

Estudo de caso:

## Análise genômica integral de dados complementares de microarray e de sequenciamento de nova geração (NGS para diagnósticos clínicos)



### Visão geral

**Neste estudo de caso, você aprenderá:**

- Como o Greenwood Genetic Center (GGC) reúne os resultados de NGS e Arrays em testes genéticos de rotina para melhorar o rendimento diagnóstico.
- Como a plataforma Alissa Interpret permite uma integração perfeita de variações no número de cópias e moleculares.
- Uma ilustração sobre como o GGC usou esse recurso para abordar um caso de diagnóstico de córnea frágil.

### Autores:

Alka Chaubey, PhD<sup>1</sup>

Michael J. Friez, PhD<sup>1</sup>

Monica J. Basehore, PhD<sup>1</sup>

R. Curtis Rogers, MD<sup>1</sup>

Steven Van Vooren, PhD<sup>2</sup>

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

2. Agilent Technologies  
Lexington, MA

### Introdução

Recentemente, o sequenciamento de nova geração (NGS) provou sua utilidade diagnóstica para uma gama crescente de aplicações clínicas. A intenção é substituir uma infinidade de ferramentas primárias de diagnóstico molecular, como sequenciamento Sanger, qPCR, MLPA e análise do número de cópias baseada em microarranjos (aCNA), por uma metodologia única. No entanto, a extração de variações do número de cópias (CNVs) a partir de dados de NGS tem sido desafiadora. Neste estudo de caso, o Greenwood Genetic Center ilustra a aplicação bem-sucedida de NGS e aCNA como métodos complementares de diagnóstico clínico. Esta ilustração é um exemplo de como o módulo de software Alissa Interpret serve como uma plataforma integrada de análise de dados, permitindo uma análise conjunta de resultados dos ensaios de hibridização genômica comparativa (CGH) e NGS.

### Caso

Um bebê de 2 meses de idade, do sexo masculino, foi encaminhado com ceratoglobo, esclerótica azul e reflexo vermelho anormal nos olhos (Figura 1). O histórico familiar desses achados clínicos e de outros distúrbios relacionados foi negativo. O diagnóstico inicial apontou para a síndrome da córnea frágil (autossômica recessiva) ou osteogênese imperfeita (autossômica dominante) usadas para identificar os genes candidatos responsáveis pelo fenótipo do paciente.



**Figura 1.** A figura retrata o habitus do probando, bem como o detalhe do ceratoglobo e da esclera azul.

### Resumo da conclusão

O laboratório do Greenwood Genetic Center (GGC) obteve uma determinação rápida e precisa das alterações genômicas causadoras de doenças usando o Alissa Interpret da Agilent, o módulo de automação de avaliação e geração de relatório de variantes na plataforma Alissa Interpret de informática clínica para NGS. A GGC superou o desafio de extrair CNVs, a partir de dados de NGS, em uma análise integrada em ambos os fluxos de trabalho, para aCNA e NGS, obtendo um ganho de eficiência significativa na prática de rotina.



## Métodos e resultados

Inicialmente, o Laboratório de Citogenética do Greenwood Genetic Center (GGC) realizou a aCNA usando a plataforma Affymetrix Cytoscan HD. Os dados de microarray foram analisados usando a plataforma Intepret do Alissa. Das nove regiões de CNV identificadas, seis eram deleções cromossômicas.

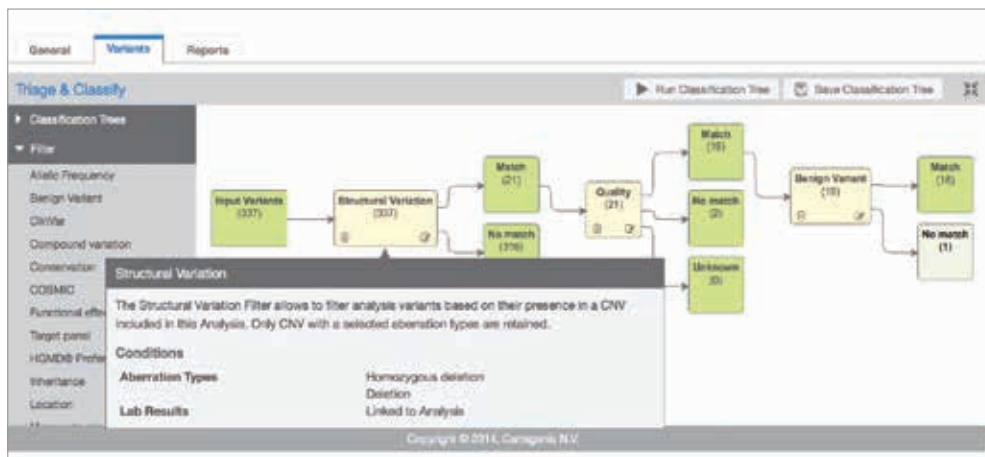
O alinhamento dessas regiões com genes do OMIM revelou uma perda do número de cópias de um segmento de 114,1 kb no cromossomo 16. Essa deleção abrange todo o locus ZNF469 que é conhecido por ter uma função estrutural e regulatória na montagem de fibras de colágeno e foi associada à síndrome de córnea frágil tipo 1.

Essa observação foi seguida por um novo sequenciamento, direcionado, baseado em NGS, de 31 genes, conforme representado no painel de tecido conjuntivo do Laboratório de diagnósticos do Greenwood Genetic. Eles usaram uma estratégia simples para extrair variantes relevantes para a doença (**Figura 2**).

As variantes benignas foram removidas pelo alinhamento dos dados de NGS com os seguintes bancos de dados públicos, que foram acessados através do Alissa Interpret:

- Exome Variant Server
- dbSNP
- 1000Genomes

Bem como com os próprios dados de referência para variantes comuns do GGC, como mostra a **Figura 3**.



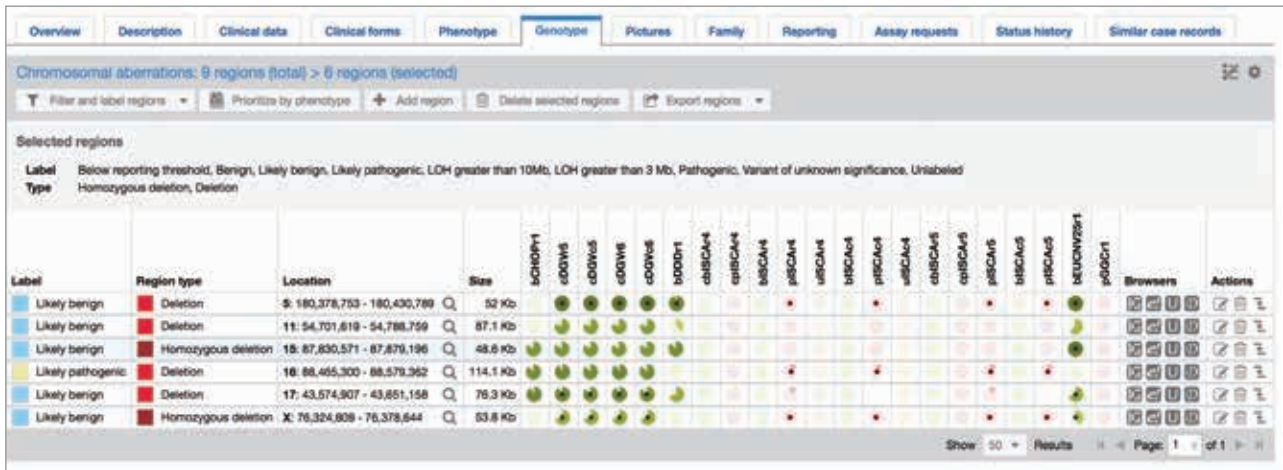
**Figura 2.** Estratégia de filtro de variante do Laboratório de Genética do Greenwood para dados de NGS baseados em resultados de aCNA.

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.	
<b>Conditions</b>	
Match Any of the following conditions:	
<b>dbSNP</b>	
dbSNP Allele frequency	0,01
dbSNP Allele count	200
dbSNP Validation Status	validated
dbSNP Suspicion Flag	not suspected false
<b>1000 Genomes</b>	
1000 Genomes Allele frequency	0,01
1000 Genomes Allele count	200
<b>ESP6500</b>	
ESP6500 Allele frequency	0,01
ESP6500 Allele count	200
<b>Gleeson_Exome_reference_set</b>	
Gleeson_Exome_reference_set Allele frequency	0,01
Gleeson_Exome_reference_set Allele count	200
<b>ALL_Exome_reference_set</b>	
ALL_Exome_reference_set Allele frequency	0,01
ALL_Exome_reference_set Allele count	200

**Figura 3.** As variantes são restringidas com base em parâmetros de qualidade de dados, como a profundidade de leitura > 20 (não mostrada). As variantes benignas presentes em um banco de dados privado, bem como aquelas presentes nos bancos de dados públicos (EVS, dbSNP, 1000Genomes) com uma frequência alélica > 1% são, então, eliminadas. O Greenwood também incorporou seus próprios exomas como referência.

O Greenwood combinou os resultados de aCNA e NGS no Alissa Interpret, mapeando a localização de variantes potencialmente patogênicas de alta confiabilidade às seis regiões deletadas nesse paciente (**Figura 4**).

Apenas uma variante, uma deleção de nucleotídeo único, estava localizada dentro da deleção de 114,1 kb no cromossomo 16, causando um deslocamento do quadro de leitura no alelo ZNF469 restante (**Figura 5**). Como é evidente a partir da literatura publicada revisada pelo Greenwood, esse resultado é consistente com um distúrbio autossômico recessivo do tecido conjuntivo, síndrome da córnea frágil 1, nesse paciente.

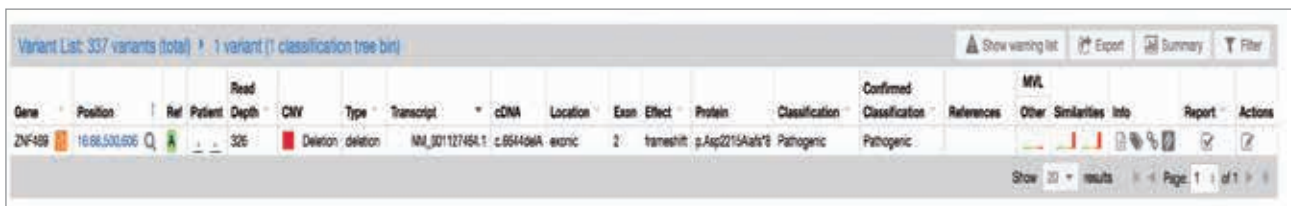


**Figura 4.** Integração de dados de aCNA para restringir o número de variantes potencialmente causadoras de doenças. Aqui, seis regiões mostrando perda do número de cópias, baseadas em dados de microarray, são usadas pelo Laboratório de Genética do Greenwood para identificar genes candidatos responsáveis pelo fenótipo do paciente.

## Validação

As conclusões acima foram validadas por qPCR para a herança paterna da deleção de 114,1 kb, resultando na diminuição da dosagem genômica da sequência exônica do alelo ZNF469, no pai e no probando.

Além disso, o sequenciamento Sanger confirmou a deleção de um único nucleotídeo causador de deslocamento do quadro de leitura do alelo ZNF469, na mãe e no probando, na configuração heterozigótica e hemizigótica, respectivamente.



**Figura 5.** Lista de variantes potencialmente causadores de doenças resultantes da estratégia de filtragem do laboratório. A abordagem identificou uma única mutação de deslocamento de quadro de leitura em uma região heterozigótica deletada. O gene é conhecido por causar a síndrome de córnea frágil 1, autossômica recessiva, consistente com o fenótipo do paciente.

## Resumo

Em conclusão, o exemplo acima demonstra uma maneira rápida e eficaz de integrar a análise de dados genômicos na determinação precisa de alterações genômicas causadoras de doenças usando o Alissa Interpret. Laboratório de Genética do Greenwood ilustrou como os recursos de integração de dados específicos da plataforma de informática clínica Alissa permitiram que a automação de Procedimentos Operacionais Padronizados trouxesse ganhos de eficiência significativos para o fluxo de trabalho e a prática de rotina do laboratório.

# Respostas confiáveis. Juntos.

#### Declaração de uso pretendido

O software Alissa Interpret destina-se a armazenamento, visualização e anotação de variantes usando fontes de dados públicas, comerciais e fontes internas de clientes. Ele permite que usuários finais configurem *pipelines* para executar ou automatizar a triagem e classificação de variantes genéticas. Fornece recursos para gravação de avaliações de variantes e a elaboração de relatórios de análise de variantes. Os recursos de integração permitem a troca automatizada de informações de variantes e de relatórios com sistemas de software externos.

O software Alissa Interpret deve ser utilizado por profissionais de laboratório, geneticistas clínicos e patologistas moleculares treinados, como uma plataforma de software de suporte às decisões de análise e interpretação de variantes genéticas, identificadas em amostras humanas, no contexto das informações clínicas registradas para uma amostra.

#### SAIBA MAIS:

[www.agilent.com/lifesciences/alissa](http://www.agilent.com/lifesciences/alissa)

Envie um e-mail para [cad.info@agilent.com](mailto:cad.info@agilent.com)

PR7000-0689

© Agilent Technologies, Inc. 2017. Impresso nos EUA.

Data da publicação original: 1 de novembro de 2015

Data da revisão: 30 de junho de 2017

5991-8528PTBR

O Alissa Interpret é um dispositivo médico de classe I isento dos EUA, um dispositivo de diagnóstico in vitro (IVD) da Europa CE e um dispositivo de IVD de classe I do Canadá e da Austrália.



Agilent Technologies