

Case Study

Analisi genomica completa dei dati di sequenziamento complementari ottenuti con microarray e NGS per la diagnostica clinica

In breve

In questo case study si illustra:

- come il Greenwood Genetic Center (GGC) combina i risultati del sequenziamento mediante NGS e array nelle analisi genetiche di routine per migliorare la resa diagnostica;
- come la piattaforma Alissa Interpret permette di integrare le varianti del numero di copie e le varianti molecolari;
- un esempio di come il GGC ha sfruttato questa funzione per risolvere un caso diagnostico di sindrome della cornea fragile.

Autori:

Alka Chaubey, PhD¹

Michael J. Friez, PhD¹

Monica J. Basehore, PhD¹

R. Curtis Rogers, MD¹

Steven Van Vooren, PhD²

1. Greenwood Genetic Center
106 Gregor Mendel Circle
Greenwood, SC 29646, USA

2. Agilent Technologies
Lexington, MA, USA

Introduzione

Di recente, il sequenziamento di nuova generazione (NGS) ha dimostrato la sua utilità diagnostica per un numero crescente di applicazioni cliniche. L'intento è quello di sostituire una miriade di strumenti di diagnostica molecolare primaria, come il sequenziamento secondo Sanger, la qPCR, la MLPA e l'aCNA (array-based copy number analysis), con un'unica metodologia. Tuttavia, l'estrazione delle variazioni del numero di copie (CNV) dai dati di NGS risulta complicata. In questo caso concreto, il Greenwood Genetic Center illustra la riuscita dell'applicazione di NGS e aCNA come metodi complementari per la diagnostica clinica. Questa dimostrazione è un esempio di come il modulo software di Alissa Interpret funziona da piattaforma integrata per l'analisi dei dati, consentendo l'analisi congiunta dei risultati ottenuti con i saggi CGH e NGS.

Caso

Un neonato maschio di 2 mesi è stato indirizzato al centro per quadro clinico di cheratogloblo, sclera blu e riflesso rosso anomalo negli occhi (Figura 1). L'anamnesi familiare per questi reperti clinici e per altri disturbi correlati era negativa. La diagnosi iniziale ha identificato nella sindrome della cornea fragile (autosomica recessiva) o nell'osteogenesi imperfetta (autosomica dominante) i possibili geni responsabili del fenotipo del paziente.



Figura 1. A sinistra è mostrato il fenotipo del probando, a destra una fotografia ravvicinata che evidenzia il cheratogloblo e la sclera blu.

Conclusioni in breve

Il laboratorio del Greenwood Genetic Center (GGC) ha determinato in modo rapido e accurato le alterazioni genomiche responsabili della malattia avvalendosi di Alissa Interpret di Agilent, il modulo automatizzato per analizzare e refertare le varianti disponibile nella piattaforma Alissa Clinical Informatics per NGS. Il GGC ha risolto il problema di estrarre le CNV dai dati di NGS in un'analisi che ha integrato i due flussi di lavoro delle metodiche aCNA e NGS e ha ottenuto un'efficienza operativa sistematica significativa.



Metodi e risultati

Inizialmente, il laboratorio di citogenetica del GGC ha eseguito l'analisi di aCNA usando la piattaforma Affymetrix Cytoscan HD. I dati del microarray sono stati analizzati tramite la piattaforma di Alissa Interpret. Delle nove regioni di CNV identificate, sei erano delezioni cromosomiche.

L'allineamento di queste regioni con i geni presenti nel catalogo OMIM ha identificato una perdita di numero di copie a livello di un segmento di 114,1 kb sul cromosoma 16. Questa delezione comprende tutto il locus ZNF469, noto per esercitare una funzione strutturale e regolatoria nell'assemblaggio delle fibre di collagene e associato alla sindrome della cornea fragile di tipo 1.

A questa osservazione è seguito il risequenziamento mirato basato su NGS dei 31 geni rappresentati nel Connective Tissue Panel (pannello del tessuto connettivo) del laboratorio di diagnostica del GGC. Per estrarre le varianti pertinenti alla malattia è stata usata una strategia semplice (**Figura 2**).

Le varianti benigne sono state rimosse tramite allineamento dei dati di NGS con i seguenti database pubblici, accessibili direttamente da Alissa Interpret:

- Exome Variant Server
- dbSNP
- 1000Genomes

e anche in base ai dati di riferimento per le varianti comuni di proprietà di GGC, come mostrato nella **Figura 3**.

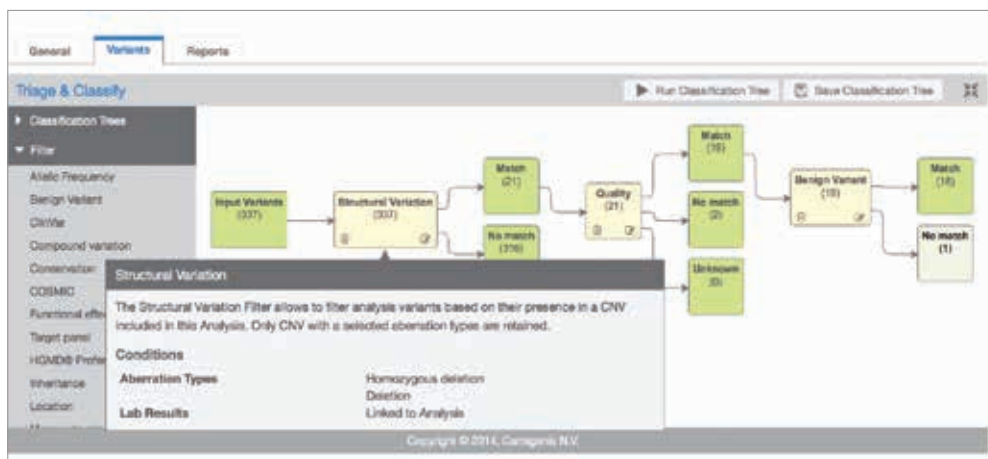


Figura 2. Strategia di filtrazione delle varianti applicata dal laboratorio del GGC ai dati di NGS basata sui risultati di aCNA.

Benign Variant	
The Benign Variant filter filters a list of variants based on their presence in a controlled set of benign variants or reference set. Select and configure the sets you want to include in the filtering. Combinations of multiple sets can be applied such that a variant goes to the MATCH output when the variant is found in all, any, or a minimal number of sets.	
Conditions	
Match Any of the following conditions:	
dbSNP	
dbSNP Allele frequency	0.01
dbSNP Allele count	200
dbSNP Validation Status	validated
dbSNP Suspicion Flag	not suspected false
1000 Genomes	
1000 Genomes Allele frequency	0.01
1000 Genomes Allele count	200
ESP6500	
ESP6500 Allele frequency	0.01
ESP6500 Allele count	200
Gleeson_Exome_reference_set	
Gleeson_Exome_reference_set Allele frequency	0.01
Gleeson_Exome_reference_set Allele count	200
ALL_Exome_reference_set	
ALL_Exome_reference_set Allele frequency	0.01
ALL_Exome_reference_set Allele count	200

Figura 3. Le varianti vengono filtrate in base a parametri di qualità dei dati come la profondità di lettura >20 (non mostrata). Le varianti benigne vengono poi escluse rimuovendo quelle che ricorrono in un database di conoscenze privato e nei database pubblici (EVS, dbSNP, 1000Genomes) con una frequenza allelica >1%. Il GGC ha incorporato anche gli esomi di sua proprietà come riferimento.

Riepilogo

In conclusione, nell'esempio sopra è illustrato un modo rapido ed efficiente per integrare l'analisi dei dati genomici con l'obiettivo di determinare accuratamente le alterazioni genomiche responsabili di una malattia mediante Alissa Interpret. Il laboratorio del Greenwood Genetic Center ha dimostrato come le funzioni specifiche di integrazione dei dati offerte dalla piattaforma Alissa Clinical Informatics permettano di automatizzare le procedure operative standard per potenziare significativamente l'efficienza del flusso di lavoro e della pratica di routine del laboratorio.

Risposte affidabili. Insieme.

Uso previsto

Il software Alissa Interpret è inteso per la memorizzazione, visualizzazione e annotazione di varianti usando fonti di dati pubbliche, commerciali e appartenenti a clienti. Consente agli utenti finali di configurare procedure per attuare o automatizzare la valutazione e la classificazione delle varianti genetiche. Fornisce funzioni per la registrazione delle valutazioni di varianti e la stesura di report di analisi delle varianti. Le capacità di integrazione consentono lo scambio automatizzato delle informazioni su varianti e report con sistemi informatici esterni.

Il software Alissa Interpret è progettato per l'uso da parte di professionisti di laboratorio qualificati, genetisti clinici e patologi molecolari come piattaforma software per il supporto decisionale nell'analisi e l'interpretazione di varianti genetiche identificate in campioni umani nel quadro delle informazioni cliniche registrate per un determinato campione.

MAGGIORI INFORMAZIONI:

www.agilent.com/lifesciences/alissa

E-mail: cad.info@agilent.com

PR7000-0689

© Agilent Technologies, Inc. 2017 Stampato negli Stati Uniti.

Data della pubblicazione originale: 1 novembre 2015

Data della revisione: 30 giugno 2017

5991-8528ITE

Alissa Interpret è un dispositivo medico di Classe I negli USA, CE-IVD in Europa, e dispositivo IVD di Classe I in Canada e Australia.



Agilent Technologies