

Toelichting uitslag Whole Exome Sequencing

Toelichting Whole Exome Sequencing (WES)

In deze toelichting leest u informatie over onze WES-methode, de mogelijkheden, beperkingen en sensitiviteit daarvan. Daarnaast leest u informatie over de rapportage van varianten, en over eventuele vervolgstappen die u kunt ondernemen na een uitslag, zoals segregatie van een variant of heranalyse op de gegenereerde data. Mocht u nog verdere vragen hebben, neem dan contact met ons op via genoomdiagnostiek@umcutrecht.nl of 088-7554090.

Achtergrond

Het doel van dit onderzoek is om een genetische oorzaak te vinden voor een mogelijk erfelijke aandoening bij de adviesvrager. Via WES is het erfelijke materiaal (DNA-moleculen) van de adviesvrager geanalyseerd. Bij WES vindt er eerst een verrijking plaats voor de eiwitcoderende exonen van vrijwel alle genen (het exoom) uit het DNA van de adviesvrager. Na sequencing, bioinformatische analyse en filtering, blijft er een selectie over van varianten in de aangevraagde genen. Vervolgens beoordelen we deze varianten op basis van verschillende criteria (zoals hoe vaak een variant voorkomt in een gezonde populatie), de verstrekte klinische gegevens en familieanamnese. Bij deze beoordeling wordt gebruik gemaakt van wetenschappelijke literatuur, in silico predictieprogramma's en verschillende lokale, nationale en internationale databases.

Methode en technische details

- WES; verrijking met Agilent CREv2 kit, Illumina 150bp paired-end sequencing op een NovaSeq6000 platform.
- Sequentie- en indien van toepassing CNV-analyse van eiwitcoderende exonen incl. de 20 flankerende intron nucleotiden van de genen in het geanalyseerde genpanel.
- De dekking van een gen/genpanel bepalen we met zelf ontwikkelde software op basis van een minimale verticale dekking van 15 unieke sequencing reads (15x) per base voor de eiwitcoderende exonen incl. de 20 flankerende intron basen.
- Bij genpanel-analyses analyseren we varianten voor alle overervingspatronen (inclusief autosomaal dominante overerving). In het geval dat data van ouders betrokken zijn bij het onderzoek, bepalen we ook de segregatie van de varianten.
- Bij exoombrede-analyses filteren we, mits data van beide ouders betrokken zijn bij de analyse, varianten op basis van overerving; we analyseren alleen zeldzame de novo, samengestelde heterozygote, homozygote en hemizygoten varianten. Indien data van één of beide ouders niet betrokken zijn, beperken we de analyse tot zeldzame veronderstelde samengestelde heterozygote, homozygote en hemizygoten varianten. Overige zeldzame heterozygote varianten in het exoom, die volgens een autosomaal dominant overervingspatroon zijn geërfd, worden bij exoombrede-analyses in principe NIET beoordeeld. Omdat we bij exoombrede-analyses gebruik maken van filtering op basis van overerving is de sensitiviteit van deze analyse lager dan bij genpanel-analyses.
- De gebruikte software en databases voor dataverwerking en interpretatie zijn o.a. BWA alignment, GATK HaplotypeCaller, Exomedepth, Alissa Interpret, HGMD professional, Alamut Visual, GnomAD, ClinVar, VKGL-database, IGV, UCSC genome browser, Decipher, Database of Genomic Variants.
- Exacte versie nummers van gebruikte kits en software zijn op verzoek beschikbaar.

Technische beperkingen test

Deze test is niet of nauwelijks geschikt om de volgende genetische afwijkingen te detecteren:

- pathogene verlengingen van repeats (bijv. trinucleotide repeats)
- structurele chromosoomafwijkingen (bijv. translocaties en inversies)
- inserties van mobile elements (bijv. ALU-repeats)
- varianten in mitochondriaal DNA, niet-coderende genen en sterk homologe gebieden (bijv. pseudogenen)
- varianten in regulerende sequenties en in intronische gebieden meer dan 20 nucleotiden verwijderd van de intron-exon grens
- mozaïeke varianten (de sensitiviteit hiervoor is niet bekend en o.a. sterk afhankelijk van de dekking)
- varianten in slecht gedekte gebieden van het exoom (bijv. zeer GC-rijke gebieden)

Sensitiviteit en specificiteit

De sensitiviteit voor de detectie van varianten is in genen met een hoge dekking veel hoger dan in genen met een lage dekking. De totale gemiddelde analytische sensitiviteit voor het detecteren van genomische varianten (exonen +/- 20 basen) in genpanel-analyses is >98% en voor exoombrede-analyses >90%. Het grootste deel van de ziekteveroorzakende varianten zijn Single Nucleotide Variants (SNVs). De sensitiviteit voor de detectie van deze varianten is gemiddeld >99%. De sensitiviteit voor de detectie van Multi Nucleotide Variants (MNVs; bijv. inserties, deleties, indels tot ±50 basen) en Copy Number Variants (CNVs; grotere deleties en duplicaties van vaak >200 basen) is gemiddeld >95%. Relatief kleine MNVs of juist relatief grote CNVs (3 of meer targets) zijn beter te detecteren. De detectie van CNVs is gevoelig voor de kwaliteit van het DNA (o.a. afhankelijk van de isolatie-methode, weefselbron en hoe oud het DNA is) en andere, vaak onbekende, factoren. Hierdoor is het mogelijk dat we geen of slechts een beperkte CNV-analyse kunnen doen. Hiervan maken we een opmerking in de uitslag.

SNVs, MNVs en CNVs bevestigen we alleen met een andere techniek (bijv. Sanger sequencing, MLPA of low-pass WGS), indien deze niet voldoen aan onze kwaliteitscriteria. De specificiteit van gerapporteerde varianten is >99.9%.

Rapportage van varianten

Varianten classificeren we in 5 klassen: 1) benigne, 2) waarschijnlijk benigne, 3) variant of uncertain significance (VUS), 4) waarschijnlijk pathogeen (4LP) en 5) pathogeen (5P). Daarnaast onderscheiden we risicofactoren. We classificeren varianten in de context van nationale en internationale aanbevelingen zoals die van de ACMG (PMID 25741868) en ClinGen (<https://clinicalgenome.org/working-groups/sequence-variant-interpretation>). Pathogene en waarschijnlijk pathogene varianten die de klinische verschijnselen kunnen verklaren rapporteren we. Benigne en waarschijnlijk benigne varianten rapporteren we in principe niet. Een VUS, een risicofactor of een dragerschap van een recessief overervend ziektebeeld rapporteren we alleen indien deze, naar inzicht van de laboratoriumspecialist klinische genetica of na overleg met de aanvrager, relevant lijkt voor de hulpvraag van de adviesvrager. Incomplete of incorrecte informatie over de hulpvraag, de klinische verschijnselen en de familieanamnese van de adviesvrager kan leiden tot misinterpretatie van de resultaten en het al dan niet rapporteren van een variant. Nevenbevindingen zijn niet uitgesloten en rapporteren we in overleg met aanvrager volgens landelijk beleid (zie <https://www.vkgn.org/vakinformatie/richtlijnen-en-protocollen/uitgebreid-dna-onderzoek-en-nevenbevindingen/>). Varianten rapporteren we conform de internationaal geldende nomenclatuur (HGVS / ISCN 2020) in human genome build Feb. 2009 GRCh37/hg19.

Segregatie en declaratie

Wanneer we een variant gerapporteerd hebben, is onderzoek bij bloedverwanten naar deze variant mogelijk. Dit noemen we segregatie-analyse. Segregatie-analyse voor presymptomatisch en prenataal onderzoek kan in principe alleen een klinisch geneticus aanvragen. Segregatie-analyse bij een bloedverwant van een (waarschijnlijk) pathogene variant mogen we alleen factureren op de verzekeringpolis van de bloedverwant. Segregatie-analyse voor verdere duiding van een VUS of het bepalen of een variant op één (in cis) of twee allelen (in trans) gelegen is, mogen we declareren op de verzekeringpolis van de probandus (oorspronkelijke patiënt in de familie) en is aan te vragen middels een "informativiteitstest". Noteer hierbij ook de persoonsgegevens van de probandus.

Heranalyseren data en updates van een genpanel

Indien de hulpvraag voor de adviesvrager niet of deels is beantwoord, is een her- of vervolganalyse mogelijk op de bestaande data. Een analyse van één of meerdere genen, andere genpanels, of een heranalyse van een genpanel na een update is met een nieuw aanvraagformulier aan te vragen. Een exoombrede-analyse is alleen door of i.o.m. een klinisch geneticus aan te vragen. Her-/vervolganalyses worden gefactureerd op de verzekeringpolis van de adviesvrager.

Er vinden regelmatig updates plaats van genpanels, waarbij nieuwe genen worden toegevoegd en/of verwijderd. Op het moment van aanvraag kan het zijn dat een klinisch relevant bekend gen nog niet aanwezig is in het genpanel. Aan de hand van het versienummer van het genpanel (die in de uitslag vermeld

Toelichting uitslag Whole Exome Sequencing

staat) en de [tabel met beschikbare genpanels](#) op onze website kunt u opzoeken welke genen geanalyseerd zijn (<https://www.umcutrecht.nl/nl/next-generation-sequencing-ngs>).