц, проходящих генетическое тестирование,

очень сложен из-за обширности очень личной информации, которая может (в секвенировании геномной панели) или должна (в WGS) быть раскрыта, поэтому информированное согласие является обязательным условием для проведения генетического тестирования.

7. Для защиты информационного самоопределения необходимы активные образовательные усилия на уровне пациентов и поставщиков медицинских услуг и институциональное управление защитой конфиденциальности.
8. Необходимы меры для обеспечения гарантии максимальной защиты людей и их данных, а также законного использования полученных результатов в перспективе.
9. Лица, прошедшие генетическое тестирование, должны учитывать все риски при принятии решения о распространении своих личных генетических данных в социальных сетях и в облаках.

ВЫВОДЫ

Технологии NGS быстрыми темпами внедряются в клиническую практику отечественного здравоохранения. В связи с чем, представленные методические рекомендации необходимы для уменьшения необоснованных отклонений в практике, минимизации риска ошибок и вреда для пациентов, а также для поощрения передового опыта. Они составлены в форме консультативного документа по клинко-диагностической лабораторной практике и могут быть полезными на текущий период времени, т.к. проясняют потенциальные преимущества и риски различных вариантов действий и выявляют пробелы в знаниях, которые важно своевременно устранить.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ma C, Wang X, Wu J, et al. Real-world big-data studies in laboratory medicine: current status, application, and future considerations. *Clin Biochem.* 2020;84:21–30.
2. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-T oydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, Friez MJ, Funke BH, Hegde MR, Lyon E, Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med* 2013;15:733–47.
3. M atthijs G, Souche E, Alders M, Corveleyn A, Eck S, Feenstra I, Race V, Siermans E, Sturm M, Weiss M, Yntema H, Bakker E, Scheffer H, Bauer P, EuroGentest, European Society of Human Genetics. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet* 2016;24:2–5.
4. Birney E, Vamathevan J, Goodhand P. Genomics in healthcare: GA4GH looks to 2022. *bioRxiv.* 2017. <https://doi.org/10.1101/203554>.

5. Stark Z, Dolman L, Manolio TA, Ozenberger B, Hill SL, Caulfield MJ, et al. Integrating Genomics into Healthcare: A Global Responsibility. *Am J Hum Genet.* 2019;104:13–20.
6. Delanne J, Nambot S, Chassagne A, Putois O, Pelissier A, Peyron C, et al. Secondary findings from whole-exome/genome sequencing evaluating stakeholder perspectives. A review of the literature. *Eur J Med Genet.* 2019;62:103529.
7. Kraft SA, Duenas D, Wilfond BS, Goddard KAB. The evolving landscape of expanded carrier screening: challenges and opportunities. *Genet Med.* 2019;21:790–7.
8. Downie L, Halliday J, Lewis S, Amor DJ. Principles of Genomic Newborn Screening Programs: A Systematic Review. *JAMA Netw Open.* 2021;4:e2114336.
9. Friedman JM, Cornel MC, Goldenberg AJ, Lister KJ, Sénécal K, Vears DF, et al. Genomic newborn screening: public health policy considerations and recommendations. *BMC Med Genomics.* 2017;10:9.
10. Pervola J, Myers MF, McGowan ML, Prows CA. Giving adolescents a voice: the types of genetic information adolescents choose to learn and why. *Genet Med.* 2019;21:965–71.
11. Sullivan HK, Bayefsky M, Wakim PG, Huddleston K, Biesecker BB, Hull SC, et al. Noninvasive Prenatal Whole Genome Sequencing: Pregnant Women’s Views and Preferences. *Obstet Gynecol.* 2019;133:525–32.
12. Daack-Hirsch S, Driessnack M, Hanish A, Johnson VA, Shah LL, Simon CM, et al. ‘Information is information’: a public perspective on incidental findings in clinical and research genome-based testing. *Clin Genet.* 2013;84:11–8.
13. Hufnagel SB, Martin LJ, Cassidy A, Hopkin RJ, Antommaria AH. Adolescents’ preferences regarding disclosure of incidental findings in genomic sequencing that are not medically actionable in childhood. *Am J Med Genet A.* 2016;170:2083–8.
14. Vornanen M, Aktan-Collan K, Hallowell N, Konttinen H, Haukkala A. Lay Perspectives on Receiving Different Types of Genomic Secondary Findings: a Qualitative Vignette Study. *J Genet Counseling.* 2019;28:343–54.
15. Bilkey GA, Burns BL, Coles EP, Bowman FL, Beilby JP, Pachter NS, et al. Genomic Testing for Human Health and Disease Across the Life Cycle: Applications and Ethical, Legal, and Social Challenges. *Front Public Health.* 2019;7:40.
16. Steyaert W, Callens S, Coucke P, Dermaut B, Hemelsoet D, Terryn W, et al. Future perspectives of genome-scale sequencing. *Acta Clin Belgica.* 2018;73:7–10.
17. Nowak KJ, Bauskis A, Dawkins HJ, Baynam G. Incidental inequity. *Eur J Hum Genet.* 2018;26:616–7.
18. Byun M, Feller H, Ferrie M, Best S. Living with a genetic, undiagnosed or rare disease: A longitudinal journalling study through the COVID-19 pandemic. *Health Expect.* 2021;1–12.
19. Andermann A, Blancquaert I, Beauchamp S, et al. Revisiting Wilson and Jungner in the genomic age: a review of screening criteria over the past 40 years. *Bull World Health Organ.* 2008;86(4):317–319.

20. Flores M, Glusman G, Brogaard K, et al. P4 medicine: how systems medicine will transform the healthcare sector and society. *Per Med*. 2013;10(6):565–576.
21. Gaille M, Horn R. The ethics of genomic medicine: redefining values and norms in the UK and France. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2021;29:780–8. <https://www.nature.com/articles/s41431-020-00798-2>
22. Saunders G, Baudis M, Becker R, Beltran S, Bérout C, Birney E, et al. Leveraging European infrastructures to access 1 million human genomes by 2022. *Nat Rev Genet*. 2019;20:693–701.
23. Wolf SM, Ossorio PN, Berry SA, Greely HT, McGuire AL, Penny MA, et al. Integrating rules for genomic research, clinical care, public health screening and DTC testing: creating translational law for translational genomics. *J Law, Med Ethics*. 2020;48:69–86.
24. Ginsburg GS, Phillips KA. Precision medicine: from science to value. *Health Aff*. 2018;37:694–701.
25. Rehm HL, Page AJH, Smith L, Adams JB, Alterovitz G, Babb LJ, et al. GA4GH: International policies and standards for data sharing across genomic research and healthcare. *Cell Genomics* [Internet]. 2021;1:100029. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2666979X21000367>
26. Molnár- Gábor F, Korbelt JO. Genomic data sharing in Europe is stumbling— Could a code of conduct prevent its fall? *EMBO Mol Med* [Internet]. 2020;12. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/emmm.201911421>
27. Watson J, Crick F. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953;171:737–738.
28. Ceccaldi R, Rondinelli B, D’Andrea AD. Repair pathway choices and consequences at the double-strand break. *Trends Cell Biol*. 2016;26(1):52–64.
29. Wu S, Powers S, Zhu W, et al. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature*. 2016;529(7584):43–47.
30. Bebenek K, Kunkel TA. Functions of DNA polymerases. *Adv Protein Chem*. 2004;69:137–165.
31. Heitzer E, Tomlinson I. Replicative DNA polymerase mutations in cancer. *Curr Opin Genet Dev*.
32. Xu C, Zhou W, Wang Y, et al. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2014;345(2):216–222.
33. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457):214–218.
34. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine JHUB, MD). Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM; [cited 2016 May 13]. Available from: <http://www.omim.org/>
35. Rausch T, Jones DT, Zapatka M, et al. Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations. *Cell*. 2012;148(1–2):59–71.
36. Biesecker BB, Boehnke M, Calzone K, et al. Genetic counseling for families with inherited susceptibility to breast and ovarian cancer. *JAMA*. 1993;269(15):1970–1974.

37. Nagase H, Nakamura Y. Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. *Hum Mutat.* 1993;2(6):425–434.
38. Raymond VM, Gray SW, Roychowdhury S, et al. Germline findings in tumor-only sequencing: points to consider for clinicians and laboratories. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108:4.
39. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature.* 2009;458:719–724.
40. Vissers LE, Gilissen C, Veltman JA. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat Rev Genet.* 2016;17(1):9–18.
41. Sudmant PH, Rausch T, Gardner EJ, et al. An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature.* 2015;526:(7571):75–81.
42. Rusk, N. Finding copy-number variants. *Nat Methods* **5**, 917 (2008). <https://doi.org/10.1038/nmeth1108-917>.
43. Roberts NJ, Vogelstein JT, Parmigiani G, et al. The predictive capacity of personal genome sequencing. *Sci Transl Med.* 2012;4(133):133ra58.
44. Kohane IS, Masys DR, Altman RB. The incidentalome: a threat to genomic medicine. *Jama.* 2006;296(2):212–215.
45. Green RC, Berg JS, Grody WW, et al., et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med.* 2013;15(7):565–574.
46. Diamandis EP, Li M. The side effects of translational omics: overtesting, overdiagnosis, overtreatment. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(3):389–396.
47. Richards, 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.* 17, 405–424 (2015).
48. Philippakis, A. A. et al. The Matchmaker Exchange: a platform for rare disease gene discovery. *Hum. Mutat.* 36, 915–921 (2015).
49. Frost, J. H. & Massagli, M. P. Social uses of personal health information within PatientsLikeMe, an online patient community: what can happen when patients have access to one another's data. *J. Med. Internet Res.* 10, e15 (2008).
50. Wang, J. et al. MARRVEL: integration of human and model organism genetic resources to facilitate functional annotation of the human genome. *Am. J. Hum. Genet.* 100, 843–853 (2017).
51. Bimber, B. N., Yan, M. Y., Peterson, S. M. & Ferguson, B. mGAP: the macaque genotype and phenotype resource, a framework for accessing and interpreting macaque variant data, and identifying new models of human disease. *BMC Genomics* 20, 176 (2019).
52. Shilpa Nadimpalli Kobren 1, Dustin Baldrige 2, Matt Velinder 3, et al. Commonalities across computational workflows for uncovering explanatory variants in undiagnosed cases. *Genetics in Medicine*, **Volume 23, Issue 6**, June 2021, Pages 1075-1085 *Genetics in Medicine* (2021) 23:1075–1085; <https://doi.org/10.1038/s41436-020-01084-8>

53. Rehder, C., Bean, L.J.H., Bick, D. *et al.* Next-generation sequencing for constitutional variants in the clinical laboratory, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* **23**, 1399–1415 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41436-021-01139-4>
54. Santani, A. *et al.* Designing and implementing NGS tests for inherited disorders: a practical framework with step-by-step guidance for clinical laboratories. *J. Mol. Diagn.* **21**, 369–374 (2019)..
55. Bean, L. J. H. *et al.* Diagnostic gene sequencing panels: from design to report-a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet. Med.* **22**, 453–461 (2020).
56. Bick, D., Jones, M., Taylor, S. L., Taft, R. J. & Belmont, J. Case for genome sequencing in infants and children with rare, undiagnosed or genetic diseases. *J. Med. Genet.* **56**, 783–791 (2019).
57. Vaz-Drago, R., Custódio, N. & Carmo-Fonseca, M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum. Genet.* **136**, 1093–1111 (2017).
58. Lambert, S. A., Abraham, G. & Inouye, M. Towards clinical utility of polygenic risk scores. *Hum. Mol. Genet.* **28**, R133–R142 (2019).
59. Huang, A. Y. *et al.* MosaicHunter: accurate detection of postzygotic single-nucleotide mosaicism through next-generation sequencing of unpaired, trio, and paired samples. *Nucleic Acids Res.* **45**, e76 (2017).
60. Bush, L. W. *et al.* Professional responsibilities regarding the provision, publication, and dissemination of patient phenotypes in the context of clinical genetic and genomic testing: points to consider-a statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet. Med.* **20**, 169–171 (2018).
61. Trujillano, D. *et al.* Clinical exome sequencing: results from 2819 samples reflecting 1000 families. *Eur. J. Hum. Genet.* **25**, 176–182 (2017).
62. Posey, J. E. *et al.* Molecular diagnostic experience of whole-exome sequencing in adult patients. *Genet. Med.* **18**, 678–685 (2016).
63. Yang, Y. *et al.* Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA.* **312**, 1870–1879 (2014).
64. Yang, Y. *et al.* Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1502–1511 (2013).
65. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 2016;17:333–51.
66. Clark, M. M. *et al.* Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *NPJ Genom. Med.* **3**, 16 (2018).
67. Lionel, A. C. *et al.* Improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels suggests a role for whole-genome sequencing as a first-tier genetic test. *Genet. Med.* **20**, 435–443 (2018).
68. Stavropoulos, D. J. *et al.* Whole genome sequencing expands diagnostic utility and improves clinical management in pediatric medicine. *NPJ Genom. Med.* **1**, 15012 (2016).

69. Meienberg, J., Bruggmann, R., Oexle, K. & Matyas, G. Clinical sequencing: is WGS the better WES? *Hum. Genet.* **135**, 359–362 (2016).
70. Saudi Mendeliome Group. Comprehensive gene panels provide advantages over clinical exome sequencing for Mendelian diseases. *Genome Biol.* **16**, 134 (2015).
71. Belkadi, A. et al. Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 5473–5478 (2015).
72. Soden, S. E. et al. Effectiveness of exome and genome sequencing guided by acuity of illness for diagnosis of neurodevelopmental disorders. *Sci. Transl. Med.* **6**, 265ra168 (2014).
73. Rehm, H., Bale, S., Bayrak-Toydemir, P. et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med* **15**, 733–747 (2013).
<https://doi.org/10.1038/gim.2013.92>
74. ГОСТ Р 58505—2019/ ISO/TS 20428:2017. ИНФОРМАТИЗАЦИЯ ЗДОРОВЬЯ Элементы данных и их метаданные для описания структурированной информации о клиническом геномном секвенировании в электронных медицинских картах/
75. Weiss MM, Van der Zwaag B, Jongbloed JD, Vogel MJ, Bruggenwirth HT, Lekanne Deprez RH, et al. Best practice guidelines for the use of next-generation sequencing applications in genome diagnostics: a national collaborative study of Dutch genome diagnostic laboratories. *Hum Mutat.* 2013;34: 1313–21.
76. Haysheems, R.Z., Dimmock, D., Bick, D. et al. Clinical utility of genomic sequencing: a measurement toolkit. *npj Genom. Med.* **5**, 56 (2020).
<https://doi.org/10.1038/s41525-020-00164-7>
77. Catherine Rehder, Lora J.H. Bean, David Bick, Elizabeth Chao, Wendy Chung, Soma Das, Julianne O’Daniel, Heidi Rehm, Vandana Shashi, Lisa M. Vincent, Next-generation sequencing for constitutional variants in the clinical laboratory, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), *Genetics in Medicine*, Volume 23, Issue 8, 2021, Pages 1399-1415, ISSN 1098-3600, <https://doi.org/10.1038/s41436-021-01139-4>.
78. McCombie, W. R., McPherson, J. D. & Mardis, E. R. Next-generation sequencing technologies. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **9**, a036798 (2019).
79. Glenn, T. C. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol. Ecol. Resour.* **11**, 759–769 (2011).
80. WHO reference number: WHO/2019-nCoV/genomic_sequencing/2021.1/ SARS-CoV-2 genomic sequencing for public health goals: Interim guidance 8 January 2021// Annex I: Key questions to consider before initiating a sequencing programme // Annex II: Checklist for setting up a SARS-CoV-2 sequencing programme // Annex III: Commonly used platforms for SARS-CoV-2 sequencing analysis and their characteristics
81. ACMG Board of Directors. Points to consider in the clinical application of genomic sequencing. *Genet Med* **14**, 759–761 (2012).
<https://doi.org/10.1038/gim.2012.74>

82. Vassy JL, Korf BR, Green RC. How to know when physicians are ready for genomic medicine. *Sci Trans Med*. 2015;7(287):287fs19–287fs19.
83. Monaghan, K. G. et al. ACMG policy statement. Risk categorization for oversight of laboratory-developed tests for inherited conditions. *Genet. Med*. 15, 314–315 (2013).
84. Stephen E. Lincoln, Rebecca Truty. et al. A Rigorous Interlaboratory Examination of the Need to Confirm Next-Generation Sequencing–Detected Variants with an Orthogonal Method in Clinical Genetic Testing. *The Journal of Molecular Diagnostics*, Volume 21, Issue 2, 2019, Pages 318-329, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525157818302915>
85. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J. 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;17:405–24.
86. Boycott K, Hartley T, Adam S, et al The clinical application of genome-wide sequencing for monogenic diseases in Canada: Position Statement of the Canadian College of Medical Geneticists. *J Med Genet* 2015;52:431–7.
87. Weiss MM, Van der Zwaag B, Jongbloed J, et al Best practice guidelines for the use of next-generation sequencing applications in genome diagnostics: A national collaborative study of Dutch genome diagnostic laboratories. *Hum Mutat* 2013;34:1313–21.
88. Christenhusz GM, Devriendt K, Dierickx K. Secondary variants--in defense of a more fitting term in the incidental findings debate. *Eur J Hum Genet* 2013;21:1331–4.
89. Tan N, Amendola LM, O’Daniel JM, et al Is “incidental finding” the best term?: a study of patients’ preferences. *Genet Med* 2017;19:176–81.
90. van El CG, Cornel MC, Borry P, et al Whole-genome sequencing in health care: Recommendations of the European Society of Human Genetics. *Eur J Hum Genet* 2013;21:S1–S5.
91. Kalia SS, Adelman K, Bale SJ, et al Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SFv2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* 2016;19:249–55.
92. Wilson J, Jungner G: Principles and practice of screening for disease. Geneva: World Health Organization, 1968.
93. Hume S, et al. CCMG practice guideline: laboratory guidelines for next-generation sequencing. *J Med Genet* 2019;56:792–800. doi:10.1136/jmedgenet-2019-106152.
94. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-T oydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, Friez MJ, Funke BH, Hegde MR, Lyon E, Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med* 2013;15:733–47.

95. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, Temple-S molkin RL, Voelkerding KV, Nikiforova MN. Guidelines for validation of next-generation sequencing-based oncology panels: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017;19:341–65.
96. Aziz N, Zhao Q, Bry L, Driscoll DK, Funke B, Gibson JS, Grody WW, Hegde MR, Hoeltge GA, Leonard DGB, Merker JD, Nagarajan R, Palicki LA, Robetorye RS, Schrijver I, Weck KE, Voelkerding KV. College of American Pathologists' laboratory standards for next-generation sequencing clinical tests. *Arch Pathol Lab Med* 2015;139:481–93.
97. Matthijs G, Souche E, Alders M, Corveleyn A, Eck S, Feenstra I, Race V, Sistermans E, Sturm M, Weiss M, Yntema H, Bakker E, Scheffer H, Bauer P, EuroGentest, European Society of Human Genetics. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet* 2016;24:2–5.
98. Roy S, Coldren C, Karunamurthy A, Kip NS, Klee EW, Lincoln SE, Leon A, Pullambhatla M, Temple-S molkin RL, Voelkerding KV, Wang C, Carter AB. Standards and guidelines for validating next-generation sequencing bioinformatics pipelines: a joint recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2018;20:4–27.
99. Pengelly RJ, Gibson J, Andreoletti G, Collins A, Mattocks CJ, Ennis S. A SNP profiling panel for sample tracking in whole-exome sequencing studies. *Genome Med* 2013;5.
100. Deveson IW, Chen WY, Wong T, Hardwick SA, Andersen SB, Nielsen LK, Mattick JS, Mercer TR. Representing genetic variation with synthetic DNA standards. *Nat Methods* 2016;13:784–91.
101. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 2016;17:333–51.
102. Lincoln SE, Truty R, Lin C-F, Zook JM, Paul J, Ramey VH, Salit M, Rehm HL, Nussbaum RL, Lebo MS. A rigorous interlaboratory examination of the need to confirm next-generation sequencing-detected variants with an orthogonal method in clinical genetic testing. *J Mol Diagn* 2019;21:318–29.
103. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL, ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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;17:405–23.
104. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, Tsimberidou AM, Vnencak-Jones CL, Wolff DJ, Younes A, Nikiforova MN. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017;19:4–23.

105. Sukhai MA, Craddock KJ, Thomas M, Hansen AR, Zhang T, Siu L, Bedard P, Stockley TL, Kamel-Reid S. A classification system for clinical relevance of somatic variants identified in molecular profiling of cancer. *Genet Med* 2016;18:128–36.
106. Kearney HM, South ST, Wolff DJ, Lamb A, Hamosh A, Rao KW, Working Group of the American College of Medical Genetics. American College of Medical Genetics recommendations for the design and performance expectations for clinical genomic copy number microarrays intended for use in the postnatal setting for detection of constitutional abnormalities. *Genet Med* 2011;13:676–9.
107. Cottrell CE, Al-Kateb H, Bredemeyer AJ, Duncavage EJ, Spencer DH, Abel HJ, Lockwood CM, Hagemann IS, O’Guin SM, Burcea LC, Sawyer CS, Oswald DM, Stratman JL, Sher DA, Johnson MR, Brown JT, Cliften PF, George B, McIntosh LD, Shrivastava S, Nguyen TT, Payton JE, Watson MA, Crosby SD, Head RD, Mitra RD, Nagarajan R, Kulkarni S, Seibert K, Virgin HW, Milbrandt J, Pfeifer JD. Validation of a next-generation sequencing assay for clinical molecular oncology. *J Mol Diagn* 2014;16:89–105.
108. He KY, Ge D, He MM. Big data analytics for genomic medicine. *Int J Mol Sci* 2017;18.
109. Cock PJA, Fields CJ, Goto N, Heuer ML, Rice PM. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Res* 2010;38:1767–71.
110. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009;25:2078–9.
111. Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, Handsaker RE, et al. 1000 Genomes Project Analysis Group. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* 2011;27:2156–8.
112. Data Sciences Platform @ Broad Institute. GATK | Doc #11014 | SAM / BAM / CRAM—mapped sequence data formats. Available: <https://software.broadinstitute.org/gatk/documentation/article?id=11014> [Accessed 13 Jan 2019].
113. Office of the Privacy Commissioner of Canada. Cloud computing and privacy- Office of the Privacy Commissioner of Canada, 2011. Available: https://www.priv.gc.ca/en/privacy-topics/technology-and-privacy/online-privacy/cloud-computing/02_05_d_51_cc/ [Accessed 13 Oct 2017].
114. Zook JM, Catoe D, McDaniel J, Vang L, et al. Extensive sequencing of seven human genomes to characterize benchmark reference materials. *Sci Data* 2016;3.
115. Sims DJ, Harrington RD, Polley EC, Forbes TD, Mehaffey MG, McGregor PM, Camalier CE, Harper KN, Conley BA, Das B, Conley BA, Doroshov JH, Williams PM, Lih C-J. Plasmid-based materials as multiplex quality controls and calibrators for clinical next-generation sequencing assays. *J Mol Diagn* 2016;18:336–49.

116. M attocks CJ, Morris MA, Matthijs G, et al., EuroGentest Validation Group. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *Eur J Hum Genet* 2010;18:1276–88.
117. M eynert AM, Ansari M, FitzPatrick DR, Taylor MS. Variant detection sensitivity and biases in whole genome and exome sequencing. *BMC Bioinformatics* 2014;15.
118. Deignan JL, Chung WK, Kearney HM, et al., ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Points to consider in the reevaluation and reanalysis of genomic test results: a statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* 2019;21:1267–70.
119. Boycott K, Hartley T, Adam S, Bernier F, Chong K, et al., Canadian College of Medical Geneticists. The clinical application of genome-wide sequencing for monogenic diseases in Canada: position statement of the Canadian College of Medical Geneticists. *J Med Genet* 2015;52:431–7.
120. Robson ME, Bradbury AR, Arun B, et al.. American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic and genomic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol* 2015;33:3660–7.
121. Matthijs, G., Souche, E., Alders, M. *et al.* Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet* **24**, 2–5 (2016).
<https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.226>
122. Souche, E., Beltran, S., Brosens, E. *et al.* Recommendations for whole genome sequencing in diagnostics for rare diseases. *Eur J Hum Genet* **30**, 1017–1021 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41431-022-01113-x>
123. Weiss MM, Van der Zwaag B, Jongbloed JD, Voge l MJ, Bruggenw irth HT, Lekanne Deprez RH, et al. Best practice guidelines for the use of next-generation sequenci ng applications in g eno me diagnostics: a national collabo rative study of Dutch g eno me diagno stic laboratories. *Hum Mutat.* 2013;34: 1313– 21.
124. Deans ZC, Ahn JW, Carr eira IM, Dequeker E, Henderson M, Lovrecic L, et al. Rec ommendations for repor ting results of diagnostic genomic testing . *Eur J Hum Ge net.* 2022. <https://doi.org/10.1038/s41431-022-01091-0>. Epub ahead of print.
125. Claustres M, Kozich V, Dequeker E, Fowler B, Hehir-Kwa JY, Miller K, et al. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic). *Eur J Hum Genet.* 2014;22:160–70.
126. Winkler, Eva C., Wiemann, Stefan. Findings made in gene panel to whole genome sequencing: data, knowledge, ethics – and consequences? Crossref DOI link: <https://doi.org/10.1080/14737159.2016.1212662>

Пример отчета по результатам NGS-тестирования герминальной ДНК.



Московский
клинический
научный центр

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ
«МОСКОВСКИЙ КЛИНИЧЕСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ИМЕНИ А.С. ЛОГИНОВА
ДЕПАРТАМЕНТА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ» (ГБУЗ МКНЦ ИМЕНИ А.С. ЛОГИНОВА ДЗМ)
111123, г. Москва, ш. Энтузиастов, д. 86, стр. 6. тел.: 8 495 304 30 39, 8 495 304 30 40, info@mknc.ru, сайт: www.mknc.ru

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ИССЛЕДОВАНИЯ ПАНЕЛИ
ГЕНОВ «Наследственный рак»**

Пациент: Иванова Елена Ивановна

Пол: Женский

Дата рождения: 10.09.1979

Вид материала: кровь (венозная)

Номер образца: 123456

Дата поступления образца в лабораторию: 02.07.23

Данные секвенирования могут быть предоставлены по запросу лечащего врача.

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



Московский
клинический
научный центр

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ
«МОСКОВСКИЙ КЛИНИЧЕСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ИМЕНИ А.С. ЛОГИНОВА
ДЕПАРТАМЕНТА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ» (ГБУЗ МКНЦ ИМЕНИ А.С. ЛОГИНОВА ДЗМ)

111123, г. Москва, ш. Энтузиастов, д. 86, стр. 6. тел.: 8 495 304 30 39, 8 495 304 30 40, info@mknc.ru, сайт: www.mknc.ru

ВЫЯВЛЕННЫЕ ВАРИАНТЫ

Клиническая значимость	Вариант (hg38)	Зиготность	Ген	HGVS names	Глубина прочтения
Варианты нуклеотидной последовательности, являющиеся вероятной причиной заболевания					
Патогенный/ Pathogenic	chr17:43106487A>C	Нет	<i>BRCA1</i>	c.181T>G p.Cys61Gly rs28897672 NM_007294.4	47
Вероятно патогенный/ Likely pathogenic	Не выявлено				
Неопределенное значение/ Uncertain significance	Не выявлено				
Варианты нуклеотидной последовательности, ассоциированные с другими значимыми моногенными заболеваниями					
Патогенный/ Pathogenic	Не выявлено				
Вероятно патогенный/ Likely pathogenic	Не выявлено				
Неопределенное значение/ Uncertain significance	Не выявлено				

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

В 4 экзоне гена *BRCA1* (NM_007294.4) выявлен вариант нуклеотидной последовательности chr17:43106487A>C (c.181T>G, p.Cys61Gly, rs28897672) в гетерозиготной форме.

Частота минорного аллеля: 0.000032 (GnomAD_exome).

Функциональное значение: приводит к замене цистеина на глицин в 61 положении.

Клиническое значение: данный вариант описан в базе данных VarSome как патогенный (критерии ACMG: PP5, PM1, PM5, PM2, PP3), в базе данных ClinVar как патогенный.

Клиническая картина: патогенные варианты в гене *BRCA1* в гетерозиготной форме являются причиной развития синдрома семейного рака молочной железы и яичников (Breast-ovarian cancer, familial, 1; OMIM#604370), фактором риска развития рака поджелудочной железы (Pancreatic cancer, susceptibility to, 4; OMIM#614320), а в гомозиготной (два одинаковых патогенных варианта в гене) или компаунд гетерозиготной (два различающихся патогенных варианта в разных аллелях гена) форме являются причиной анемии Фанкони, группа комплементации S – клинически и генетически гетерогенного заболевания с аутосомно-рецессивным типом наследования, характеризующегося аномалиями развития внутренних органов, ранней недостаточностью костного мозга и предрасположенностью к опухолям (Fanconi anemia, complementation group S; OMIM#617883).

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



Московский
клинический
научный центр

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ
«МОСКОВСКИЙ КЛИНИЧЕСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ИМЕНИ А.С. ЛОГИНОВА
ДЕПАРТАМЕНТА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ» (ГБУЗ МКНЦ ИМЕНИ А.С. ЛОГИНОВА ДЗМ)
111123, г. Москва, ш. Энтузиастов, д. 86, стр. 6. тел.: 8 495 304 30 39, 8 495 304 30 40, info@mknc.ru, сайт: www.mknc.ru

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Консультация врача-генетика для клинической интерпретации результатов молекулярно-генетического тестирования.
2. Подтверждение выявленного варианта с помощью секвенирования по Сенгеру.
3. В связи с быстрым обновлением информации о патогенности вариантов и появлением новых данных рекомендован повторный анализ данных секвенирования 1 раз в 2 года. Повторный анализ данных секвенирования также рекомендован при изменении фенотипа пациента, появлении новых симптомов, связанных с прогрессированием заболевания, либо при появлении новых данных лабораторного и инструментального обследования, изменяющих направления дифференциальной диагностики.

14.07.2023

Ответственный исполнитель

Врач-генетик

Заведующий лабораторией



ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ
 «МОСКОВСКИЙ КЛИНИЧЕСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ИМЕНИ А.С. ЛОГИНОВА
 ДЕПАРТАМЕНТА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ» (ГБУЗ МКНЦ ИМЕНИ А.С. ЛОГИНОВА ДЗМ)
 111123, г. Москва, ш. Энтузиастов, д. 86, стр. 6. тел.: 8 495 304 30 39, 8 495 304 30 40, info@mknc.ru, сайт: www.mknc.ru

ОПИСАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ ДНК пациента проведен на секвенаторе нового поколения *MiSeq Illumina* методом парно-концевого чтения. Для пробоподготовки была использована методика гибридизационного селективного обогащения фрагментами ДНК, относящимися к кодирующим областям 60 генов с известным клиническим значением, с использованием кастомной панели зондов NimbleGen (Roche), согласно протоколу производителя. Список исследованных генов: *ATM, BRCA1, PALB2, RAD50, MRE11A, NBN, RAD51D, RAD51C, RAD54B, BLM, XRCC2, TP53, BRCA2, BARD1, ATR, CHEK2, FANCM, RECQL4, FANCF, FANCI, FANCC, FANCG, FANCL, MLH1, CDKN2A, MSH2, MSH6, PTEN, CHEK1, BRIP1, RBBP8, SLX4, FAM175a, RAD52, RINT1, CDK12, CDH1, STK11, PMS2, MUTYH, PPM1D, APC, MCPH1, NF1, EPCAM, BUB1, FANCD2, TP53BP1, MRE11, POLD1, POLE, SMAD4, MSH3, CTNNA1, ERCC2, FANCB, ERCC1, TSC1, TSC2, XPC*. Для названия выявленных вариантов использовалась номенклатура <http://varnomen.hgvs.org/>.

Обработка данных секвенирования проведена с использованием автоматизированного алгоритма, включающего выравнивание прочтений на референсную последовательность генома человека (hg38), 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, MetaSVM), а также методов расчета эволюционной консервативности позиций (PhyloP, PhastCons).

Для оценки популяционных частот выявленных вариантов использованы выборки проектов Genome Aggregation Database (GnomAD), «1000 Genomes», NHLBI Exome Sequencing Project (ESP6500) и Exome Aggregation Consortium (ExAC). Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов использованы база данных OMIM, ClinVar и литературные данные. В заключение включены только варианты, имеющие возможное отношение к клиническим проявлениям у пациента. Варианты, классифицированные по различным критериям как нейтральные, в заключение не включены.

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. Полученные методом NGS результаты рекомендовано валидировать секвенированием по Сэнгеру.



Московский
клинический
научный центр

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ
«МОСКОВСКИЙ КЛИНИЧЕСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ИМЕНИ А.С. ЛОГИНОВА
ДЕПАРТАМЕНТА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ» (ГБУЗ МКНЦ ИМЕНИ А.С. ЛОГИНОВА ДЗМ)
111123, г. Москва, ш. Энтузиастов, д. 86, стр. 6. тел.: 8 495 304 30 39, 8 495 304 30 40, info@mknc.ru, сайт: www.mknc.ru

СВЕДЕНИЯ О КАЧЕСТВЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего прочтений	806623
Длина прочтений	2x150 п.о
Прочитано нуклеотидов	117955567
Среднее покрытие	204
Всего выявлено вариантов	475
Вариантов после фильтрации по базовым критериям патогенности	1

ССЫЛКИ НА ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ БАЗЫ ДАННЫХ И ЛИТЕРАТУРУ

- Номенклатура генов и генетических вариантов:**
<http://varomen.hgvs.org/>
- Базы данных транскриптов:**
Reference Sequence (RefSeq) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>
Ensembl <https://www.ensembl.org/index.html>
- База данных известных генетических вариантов:**
Database of Short Genetic Variations (dbSNP) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>
- База данных по наследственным заболеваниям человека:**
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) <http://www.omim.org/>
- Базы данных по частотам известных генетических вариантов:**
1000 Genomes <http://www.internationalgenome.org/>
NHLBI Exome Sequencing Project (ESP6500) <https://esp.gs.washington.edu/drupal/>
Exome Aggregation Consortium (ExAC) <http://exac.broadinstitute.org/>
- Программы предсказания патогенности замен:**
SIFT <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>
PolyPhen2 <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
MutationTaster <http://www.mutationtaster.org/>
MetaSVM <https://omictools.com/meta-svm-tool>
- Программа для аннотирования генетических вариантов:**
webANNOVAR <http://wannovar.wglab.org/>
- Базы данных клинических значений некоторых генетических вариантов:**
ClinVar <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>
Leiden Open Variation Database (LOVD) <http://www.lovd.nl/3.0/search>
The International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (InSiGHT) Variant Classifications <https://www.insight-database.org/classifications/>
Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC) <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>
VarSome <https://varsome.com/varsome-editions/varsome/>
BRCA Exchange <https://brcaexchange.org/>
- Поиск публикаций в реферируемых научных журналах:**
PubMed <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 2**Пример отчета****Отчет
о мониторинге штаммов вируса SARS-CoV-2 № М-XXX
от XX.06.2023**

Период наблюдения: с XX.06.2023 по XX.06.2023 (24 дня).

Количество секвенированных образцов: 336

Из них количество успешно секвенированных образцов: 318

амбулаторные – 289 (90,88%)

стационар – 29 (9,12%)

Вывод: Выявлен штамм Омикрон у 318 пациентов.

- всего – 318 (100% от 318 успешно секвенированных)
- амбулаторные – 289 (100,00% от 289 успешно секвенированных амбулаторных)
- стационар – 29 (100% от 29 успешно секвенированных стационарных)

XX мая 2023 произошло обновление базы данных PANGO.

Впервые обнаружены следующие разновидности вируса, добавленные в базу данных PANGO XX мая 2023 года: FL.8, EG.1.3, EG.5.1, ХВВ.1.5.46, ХВВ.1.24.1.

Вариант ХВВ.1.5 обнаружен в 2 образцах (на 20 % меньше по сравнению с предыдущим запуском).

Также обнаружены дочерние группы: ХВВ.1.5.24 – в 13 образцах, ХВВ.1.5.13 - в 1 образце, ХВВ.1.5.67 – в 1 образце, ХВВ.1.5.4 - в 1 образце.

Вариант ХВВ (и дочерние линии) обнаружен в 269 образцах, что составляет 84,6% от всех успешно секвенированных проб.

Наибольший процент приходится на долю ХВВ.1.9.1 - 43,71 % от всех вариантов ХВВ.

Вариант ВА.2.75 (ВА.2.75.2, ВА.2.75.3) не обнаружен.

Вариант ВА.2.3.20 не обнаружен.

Вариант ВА.5 (ВА.5.2.1) не обнаружен.

Вариант ВQ.1 не обнаружен.

Вариант СН. 1.1.11 не обнаружен.

Вариант ХВВ.1.16 обнаружен в 62 образцах.

Вариант ХВВ.1.16.1 обнаружен в 5 образцах.

Вариант ХВВ.2.3 выявлен в 20 образцах

Штаммы имеющие мутации характерные для штамма Дельта и Омикрон (Дельта/омикрон) – не обнаружены.

По сравнению с предыдущим запуском (отчёт № М-XXX) динамика генетических линий

следующая:

- Генетическая линия ХВВ и её дочерние группы не изменились в процентном соотношении, было 84,5% стало 84,6%.
- Генетическая линия ХВВ.1.16 увеличилась с 11,28 % до 19,5%.
- Генетическая линия ХВВ.1.16.1 статистически не изменилась было 1,52 % стало 1,57 %.

Продолжаем наблюдать за динамикой.

Вывод: в настоящий момент на основании наших исследований доминирующее положение занимает генетическая линия ХВВ (и её разновидности) - 84,6%.

Статистика штаммов и подштаммов (разновидностей)

Общая статистика:

Штамм	Название	Количество	Доля
EG.1	британская разновидность Омикрон	6	1.89%
EG.1.4	швейцарская разновидность Омикрон	1	0.31%
EG.4	сингапурская разновидность Омикрон	4	1.26%
EG.5.1	гонконгская разновидность Омикрон	7	2.20%
FL.1	северокорейская разновидность Омикрон	2	0.63%
FL.10	шведская разновидность Омикрон	1	0.31%
FL.2	китайская разновидность Омикрон	6	1.89%
FL.3	испанская разновидность Омикрон	1	0.31%
FL.4	китайская разновидность Омикрон	2	0.63%
FL.5	германская разновидность Омикрон	2	0.63%
FU.1	китайская разновидность Омикрон	7	2.20%
FW.1	чешская разновидность Омикрон	1	0.31%
FY.1	малазийская разновидность Омикрон	1	0.31%
FY.3	китайская разновидность Омикрон	7	2.20%
GE.1	новозеландская разновидность Омикрон	1	0.31%

ХВВ.1	бангладешская разновидность Омикрон	3	0.94%
ХВВ.1.14	рекомбинантная разновидность Омикрон (между VJ.1 и VM.1.1.1)	1	0.31%
ХВВ.1.16	индийская разновидность Омикрон	62	19.50%
ХВВ.1.16.1	индийская разновидность Омикрон	5	1.57%
ХВВ.1.16.2	индийская разновидность Омикрон	2	0.63%
ХВВ.1.22	американская разновидность Омикрон	1	0.31%
ХВВ.1.22.1	французская разновидность Омикрон	2	0.63%
ХВВ.1.28.1	российская разновидность Омикрон	5	1.57%
ХВВ.1.37.1	рекомбинантная разновидность Омикрон (между VJ.1 и VM.1.1.1)	1	0.31%
ХВВ.1.5	американская разновидность Омикрон	2	0.63%
ХВВ.1.5.13	американская разновидность Омикрон	1	0.31%
ХВВ.1.5.24	германская разновидность Омикрон	13	4.09%
ХВВ.1.5.4	американская разновидность Омикрон	1	0.31%
ХВВ.1.5.67	украинская разновидность Омикрон	1	0.31%
ХВВ.1.9	индонезийская разновидность Омикрон	2	0.63%
ХВВ.1.9.1	сингапурская разновидность Омикрон	139	43.71%
ХВВ.1.9.2	рекомбинантная разновидность Омикрон (между VJ.1 и VM.1.1.1)	4	1.26%
ХВВ.1.9.3	российская разновидность Омикрон	1	0.31%
ХВВ.2.3	рекомбинантная разновидность Омикрон (между VJ.1 и VM.1.1.1)	20	6.29%
ХВВ.2.3.11	индийская разновидность Омикрон	1	0.31%
ХВВ.2.3.3	индийская разновидность Омикрон	1	0.31%
ХВВ.2.9	рекомбинантная разновидность Омикрон (между VJ.1 и VM.1.1.1)	1	0.31%

Амбулаторные пациенты:

Штамм/подштамм	Название	Количество	Доля
EG.1	британская разновидность Омикрон	6	2.08%
EG.1.4	швейцарская разновидность Омикрон	1	0.35%
EG.4	сингапурская разновидность Омикрон	3	1.04%
EG.5.1	гонконгская разновидность Омикрон	7	2.42%
FL.1	северокорейская разновидность Омикрон	2	0.69%
FL.10	шведская разновидность Омикрон	1	0.35%
FL.2	китайская разновидность Омикрон	6	2.08%
FL.3	испанская разновидность Омикрон	1	0.35%
FL.4	китайская разновидность Омикрон	2	0.69%
FL.5	германская разновидность Омикрон	2	0.69%
FU.1	китайская разновидность Омикрон	6	2.08%
FW.1	чешская разновидность Омикрон	1	0.35%
FY.1	малазийская разновидность Омикрон	1	0.35%
FY.3	китайская разновидность Омикрон	7	2.42%
GE.1	новозеландская разновидность Омикрон	1	0.35%
XBB.1	бангладешская разновидность Омикрон	3	1.04%
XBB.1.16	индийская разновидность Омикрон	59	20.42%
XBB.1.16.1	индийская разновидность Омикрон	5	1.73%
XBB.1.16.2	индийская разновидность Омикрон	2	0.69%
XBB.1.22	американская разновидность Омикрон	1	0.35%
XBB.1.22.1	французская разновидность Омикрон	2	0.69%
XBB.1.28.1	российская разновидность Омикрон	4	1.38%
XBB.1.5	американская разновидность Омикрон	1	0.35%
XBB.1.5.13	американская разновидность Омикрон	1	0.35%
XBB.1.5.24	германская разновидность Омикрон	11	3.81%
XBB.1.5.4	американская разновидность Омикрон	1	0.35%
XBB.1.5.67	украинская разновидность Омикрон	1	0.35%
XBB.1.9	индонезийская разновидность Омикрон	1	0.35%
XBB.1.9.1	сингапурская разновидность Омикрон	124	42.91%
XBB.1.9.2	рекомбинантная разновидность Омикрон (между VJ.1 и VM.1.1.1)	4	1.38%
XBB.1.9.3	российская разновидность Омикрон	1	0.35%

XBB.2.3	рекомбинантная разновидность Омикрон (между VJ.1 и VM.1.1.1)	19	6.57%
XBB.2.3.3	индийская разновидность Омикрон	1	0.35%
XBB.2.9	рекомбинантная разновидность Омикрон (между VJ.1 и VM.1.1.1)	1	0.35%
итого		289	

Пациенты стационара:

Штамм	Название	Кол-во	Доля
EG.4	сингапурская разновидность Омикрон	1	3.45%
FU.1	китайская разновидность Омикрон	1	3.45%
XBB.1.14	рекомбинантная разновидность Омикрон (между VJ.1 и VM.1.1.1)	1	3.45%
XBB.1.16	индийская разновидность Омикрон	3	10.34%
XBB.1.28.1	российская разновидность Омикрон	1	3.45%
XBB.1.37.1	рекомбинантная разновидность Омикрон (между VJ.1 и VM.1.1.1)	1	3.45%
XBB.1.5	американская разновидность Омикрон	1	3.45%
XBB.1.5.24	германская разновидность Омикрон	2	6.90%
XBB.1.9	индонезийская разновидность Омикрон	1	3.45%
XBB.1.9.1	сингапурская разновидность Омикрон	15	51.72%
XBB.2.3	рекомбинантная разновидность Омикрон (между VJ.1 и VM.1.1.1)	1	3.45%
XBB.2.3.11	индийская разновидность Омикрон	1	3.45%
итого		29	

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Пример отчета

Секвенирование ГРИППА

Период проведения исследования: XX.05.2023 - XX.06.2023 (20 дней)

Количество секвенированных образцов: 23 клинических образца с положительными результатами ПЦР-анализа на вирусы гриппа А и В.

Успешно отсеквенировано – **20 образцов** (87%), из них:

- Амбулаторные - 3 (15%)

- Стационарные - 17 (85%)

В 3-х образцах **концентрация вируса не была достаточной** для проведения субтипирования.

Статистика успешно секвенированных образцов

Общая статистика:

Штамм	Количество	Доля
Influenza A virus (A/Sao Paulo/H1AE001/202) H3N2	17	85%
Influenza B virus (B/Texas/43/2019) B	3	15%
Итого	20	

Таким образом по результатам секвенирования в **17 успешных** образцах был обнаружен грипп А H3N2, и в **3 образцах** гриппа В.

Амбулаторные пациенты:

Штамм	Количество	Доля
Influenza A virus (A/Sao Paulo/H1AE001/202) H3N2	2	66,7%
Influenza B virus (B/Texas/43/2019) B	1	33,3%
Итого	3	

Стационарные пациенты:

Штамм	Количество	Доля
Influenza A virus (A/Sao Paulo/H1AE001/202) H3N2	15	88,2 %
Influenza B virus (B/Texas/43/2019) B	2	11,8%
Итого	17	

ВЫВОД: согласно нашим наблюдениям, по результатам секвенирования, отмечаем превалирование заболеваемостью гриппом А над гриппом В и прослеживание закономерности: с появлением гриппа А увеличивается доля стационарных пациентов.

В исследованных образцах мутации в генах HA и NA не обнаружены.