



راهنمای آزمایشگاه ها Laboratories' Guide



myExome آزمایش توالی‌یابی کامل اگزوم است که با استفاده از تکنولوژی توالی‌یابی نسل جدید (NGS)، نواحی کدکننده اطلاعات مربوط به ساخت پروتئین حدود ۲۰۰۰۰ ژن شناخته شده در انسان را مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌دهد. این مناطق کدکننده که از آن نام برده شد اگزون و مجموعه اگزون‌ها اگزوم نامیده می‌شوند.

توالی‌یابی کامل اگزوم یک روش مقرون به صرفه برای مطالعه تغییرات ژنتیکی دخیل در بیماری‌های ارثی، اختلالات اسپورادیک و همین طور سرطان است. همچنین این روش یک جایگزین معتبر برای توالی‌یابی کامل ژنوم است با لاکم زمانی که محدودیت مالی برای بیمار وجود دارد. در انسان تنها ۱ تا ۳ درصد از ژنوم، قطعات کدکننده پروتئین یا اگزونی هستند که ۸۵٪ از جهش‌های بیماری‌زا در آن یافت شده‌اند. بنابراین توالی اگزونی، به طور چشمگیری از نیاز به توالی‌یابی باقی ۹۷٪ ژنوم می‌کاهد و تجزیه و تحلیل گسترده بسیاری از نمونه‌ها را بدون نیاز به پرداخت هزینه گزاف ممکن می‌سازد.

تکنولوژی به کار رفته در myExome



در آزمایش myExome از بهترین و جدیدترین تکنولوژی‌های آزمایشگاهی استفاده می‌شود. فرایند آزمایشگاهی توالی‌یابی اگزوم شامل دو قسمت اصلی جداسازی قطعات DNA مربوط به اگزون‌ها از بقیه ژنوم و توالی‌یابی قطعات جداسازی شده می‌باشد. نوع تکنولوژی مورد استفاده در هر یک از این قسمت‌ها تأثیر مستقیم در دقت تعیین جهش‌های ژنتیکی در مرحله آنالیز داده‌ها دارد.

جداسازی قطعات اگزونی

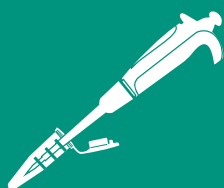


در آزمایش myExome برای جداسازی قطعات اگزون‌ها از کیت SureSelect کمپانی Agilent آمریکا که بر اساس مطالعات مختلف بهترین عملکرد را از نظر جداسازی کامل تر و یکنواخت قطعات DNA اگزونی دارد استفاده می‌شود. برای این آزمایش از جدیدترین نسخه این کیت (SureSelect V7) که بهترین عملکرد را از نظر جداسازی قطعات DNA اگزون‌های مربوط به ژن‌های با اهمیت بالینی دارد، استفاده می‌شود. لازم به ذکر است که تمامی مراحل جداسازی قطعات DNA اگزون‌ها در آزمایش myExome با استفاده از ربات‌های دقیق و پیشرفته آزمایشگاهی انجام می‌شود که میزان خطا در انجام فرایند و جابه جایی نمونه‌ها را به حداقل ممکن می‌رساند.

تضمین کیفیت در هر مرحله از آزمایش



استخراج DNA



آماده سازی
کتابخانه ژنی



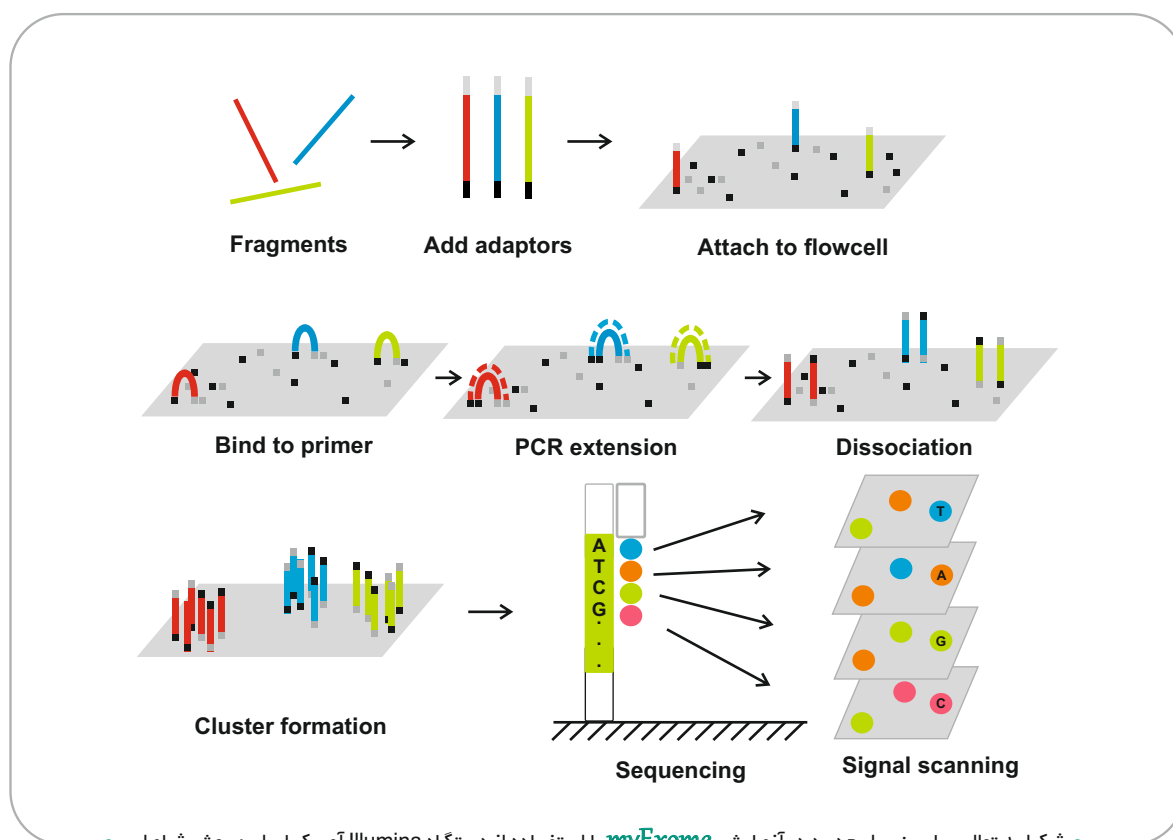
توالی یابی



آنالیز داده‌ها



توالی یابی DNA در آزمایش myExome با استفاده از بروزترین دستگاه های توالی یابی DNA نسل جدید (NGS) شرکت Illumina آمریکا انجام می شود (شکل ۱). در این روش میلیاردها رشته DNA به طور همزمان توالی یابی شده و سپس محل هر یک بوسیله مطابقت با ژنوم انسانی مرجع تعیین می گردد. طول رشته های توالی یابی شده در آزمایش myExome برابر ۱۵ نوکلئوتید است که موجب تطابق صحیح تر با ژنوم مرجع و در نهایت دقت بالاتر در تعیین جهش های ژنی می گردد.



شکل ۱: توالی یابی نسل جدید در آزمایش myExome با استفاده از دستگاه Illumina آمریکا - این روش شامل تهیه کتابخانه اگزونی، ایجاد خوشه DNA، واکنش مرحله ای توالی یابی DNA و عکس برداری پس از هر مرحله از واکنش است.



عمق خوانش در تکنولوژی توالی یابی DNA نسل جدید (NGS) عبارت است از تعداد دفعاتی که هر قسمت مورد نظر از ژنوم توالی یابی می شود. هر چه عمق خوانش بالاتر باشد دقت تعیین جهش های ژنتیکی موجود در ژنوم بیشتر خواهد بود. بر همین اساس آزمایش myExome با میانگین عمق خوانش 100x و یا 200x انجام می شود.



نتایج آزمایش myExome به سه حالت براساس انتخاب آزمایشگاه مربوطه قابل ارائه می‌باشد.

۱ در حالت اول، داده‌های خام توالی DNA به شکل فایل FASTQ در اختیار آزمایشگاه قرار داده می‌شود و آنالیز داده‌ها برای پیدا نمودن جهش بیماری‌زا باید توسط آزمایشگاه سفارش دهنده آزمایش انجام گردد.

۲ در حالت دوم، رشته‌های توالی DNA تولید شده، با ژنوم مرجع انسانی مطابقت داده شده و نواحی متفاوت با ژنوم مرجع مشخص و گزارش می‌گردند. نتایج در این حالت در قالب فایل‌های BAM و VCF در اختیار آزمایشگاه سفارش دهنده قرار گرفته و همچنین مجموعه‌ای از آنالیزهای زیر در قالب یک فایل Excel ارائه خواهد گردید.

• فیلتر کردن جهش‌های ژنتیکی با کیفیت غیرقابل قبول که به احتمال زیاد جهش‌های مثبت کاذب می‌باشند

• تفسیر بیش از ۲۰ هزار جهش باقی‌مانده با کیفیت قابل قبول به لحاظ محل قرارگیری آنها نسبت به ژن‌ها و تاثیر آنها بر ترجمه پروتئین‌های مربوطه

• تعیین شیوع تمامی جهش‌های اگزومی یافت شده در نمونه مورد بررسی، در جمعیت‌های مختلف بر اساس پایگاه‌های داده ژنومیک ایرانوم، gnomAD و 1000 Genomes

• پیش بینی عملکرد جهش‌های تغییر آمینواسید (missense) با استفاده از مجموعه‌ای از الگوریتم‌ها مثل PolyPhen، SIFT و CADD

• گزارش Ada Score و RF Score برای پیش بینی عملکرد جهش‌های حد فاصل اگزون‌ها و اینترون‌ها (Splicing Sites) بر ترکیب اگزون‌ها برای ترجمه پروتئین با استفاده از پایگاه داده dbSNV

• تفسیر تاثیر بالینی جهش‌های یافت شده در نمونه مورد نظر توسط آزمایشگاه‌های معتبر دنیا بر اساس پایگاه داده ClinVar

• محاسبه عمق پوشش برای آخرین نسخه مورد توافق توالی‌های کد کننده پروتئین (CCDS) ژنوم انسان

۳ در حالت سوم، آنالیز کامل داده‌های توالی‌یابی شده اگزوم توسط متخصصین با تجربه آزمایشگاه ساژن انجام و تفسیر کاملی از داده‌های ژنتیکی در اختیار آزمایشگاه سفارش دهنده قرار خواهد گرفت. آنالیز کامل ساژن شامل موارد زیر می‌باشد.

• تمام موارد ذکر شده در حالت دوم به علاوه موارد زیر:

• محاسبه عمق پوشش برای هر اگزون

• محاسبه عمق پوشش برای هر ژن

• تفسیر تاثیر بالینی بیش از ۲۰ هزار جهش یافت شده در نمونه مورد بررسی بر اساس دستورالعمل کالج ژنتیک پزشکی آمریکا (ACMG) و طبقه‌بندی هر جهش به یکی از پنج دسته بیماری‌زا (Pathogenic)، احتمالاً بیماری‌زا (Likely Pathogenic)، با تاثیر نامشخص (Uncertain Significance, VUS)، احتمالاً غیر بیماری‌زا (Likely Benign) و غیر بیماری‌زا (Benign)

• تعیین بیماری‌های شناخته شده برای ژن‌های مربوط به هر جهش یافت شده بر اساس پایگاه داده بیماری‌های مندلین انسان (OMIM)

• آنالیز داده‌های توالی DNA اگزومی برای تعیین حذف و اضافه‌های بزرگ (CNV)

• تفسیر محل قرارگیری حذف و اضافه‌های بزرگ (CNV) نسبت به ژن‌ها و اگزون‌های آنها

• تفسیر تاثیر بالینی حذف و اضافه‌های بزرگ (CNV) یافت شده در نمونه مورد نظر توسط آزمایشگاه‌های معتبر دنیا بر اساس پایگاه داده ClinVar

• تفسیر حذف و اضافه‌های بزرگ (CNV) یافت شده در نمونه مورد بررسی بر اساس پایگاه داده ClinGen که شامل حذف و اضافه‌های بزرگ (CNV) گزارش شده در بیماران با عقب ماندگی ذهنی و رشدی، اوتیسم و سایر آنومالی‌های مادرزادی می‌باشد

• تعیین بیماری‌های شناخته شده برای ژن‌های مربوط به هر حذف و اضافه بزرگ (CNV) یافت شده بر اساس پایگاه داده بیماری‌های مندلی انسان (OMIM)

• تعیین جهش‌های کاندید عامل بیماری‌زایی در نمونه مورد بررسی بر اساس اعلام بالینی بیمار و با استفاده از بروزترین الگوریتم‌های فراگیری ماشینی (Machine Learning)

• گزارش یافته‌های ثانویه ۵۹ ژن با اهمیت بالینی بر اساس توصیه کالج ژنتیک پزشکی آمریکا (ACMG)

توجه: آزمایشگاه ساژن فقط جهش‌هایی را گزارش می‌دهد که معیارهای کیفی دقیق NGS را دارا باشند و جهش‌های یافت شده را به روش دیگری تایید نمی‌کند. توصیه می‌شود قبل از انجام هر گونه مداخله بالینی بر اساس نتایج آزمایش توالی‌یابی، برای تایید جهش یافت شده آزمایش تاییدی در یک آزمایشگاه مستقل انجام شود. تکنیک‌های تاییدی که توصیه به انجام آنها می‌شود شامل توالی‌یابی Sanger برای تغییرات نوکلئوتیدی کوچک و آزمایش‌های aCGH و MLPA برای حذف یا اضافه‌های بزرگ است.



- عدم تشخیص قطعی موزاییسم‌های با درصد پایین
- عدم تشخیص قطعی درج/حذف‌های بیش از 50bp
- عدم تشخیص قطعی واریانت‌های موجود در سودوژن‌ها
- حساسیت محدود برای یافتن واریانت‌هایی که توالی محل قرارگیری آن‌ها با مناطق سودوژن مشابهت بسیار دارند

- عدم تشخیص واریانت‌های پیچیده
- عدم تشخیص جابه‌جایی‌های متعادل
- عدم تشخیص واریانت‌های DNA میتوکندریایی
- عدم تشخیص اختلالات توالی‌های تکراری

توجه: اگر چه آزمایش myExome حذف و اضافه‌های بزرگ را که شامل چندین اگزون می‌شوند را در صورت درخواست گزارش می‌کند، با این حال این واریانت‌ها باید بسیار محتاطانه تفسیر شده و توسط aCGH یا MLPA تایید شوند.

یافته‌های ثانوی



کالج ژنتیک پزشکی آمریکا (ACMG) توصیه کرده است تا همزمان با توالی‌یابی کامل اگزوم و یا ژنوم، مجموعه‌ای از ۵۹ ژن نیز مورد بررسی قرار داده شوند. این ژن‌ها از لحاظ پزشکی، کاربردی بوده و دستورالعمل‌های بالینی و مدیریتی برای شرایط مرتبط با آن‌ها وجود دارد. فرد بیمار و یا والدین او می‌توانند گزارش یافته‌های ثانوی را درخواست نمایند. چنانچه واریانتی در این دسته از ژن‌ها به‌عنوان عامل بیماری‌زا یا احتمالاً بیماری‌زا شناسایی شود، به صورت "یافته‌های ثانویه" در صورت انتخاب حالت سوم آنالیز داده‌ها گزارش خواهد شد. بیماران و اعضای خانواده این حق را دارند تا در زمان درخواست انجام آزمایش انتخاب کنند که آیا می‌خواهند از این یافته‌های ثانویه مطلع شوند یا خیر.

اندیکاسیون جهت انجام آزمایش myExome



آزمایش myExome توسط پزشک متخصص درخواست داده می‌شود و باید با فرم رضایت‌نامه و اطلاعات بالینی دقیق همراه باشد. به‌طور کلی، زمانیکه سابقه پزشکی و یافته‌های بالینی حاکی از یک بیماری ژنتیکی باشد، انجام این آزمایش توصیه می‌شود. جهت کاهش هزینه انجام آزمایش myExome، معمولاً این آزمایش فقط برای بیمار اصلی انجام می‌شود ولی در صورت تمکن مالی خانواده بیمار، توصیه به انجام همزمان این آزمایش بر روی پدر و مادر بیمار و همچنین فرد مبتلای دیگر خانواده با بیماری مشابه با بیمار اصلی می‌شود. بدین وسیله شانس موفقیت در پیدا کردن جهش بیماری‌زا در خانواده بالاتر خواهد بود.

به‌طور معمول آزمایش myExome برای موارد زیر کاربرد دارد:

- بیمار یک اختلال ژنتیکی با تعدد ژن‌های بیماری‌زا دارد به این معنی که این بیماری می‌تواند توسط تعداد زیادی از ژن‌های مختلف ایجاد شود.
- بیمار یک اختلال ژنتیکی پیچیده و نامشخص با اختلالات بالینی متعدد دارد.
- بیمار یک اختلال ژنتیکی مشکوک دارد که برای تشخیص آن یک آزمایش ژنتیکی خاص در دسترس نیست.
- بیمار قبلاً آزمایشات متعدد ژنتیکی انجام داده است اما علت بیماری همچنان ناشناخته است.
- ارائه مشاوره ژنتیک برای زوج‌های سالمی که ارتباط فAMILIAL باهم دارند و می‌خواهند در مورد احتمال تولد کودک با بیماری ژنتیکی اطلاعات بیشتری کسب نمایند.

نمونه مورد آزمایش



- نمونه‌های مورد قبول برای آزمایش **myExome** عبارتند از نمونه DNA استخراج شده یا نمونه خون کامل.
- حداقل میزان DNA مورد نیاز ۵ میکروگرم می‌باشد که غلظت آن نباید کمتر از ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر باشد.
- توصیه ما ارسال حداقل ۴-۶ میلی‌لیتر نمونه خون کامل تازه جمع‌آوری شده با استفاده از کیت آزمایش **myExome** به جای DNA استخراج شده می‌باشد.
- استخراج DNA توسط آزمایشگاه سازن از نمونه خون کامل، احتمال عدم جوابدهی آزمایش را به‌طور قابل توجهی پایین می‌آورد.

روند درخواست آزمایش myExome



- انعقاد قرارداد با آزمایشگاه سازن و تکمیل فرم افتتاح حساب در پورتال سازن به آدرس www.sagene.ir
- تکمیل فرم درخواست آزمایش در پورتال سازن
- چاپ فرم تکمیل شده درخواست آزمایش از پورتال سازن و امضاء آن توسط بیمار و آزمایشگاه مربوطه
- جمع‌آوری نمونه خون وریدی با استفاده از کیت جمع‌آوری نمونه مربوط به آزمایش **myExome**
- ارسال نمونه خون به همراه فرم تکمیل شده درخواست آزمایش به آزمایشگاه سازن
- پرداخت هزینه آزمایش از طریق پورتال سازن
- دریافت نتیجه آزمایش بر اساس نوع آنالیز داده درخواستی از طریق پورتال سازن

مدت جوابدهی



جواب آزمایش **myExome** طی ۱۰ تا ۱۲ هفته در دسترس خواهد بود.



تهران، میدان آرژانتین، خیابان الوند،

بن بست برمک، پلاک ۷ طبقه ۳

۰۲۱-۸۸۶۶۲۸۵۳ ، ۰۲۱-۸۸۶۶۲۴۶۹

info@sagene.ir

www.sagene.ir

