**ПРОЕКТ**

КЛИНИЧЕСКИЙ ПРОТОКОЛ МЕДИЦИНСКОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА

**«ПОЛНОЭКЗОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДНК ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ NGS ТЕХНОЛОГИЙ (ПОИСК МУТАЦИЙ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ ПРИ ЗАДЕРЖКЕ ПСИХОМОТОРНОГО РАЗВИТИЯ, РАССТРОЙСТВА АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА, НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВАХ)»**

1. **Вводная часть**

**1) код(ы) МКБ-10:**

|  |
| --- |
| МКБ-10 |
| Код | Название |
| Q81 | Буллезный эпидермолиз |
| G40 | Эпилепсия |
| E70-E90 | Нарушения обмена веществ |
| F84 | Общие расстройства развития |
| F88 | Другие расстройства психологического развития |
| F89 | Неуточненное расстройство психологического развития |
| F00 | Деменция при болезни Альцгеймера |
| F01 | Сосудистая деменция |
| F02 | Деменция при болезнях,квалифицированных в других разделах |
| F03 | Деменция, неуточненная |

**2) дата разработки и пересмотра протокола:** 2021 год.

**3) сокращения, используемые в протоколе:**

NGS (Next Generation Sequenсe) – секвенирование нового поколения

OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) – медицинская база данных, в которой собирается информация об известных заболеваниях с генетическим компонентом и генах, ответственных за их развитие

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

CNV (Copy number variation) – изменение числа копий

**4) пользователи протокола:** врачи по специальностям «Медицинская генетика», «Клиническая цитогенетика», «Клиническая молекулярная биология и генетика», «Неврология взрослая, детская», «Педиатрия», «Неонатология», «Терапия», «Aкушерство и гинекология взрослая, детская», «Врач участковый и (или) врач общей практики».

**5) категория пациентов:**

Дети, с подозрением на наследственные заболевания, с задержкой психомоторного развития, расстройства аутистического спектра, неврологических расстройств (врожденные эпилепсии, деменция, спиноцеребральная атрофия, болезнь Паркинсона и др.); дети из семей группы высокого генетического риска, являющиеся носителями мутаций; дети с наследственной генетической патологией.

**6) определение:**

Полноэкзомное секвенирование ДНК человека с использованием NGS технологий – метод, который одновременно считывает сотни и тысячи генов за один эксперимент в сравнении с традиционным секвенированием по Сангеру, который покрывает ограниченное количество генетической информации. Метод анализирует транскрибируемые участки ДНК, где предположительно находятся около 85% всех мутаций, ассоциированных с тем или иным генетическим заболеванием. На сегодня в базе OMIM описано более 4700 таких генов.

Кратность применения: исследование проводится однократно.

Техника проведения: применение секвенирования нового поколения (NGS технологии).

Полное экзомное секвенирование на сегодняшний день является современным генетическим тестом, который позволяет быстро и точно диагностировать:

• Наследственное генетическое заболевание;

• Мутации при задержке психомоторного развития;

• Мутации при расстройствах аутистического спектра, неврологических расстройствах;

Рассчитать прогноз риска развития генетической патологии для пациента и членов его семьи.

Чувствительность: высокочувствительный метод, который включает от 100 до 130 млн прочтений пар нуклеотидов [1-2].

**7) клиническая классификация (наиболее распространенные подходы, по этиологии, стадии).**

Классификация полученных результатов после проведения биоинформационного анализа при обнаружении варианта нуклеотидной последовательности [5]:

* Патогенный (pathogenic)
* Вероятно патогенный (likely pathogenic)
* Неопределенного значения (uncertain significance)
* Вероятно доброкачественный (likely benign)
* Доброкачественный (benign)

**2. Методы, подходы и процедуры диагностики и лечения**

**1) цель проведения процедуры и вмешательства:**

Полноэкзомное секвенирование на сегодняшний день является современным генетическим тестом, который позволяет быстро и точно диагностировать:

* Наследственное генетическое заболевание;
* Мутации при задержке психомоторного развития;
* Мутации при расстройствах аутистического спектра, неврологических расстройствах;

Также полноэкзомное секвенирование позволяет рассчитать прогноз риска развития генетической патологии для пациента и членов его семьи [1, 3-4].

**2) противопоказания к процедуре и вмешательству:**

Нет противопоказаний

**3) показания к процедуре и вмешательству:**

Подозрение на генетическую патологию, а именно:

* Дети, с подозрением на наследственные заболевания, с задержкой психомоторного развития, расстройства аутистического спектра, неврологических расстройствах (врожденные эпилепсии).
* Семьи «группы высокого генетического риска», являющиеся носителями мутаций.
* Семьи, имеющие детей с наследственной генетической патологией.

**4) перечень основных и дополнительных диагностических мероприятий:** не требуется.

**5) требования к проведению процедуры и вмешательства:**

**(требования к соблюдению мер безопасности, санитарно-противоэпидемическому режиму), требования к оснащению, расходным материалам, медикаментам; требования к подготовке пациента (описание процесса подготовки пациента к проведению процедуры), а также непосредственная методика проведения процедуры (вмешательства):**

**Требования к соблюдению мер безопасности, санитарно-эпидемиологическому режиму:**

Меры безопасности и противоэпидемический режим согласно Санитарным правилам «Санитарно-эпидемиологические требования к объектам здравоохранения», утвержденным постановлением Правительства Республики Казахстан от 11 августа 2020 года № ҚР ДСМ-96/2020.

**Требования к оснащению:**

Для проведения полноэкзомного секвенирования ДНК человека с использованием технологии NGS потребуются:

* Платформы для секвенирования;
* Секвенатор;
* Автоматическая станция для выделения ДНК;
* Флуориметр;
* Центрифуга;
* Ламинарный шкаф;
* Проточный бактерицидный рециркулятор воздуха;
* Холодильник;
* Инструмент для количественного определения нуклеиновых кислот;
* Анализатор качества нуклеиновых кислот;
* Термоциклер;
* Вортекс плашечный;
* Ультрасоникатор;
* Обычные лабораторные принадлежности (пипетки, 96-луночные планшеты, центрифужные пробирки).

**Методика проведения процедуры:**

Полноэкзомное секвенирование ДНК человека с использованием NGS технологий представляет собой несколько этапов, включающих фрагментирование цепочки ДНК, дальнейшую прицепку биотинилированных олигонуклеотидов, которые прикрепляются к экзомам (Warr et al., 2015). Далее, магнетические частицы стрептавидина прикрепляются к биотинилированным олигонуклеотидам и отправляются на полимеразную цепную реакцию для увеличения количества фрагментов ДНК, тогда как неприкрепленные участки (неэкзомы) смываются в ходе процесса подготовки. После этого полученные цепочки ДНК в ходе полимеразной цепной реакции считываются секвенатором для дальнейшего биоинформатического анализа.

***I этап: Подготовка библиотеки.***

1. Приготовить для каждого образца смесь, состоящую из следующих компонентов: комплект библиотеки (14 мкл); 50-100 нг гДНК, не фиксированная формалин-залитая парафином (≤56мкл); вода без нуклеазы (до 70мкл).
2. Смешать смесь (мастер микс) осторожно на вортексе или пипетируя вверх/вниз 5 раз, центрифугировать для осаждения смеси.
3. Для каждого образца используйте дозатор маленького объема, аккуратно добавьте 5мкл смеси мастер микса в каждый горизонтальный ряд (12 лунок) плашки, не меняя наконечник.
4. Закрыть плашку оптическим покрытием, убедиться, что пленка крепко и надежно прилегает к плашке, затем центрифугировать плашку для осаждения смеси.
5. Поместить плашку в термоциклер, используя программу для 5 мкл согласно таблице (Приложение 1).

Хранить ПЦР продукт можно при 10⁰С всю ночь. При длительном хранении, хранить при -30⁰С до -10⁰С.

***II этап: Частичное расщепление ампликонов***

1. Кратко центрифугировать плашку для осаждения смеси. Осторожно снять покрытие, затем объединить каждый ряд в лунке под номером 6, не меняя наконечник. Как показано на рисунке:



1. Добавить **6 мкл FuPa Reagent** каждую реакцию, доведя тем самым объем до 60 мкл.
2. Закрыть плашку оптическим покрытием, убедиться, что пленка крепко и надежно прилегает к плашке, затем кратко вортексировать и центрифугировать плашку для осаждения смеси.
3. Поместить плашку в термоциклер, используя программу согласно таблице (Приложение 2).

Хранить ПЦР продукт можно при 10⁰С в течении 1 часа. При длительном хранении, хранить при -30⁰С до -10⁰С.

***III этап: Лигирование и очистка***

Для каждого выбранного штрих-кода Х приготовить смесь из адаптера штрих-кода (2 мкл) и штрих-кода (2 мкл) в конечном разведении 1:4 для каждого адаптера, добавить воду без нуклеазы (4 мкл). Хранение разведенных адаптеров при -20⁰С.

Добавить 6 мкл этой штрих-код адаптер смеси в реакцию лигирования – шаг 3 на этой странице.

Если в Switch Solution есть видимые преципитаты, вортексируйте или пипетируйте при комнатной температуре.

1. Кратко центрифугируйте плашку для осаждения смеси.
2. Аккуратно удалите покрытие с плашки и добавьте компоненты в порядке, указанном ниже.

Важно добавлять ДНК лигазу в последнюю очередь. Не смешивать ДНК лигазу и адаптеры до добавления к ампликонам. Добавить следующие компоненты в возрастающей последовательности: Switch Solution (12 мкл), смесь штрих-код адаптера (6 мкл), ДНК лигаза (6 мкл).

1. Закрыть плашку оптическим покрытием, убедиться, что пленка крепко и надежно прилегает к плашке, затем кратко вортексировать и центрифугировать плашку для осаждения смеси.
2. Поместить плашку в термоциклер, используя программу, согласно таблице (Приложение 3). Хранить при -20°C.

***IV этап: Очистка библиотеки***

1. Приготовить 70% этанол перед использованием.
2. До использования набор для очистки продуктов ПЦР тщательно вортексировать при комнатной температуре.
3. В чистые 1,5 мкл пробирки внести 80 µL набора для очистки продуктов ПЦР. Затем добавить 84 мкл библиотеки. Тщательно перемешать суспензию ДНК и шариков пипеткой 5-10 раз. При визуальном осмотре суспензия должна быть гомогенной консистенции. Если капли попали на стенки, нужно сбросить и заново пипетировать.
4. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре.
5. Поместить на магнитный штатив, затем инкубировать 5 минут или до очищения раствора. Осторожно удалить супернатант, так, чтобы наконечник был строго перпендикулярно дну пробирки.
6. Добавить 150 µL 70% этанола, переставлять пробирку на 180°, так, чтобы шарики проходили сквозь раствор. Осторожно удалить супернатант.
7. Повторить шаг 6.
8. Убедиться, что этанол весь удален из лунки. Оставить плашку на магнитной поверхности и просушить при комнатной температуре 2-5 минут. Не пересушить.Немедленно переходить к следующему этапу анализа.

***V этап: Количественное определение амплифицированной библиотеки на флуориметре***

1. Разморозить и соединить реагенты мастер-микс библиотеки амплификации (50 мкд) и библиотеку амплификации (2 мкл).
2. В пробирки с магнитными шариками из **шага 8** внести по 52 мкл пцр-микса, закрыть крышку, аккуратно вортексировать, кратко центрифугировать.
3. Поместить в амплификатор. Амплифицировать следуя программе согласно таблице (Приложение 4). Храненить при -20°C.

***Очистка библиотеки состоит из 2 этапов:***

* соотношении шариков к объему образца **0,5X**: ДНК с высоким молекулярным весом связана с шариками, а **ампликоны** и праймеры остаются **в растворе**. Супернатант не выбрасывать.
* соотношении магнитных шариков **1,2X** к объему образца: **ампликоны** связаны **с** **шариками**, а праймеры остаются в растворе. Сохранить шарики и элюировать ампликоны из шариков.

**Первый этап**:

1. В пробирки объемом 0,5 мл внести 25 мкл (0,5X объема образца) реагента для очистки продуктов ПЦР, добавить ~ 50 мкл образца. Тщательно перемешать суспензию шариков с ДНК, пипеткой вверх и вниз 5 раз.

2. Инкубировать смесь в течение 5 минут при комнатной температуре.

3. Поместить пробирки на магнитный штатив, как минимум на 5 минут или пока раствор не станет прозрачным.

 4. Осторожно перенести супернатант из каждой пробирки в новую пробирку объемом 0,5 мл, не нарушая осадок.

Супернатант содержит нужные ампликоны, не выбрасывать.

**Второй этап**:

1. К супернатанту, полученному на шаге 4, добавить 60 мкл (1,2х объема исходного образца) реагента для очистки продуктов ПЦР. Тщательно перемешать суспензию шариков с ДНК, пипеткой вверх и вниз 5 раз.

2. Инкубируйте смесь в течение 5 минут при комнатной температуре.

3. Поместить пробирки на магнитный штатив, на 3 минут или пока раствор не станет прозрачным.

 4. Тщательно удалить супернатант, не нарушая осадок. Ампликоны связаны с шариками.

1. Добавить 150 µL 70% этанол, переставить пробирку на 180°, так, чтобы шарики проходили сквозь раствор, затем инкубировать 2 минуты или до очищения раствора. Осторожно удалить супернатант.
2. Повторить шаг 6 два раза.
3. Убедиться, что этанол весь удален из лунки. Оставить плашку на магнитной поверхности и просушить при комнатной температуре 2-5 минуты. Не пересушить.
4. Добавить 50 мкл буфера Low TE к шарикам, чтобы диспергировать шарики.
5. Закрыть крышки, тщательно перемешать, затем центрифугировать для осаждения капель со стенок. В качестве альтернативы, смешать, установив дозатор на 40 мкл, затем пипетировать смесь вверх и вниз 5 раз. Закрыть крышки.
6. Инкубировать при комнатной температуре не менее 2 минут.
7. Поместить пробирки на магнитный штатив на 2 минуты или пока раствор не станет прозрачным.
8. Перенести ампликон не затрагивая шарики в чистые пробирки.

Хранить библиотеки при 4–8 ° C до 1 месяца, более длительное время при температуре от –30 ° C до –10 ° C.

1. Измерить концентрацию на флуорометре.
2. На основе полученной концентрации библиотеки рассчитать коэффициент разбавления. Итоговая концентрация библиотеки ~ 100 рМ.

***VI этап: Количественная оценка библиотеки кПЦР и вычисление коэффициента разбавления***

Определить концентрацию библиотеки с использованием набора для количественного анализа:

1. Приготовить серии трех 10х кратно разведенных библиотеки контроля E. coli (~68 pM): 6.8 pM, 0.68 pM, и 0.068 pM. Промаркировать как стандарт, затем использовать данные разведения для программирования прибора кПЦР.
2. Разведение E. Coli: Приготовить пробирки и подписать стандарт(S) 1,2,3.

 В 1-ую + 45 мкл Н2О + 5мкл E. Coli

Во 2-ую +45мкл Н2О + 5 мкл из 1-ой пробирки

В 3-ю +45мкл Н2О + 5мкл из 2-ой пробирки

1. Приготовить ПЦР мастер микс на 2 лунки для каждой библиотеки образца, стандарта, NTC, следуя данным таблицы в Приложении 5.
2. В плашку (оптическую ПЦР-пластину) в дублях добавить образец, стандарт, NTC, согласно данным таблицы в Приложении 6.
3. Задать программу для ПЦР реал тайм согласно Приложению 7.
4. После кПЦР вычислить среднюю концентрацию неразбавленной библиотеки путем умножения концентрации × 100.
5. На основе полученной концентрации библиотеки рассчитать коэффициент разбавления. Итоговая концентрация библиотеки ~ 100 рМ.

Общая длительность проведения процедуры составляет

170-199 часов и проводится в несколько этапов.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование этапа | Краткое описание | Количество задействованного персонала | Длительность | Расходные материалы |
| 1.Преаналитический  | На этапе преаналитики производится процедура выделения ДНК из клеток периферической крови, измерение концентрации полученных ДНК | Лаборант/врач-генетик | 2 часа | Набор для выделения ДНК (расход в зависимости от количества пациентов), пробирки типа Эппендорф – 5 шт, наконечники – упаковка на 10мкл – 6шт, 200мкл – 6шт, 1000мкл – 6шт.Набор для измерения ДНК |
| Подготовка библиотеки (работа с образцами) для высокопроизводительного секвенирования | Врач-генетик | 48 часов | Набор приготовления библиотек для полноэкзомного секвенирования, плашка с праймерами для секвенирования экзома, пробирки с низкой адгезивностью – 10 шт, пробирки на 0,2мкл – 40шт, на 0,5мкл – 20шт, на 0,5шт мкл – 20, наконечники – на 10мкл – 96шт, 200мкл – 96шт, 1000мкл – 96шт |
| Перенос готовых библиотек на биочипы | Врач-генетик | 13-18 часов | Набор для приготовления библиотек с помощью автоматической системы, пробирки на 0,2мкл – 20шт, наконечники – на 10мкл – 40шт, 200мкл – 40шт |
| Процесс секвенирования – считывания полученной информации с биочипа и перенос данных в программное обеспечение | Врач-генетик | 10 часов | Набор для секвенирования в анализаторе |
| 2.Аналитический  | На аналитическом этапе производится биоинформационный анализ полученных данных, работа с базами данных, лабораторная интерпретация полученных результатов\* | Врач-генетик | 4-5 рабочих дней | - |
| 3.Постаналитический | Данный этап включает оформление и выдачу результатов | Врач-генетик  | 1 час | - |
| \*Клиническая интерпретация полученных данных производится отдельно врач-генетиком на консультативном приеме. |  |

**Таблица 1. Этапы проведения процедуры полноэкзомного секвенирования.**

**7) индикаторы эффективности процедуры:**

Ожидаемый эффект от внедрения: нахождение мутаций в генах, ассоциированных с заболеванием, для постановки молекулярного диагноза, возможной дальнейшей корректировки лечения пациентов и для дополнительного рассмотрения планирования беременности.

# **3. ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ПРОТОКОЛА:**

**1) список разработчиков протокола с указанием квалификационных данных:**

1. Абильдинова Гульшара Жусуповна – д.м.н., профессор, врач-генетик высшей категории, руководитель персонализированной геномной лаборатории РГП «Больница Медицинского центра Управления Делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ;
2. Джаксыбаева Алтыншаш Хайруллаевна – д.м.н., врач-невролог высшей категории, старший ординатор-консультант Корпоративного фонда «University Medical Center», доцент кафедры неврологии НАО «Медицинский университет Астана»;
3. Жабакова Жанна Маратовна – врач-генетик второй категории персонализированной геномной лаборатории РГП «Больница Медицинского центра Управления Делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ;
4. Шинтемирова Асель Асылбековна – врач-генетик второй категории персонализированной геномной лаборатории РГП «Больница Медицинского центра Управления Делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ;
5. Нурпеисова Алтын Алданышовна – клинический фармаколог, начальник клинико-фармакологического отдела Больницы
6. Авдеев Андрей Владиславович – PhD, начальник отдела стратегического и инновационного развития РГП «Больница Медицинского центра Управления Делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ.
7. Ахметова Макпал Жапаровна – MPH, специалист отдела стратегического и инновационного развития РГП «Больница Медицинского центра Управления Делами Президента Республики Казахстан» на ПХВ.

**2) указание на отсутствие конфликта интересов:** нет.

**3) указание условий пересмотра протокола:**

пересмотр протокола через 5 лет после его опубликования и с даты его вступления в действие или при наличии новых методов с уровнем доказательности.

**4) список использованной литературы:**

1. T.B. Balci, K.M. Boycott etc. Debunking Occam’s razor: Diagnosing multiple genetic diseases in families by whole-exome sequencing. Clinical Genetics. 2017;92:281–289.
2. Boycott KM, Vanstone MR, Bulman DE, MacKenzie AE. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. Nat Rev Genet. 2013;14(10):681-691.
3. Chong JX, Buckingham KJ, Jhangiani SN, et al. The genetic basis of Mendelian phenotypes: discoveries, challenges, and opportunities. Am J Hum Genet. 2015;97(2):199-215.
4. Yang Y, Muzny DM, Xia F, et al. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. JAMA. 2014;312(18):1870-1879.
5. Contreras, A. L. (2020). Interpreting Genomic Reports. In Genomic Medicine (pp. 69-80). Springer, Cham.

**Приложение 1**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Стадия | Шаг | Температура | Время |
| Нагревание | Активация энзима | 99⁰С | 2 минуты |
| Цикл(10) | Денатурация | 99⁰С | 15 секунд |
| Гибридизация/продление | 60⁰С | 16 минут |
| Охлаждение | - | 10⁰С | Охлаждение |

**Таблица 2. Программа для проведения ПЦР**

**Приложение 2**

|  |  |
| --- | --- |
| Температура | Время |
| 50⁰С | 20 минут |
| 55⁰С | 20 минут |
| 60⁰С | 20 минут |
| 10⁰С | Охлаждение |

**Таблица 3. Программа для проведения ПЦР**

**Приложение 3**

|  |  |
| --- | --- |
| Температура | Время |
| 22⁰С | 30 минут |
| 68⁰С | 5 минут |
| 72⁰С | 5 минут |
| 10⁰С | Охлаждение |

**Таблица 4. Программа для лигирования и очистки ДНК**

**Приложение 4**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Этап | Шаг | Температура | Время |
| - | Активация фермента | 98°C | 2 мин |
| 5 циклов  | Денатурация | 98°C | 15 сек |
| Отжиг | 64°C | 1 мин |
| - | - | 10°C | - |

**Таблица 5. Программа для проведения ПЦР**

**Приложение 5**

|  |  |
| --- | --- |
| Реагент | Кол-во на 96-лун. плашку |
| 2X TaqMan Master Mix | 10 µL |
| 20X Ion TaqMan Assay | 1 µL |
| Всего | 11 µL |

**Таблица 6. Пропорции компонентов для приготовления ПЦР мастер микс**

**Приложение 6**

|  |  |
| --- | --- |
| Реагент | Кол-во на 96-лун. плашку |
| PCR Master Mix | 11 µL |
| 1:100 dilution of the sample (образец) | 9 µL |

**Таблица 7. Пропорции компонентов для проведения количественной оценки кПЦР**

**Приложение 7**

**Отметить: Стандарты «Target – S» (S1 - 6.8 pM, S2 - 0.68 pM, S3 - 0.068 pM)**

 **Образцы «Target – U»**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Этап | Шаг | Температура | Время |
| - | Hold (UDG incubation) | 50°C | 2 мин |
| - | Hold (polymerase activation) | 95°C | 2 мин |
| Цикл (40) | Денатурация | 95°C | 15 сек |
| Отжиг | 60°C | 1 мин |

**Таблица 8. Программа для ПЦР реал тайм**