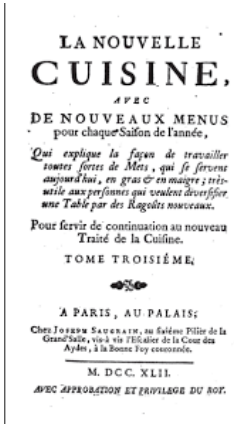
Next-generation Sequencing voor lipiden diagnostiek

Joep Defesche
Klinische Genetica
Academisch Medisch Centrum, Amsterdam

Nederlandse Lipiden Academie

Figi Zeist, 17 mei 2017


LA NOUVELLE
CUISINE,
AVEC
DE NOUVEAUX MENUS
pour chaque Saison de l'année,
Qui explique la façon de travailler toutes sortes de Mets, qui se servent aujourd'hui, en gras & en maigre; très-utile aux personnes qui veulent diversifier une Table par des Ragoûts nouveaux.
Pour servir de continuation au nouveau Traité de la Cuisine.
TOME TROISIÉME.
A PARIS, AU PALAIS;
Chez Joseph Saugrain, au sixiéme Pilier de la Grand'Salle, vis-à-vis l'Escalier de la Cour des Aydes, à la Bonne Foy couronnée.
M. DCC. XLII.
AVEC APPROBATION ET PRIVILEGE DU ROY.

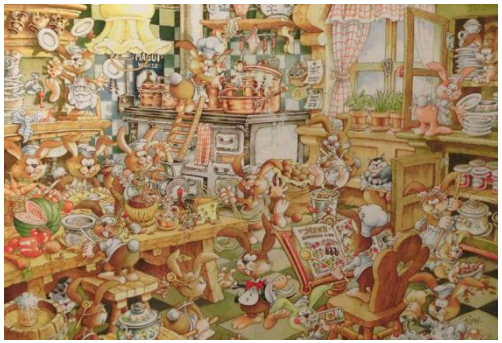
Nouvelle Cuisine

- reduce to the MAX
- zero excess

Next Generation Sequencing:

NGS

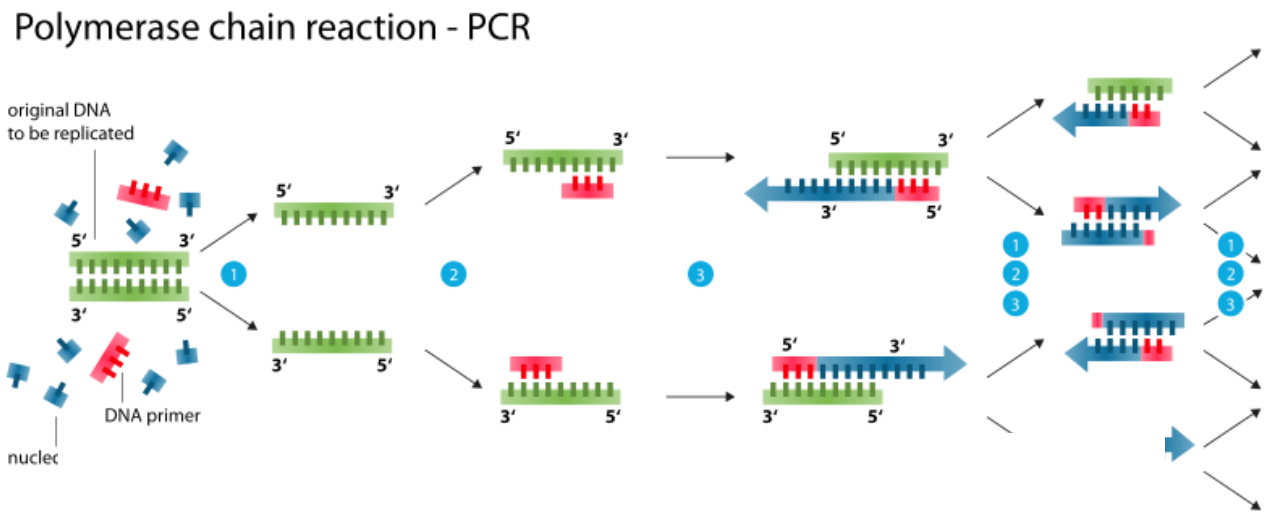
- reduce to the MAX
- maximal excess

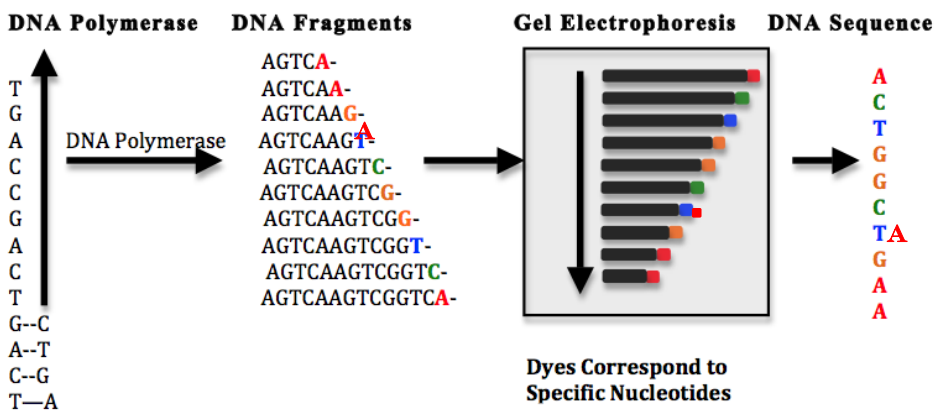


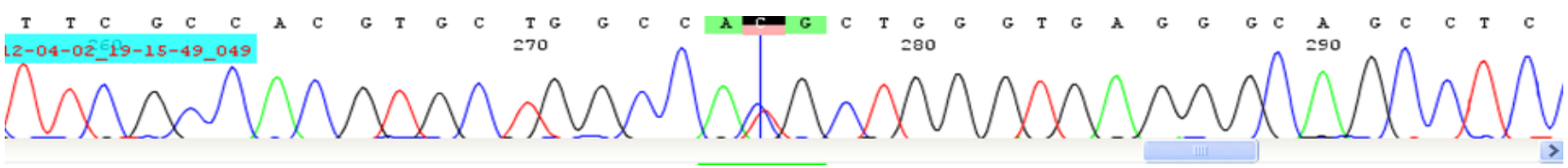
wat wil men in de diagnostiek?

- meer genen
- meer patiënten
- maximale nauwkeurigheid
- minimale kosten
- minimale turn-around-time
- minimale ruimte

gouden standaard: Sanger sequencing







NGS platforms

Method	Pyrosequencing (454)
Read length	700 bp
Reads per run	1 million
Time per run	24 hours
Cost per 1 million bases (in US$)	$10
Advantages	Long read size. Fast.
Disadvantages	Runs are expensive. Homopolymer errors.

2005: 454

2006: Solid

2011: Ion Torrent

2015: MiSeq

work flow NGS

- DNA fragmenteren
- library maken (barcodes)

week 1

- materiaal patiënten poolen
- hybridiseren (1)→ captures maken
- opzuiveren en verrijken (PCR)
- hybridiseren (2)
- opzuiveren

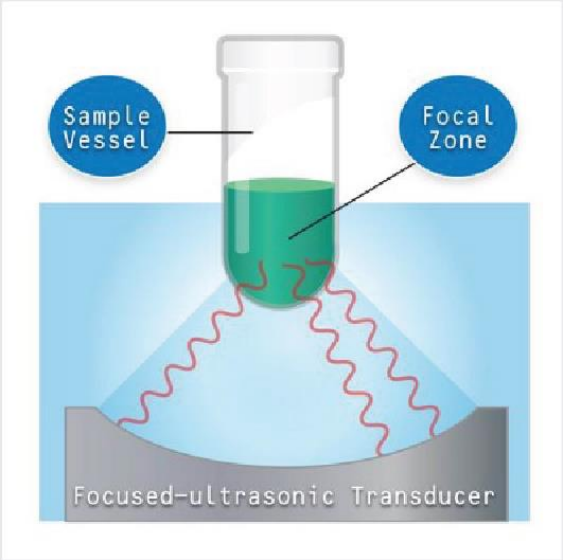
week 2

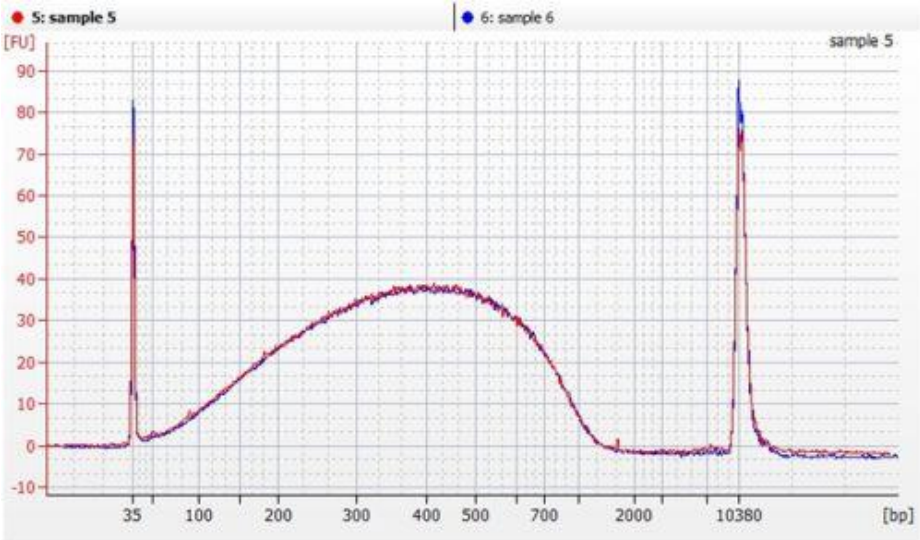
- sequencen MiSeq
- kwaliteitscontrole
- data analyse

week 3

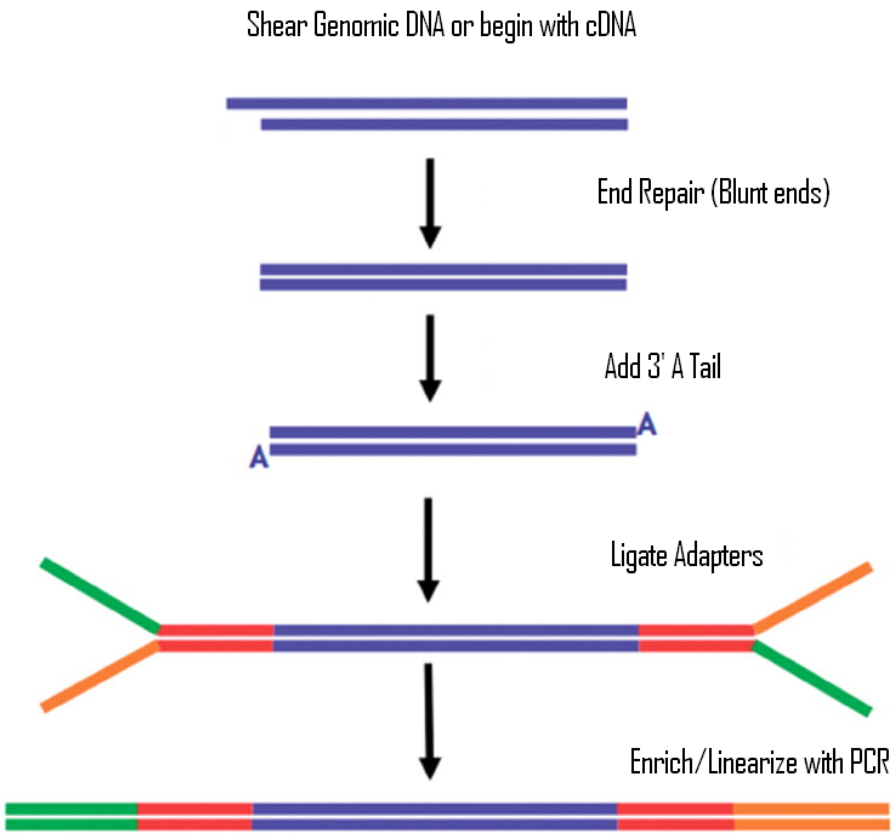
- validatie (Cartagenia)

Ultrasone fragmentatie DNA





library maken



TruSeq Universal Adapter

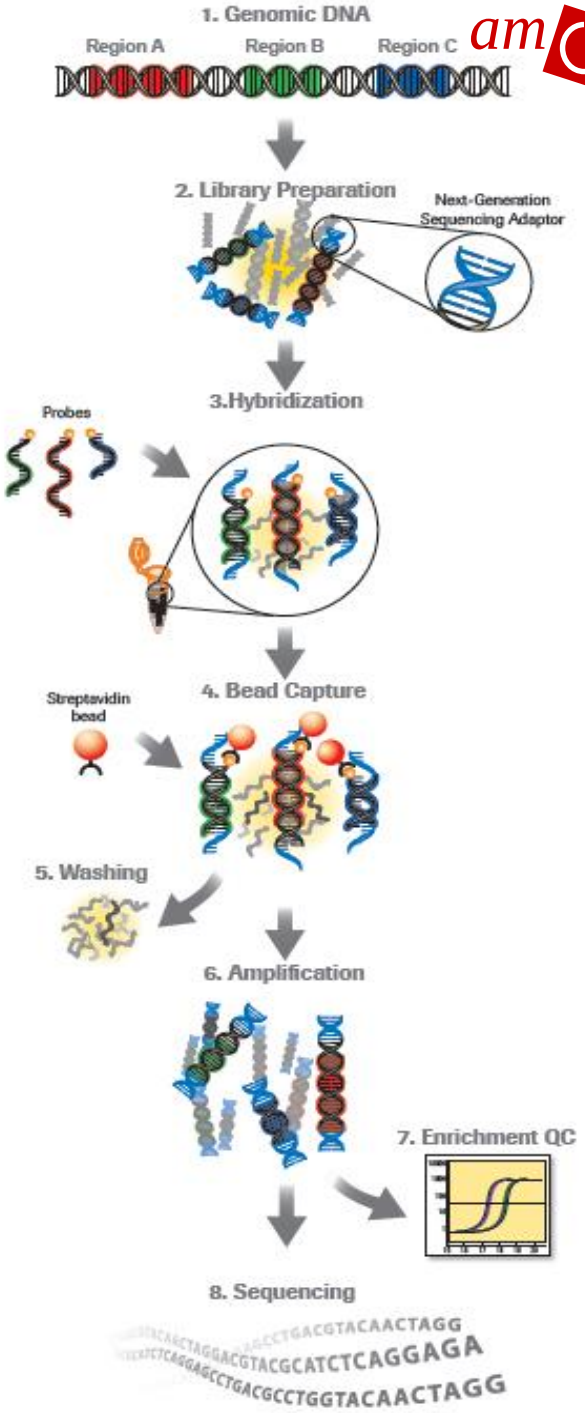
5′ AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

TruSeq Adapter, Index 1 [5] = barcode

5′ GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACATCACGATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG

captures maken

Nimblegen sequence capture
60-mer DNA probes



Next-generation Sequencing voor lipiden diagnostiek

captures maken

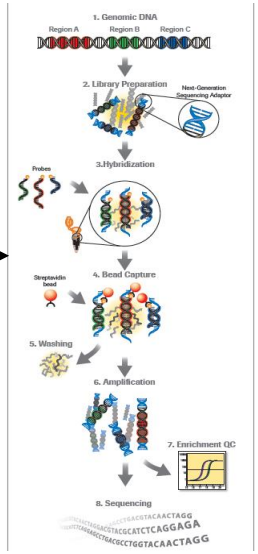
Library prep

Sample 1 → Index 1
Sample 2 → Index 2
Sample 3 → Index 3
Sample 4 → Index 4
Sample 5 → Index 5
Sample N → Index N

Sample prep

1 sample
(N Indexen)

Hybridizatie pool samples



LM-PCR

1 sample
(N Indexen)

Bioinformatica: barcode identificatie en mapping

Sample 1
Sample 2
Sample 3
Sample 4
Sample 5
Sample N

wat maakt Next Generation Sequencing next generation?

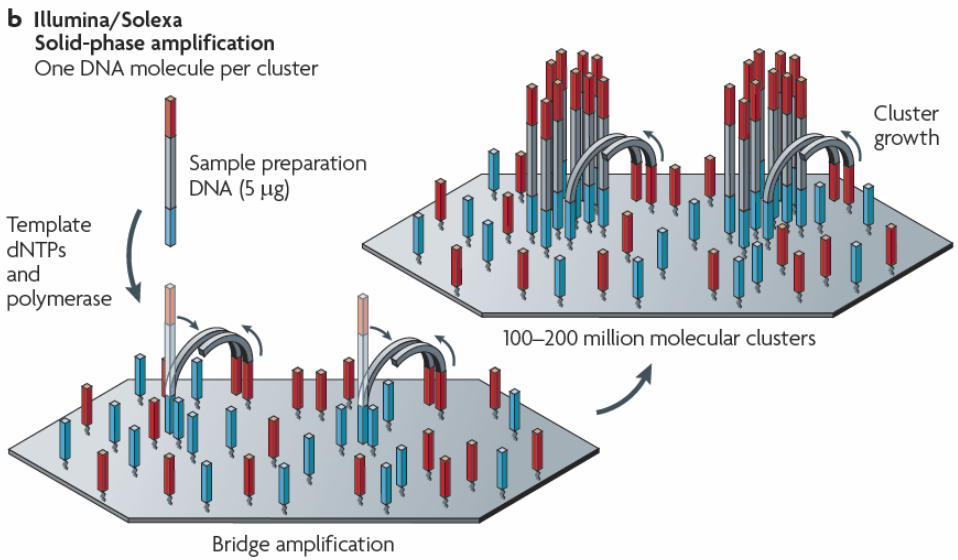
niet: het sequencing

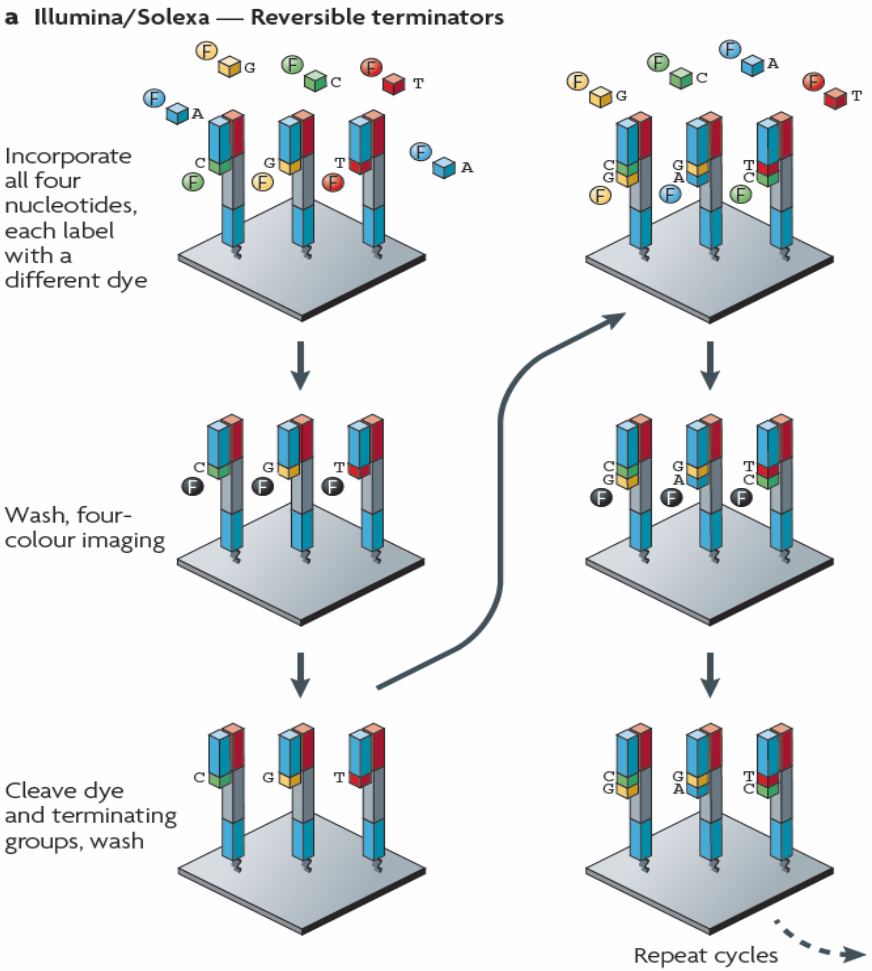
- combinatie van beproefde methoden
  Sanger-, pyro-, en solid phase-sequencing

wel: de mogelijkheid om een groot aantal DNA fragmenten per patiënt en per gen van elkaar te onderscheiden:

- unieke patiënt-specifieke barcodes
- adaptors
- linkers
- gen-specifieke captures

Illumina: Sequencing by synthesis





Illumina MiSeq

MISEQ REAGENT KIT	NO. OF READS	KIT SIZE (CYCLES)	OUTPUT (MAX.)	2 × 75 OUTPUT	2 × 150 OUTPUT	2 × 250 OUTPUT
MiSeq Reagent Kit v2	15 M	50, 300, 500	7.5 Gb	2.25 Gb	4.5 Gb	7.5 Gb

MISEQ REAGENT KIT	NO. OF READS	KIT SIZE (CYCLES)	OUTPUT (MAX.)	2 × 75 OUTPUT	2 × 300 OUTPUT
MiSeq Reagent Kit v3	25 M	150, 600	15 Gb	3.8 Gb	15 Gb

kwaliteitscontrole, data analyse, validatie

17D2191 voorbeeld - Microsoft Excel

MISEQUENCING	
NGS DNA nummer:	17D2191
Sanger DNA nummer:	17D2191
Familienummer:	FF159683
Geboortedatum:	9-8-1974
Geslacht:	vrouw
Experiment nummer (genesis):	22483
Diagnose:	FH
OID capture	OID43577
Samenvatting:	FF159683(17D2191 + 17D2191; 27250, vrouw, FH)
SEQUENCE RAPPORT	
Reads:	423979
% chimeric reads:	1%
Gemiddelde lengte gemapte forward:	145
% gemapte forward paired:	100%
Gemiddelde lengte gemapte reverse:	145
% gemapte reverse paired:	100%
Target (bp):	71461
Probes (bp):	144768
% unieke reads:	83%
% ontarget:	99%
Gemiddelde informatieve coverage:	**650**
Standaarddeviatie:	**139**

SNPCHECK

Primer	Gen	Chr.	Pos	DP	NGS	Sanger	SNPcheck	Paraaf staf
NGSSNP.E10	TNNT2	chr1	201334382	439	HET	HET	ok	JD
NGSSNP.E11	DES	chr2	220285666	457	WT	WT	ok	JD
NGSSNP.E09	SCN5A	chr3	38592406	416	HET	HET	ok	JD
NGSSNP.E05	CACNA1D	chr3	53700550	421	HOM	HOM	ok	JD
NGSSNP.E03	ANK2	chr4	114294308	439	WT	WT	ok	JD
NGSSNP.E12	DSP	chr6	7585967	449	WT	WT	ok	JD
NGSSNP.E02	AKAP9	chr7	91726927	477	HET	HET	ok	JD
NGSSNP.E19	VCL	chr10	75865065	444	HET	HET	ok	JD
NGSSNP.E01	ABCC9	chr12	22068849	430	HOM	HOM	ok	JD
NGSSNP.E18	TPM1	chr15	63351840	438	HOM	HOM	ok	JD

patient + Miseq info | low coverage | varianten | CNV calls | CNV excluded

17D2191 voorbeeld - Microsoft Excel

EXON+20 VARIANTEN

Gen	Chr.	g.Pos.	Zygosity	Effect	DP	Ref/Alt	Ref.	Alt.	EA ESP.	AA ESP	dnSNP138	1Kg 04-12
ABCA1	chr9	1,08E+08	HET	splicing	490	259,229	A	G	0,1266279	0,326601	0,31	0,48638225
ABCA1	chr9	1,08E+08		splicing	562	61,119,91	TA	T,TAAAA	N	N	N	N
ABCA1	chr9	1,08E+08	HET	missense	548	290,258	T	C	0,76046515	0,578315	0,59	0,2426237
ABCA1	chr9	1,08E+08	HET	synonymous	807	449,358	T	C	0,007674418	0,038752	0,03	0,10667272
ABCA1	chr9	1,08E+08	HET	missense	683	352,330	C	G	0,031744186	0,069173	0,05	0,1611439
ABCA1	chr9	1,08E+08	HET	missense	593	276,317	T	C	0,13418604	0,31423	0,37	0,46413985
ABCA1	chr9	1,08E+08	HET	missense	527	271,256	C	T	0,06267442	0,083764	0,13	0,017022245
ABCA1	chr9	1,08E+08	HET	synonymous	668	320,348	G	T	0,12604651	0,304301	0,35	0,4155697
ABCA1	chr9	1,08E+08	HET	splicing	618	318,300	G	A	0,065465115	0,138675	0,13	0,022015434
ABCA1	chr9	1,08E+08	HET	synonymous	715	360,355	G	A	0,10023256	0,098989	0,09	0,096459374
ABCA1	chr9	1,08E+08	HET	splicing	664	245,256	A	AT	0,06724013	.	N	0,17996246
ABCA1	chr9	1,08E+08	HET	missense	768	388,380	C	T	0,28139535	0,412974	0,42	0,6064457
ABCA1	chr9	1,08E+08	HET	synonymous	523	279,241	C	T	0,26523256	0,343576	0,35	0,43349975
ABCG8	chr2	44079606	HET	synonymous	535	271,263	G	A	0,04848837	0,050632	0,03	0,06377667
ABCG8	chr2	44104925	HOM	missense	647	0,645	T	C	0,78081393	.	0,89	0,94734454
ANGPTL3	chr1	63064436	HET	synonymous	557	301,256	T	C	0,000116306	0,001994	0,0018	0,000226963
APOA5	chr11	1,17E+08	HOM	5UTR	642	0,640	C	T	0,93133146	0,847996	0,84	0,8550659
APOB	chr2	21224853	HET	missense	746	400,344	C	T	0,039651163	0,024872	0,02	0,006808897
APOB	chr2	21225912	HET	missense	833	413,420	C	T	0,009186046	0,008729	0,01	0,001815705
APOB	chr2	21229609	HET	synonymous	967	502,464	C	T	0,009069768	0,007884	0,01	0,001815705
APOB	chr2	21231524	HOM	missense	887	2,885	G	A	0,21651162	0,268683	0,34	0,15751249
APOB	chr2	21232803	HOM	missense	885	0,885	T	C	0,9994186	0,977378	0,97	0,9468906
APOB	chr2	21235475	HOM	missense	850	0,850	T	C	0,9997674	0,999098	1	0,9995453
APOB	chr2	21250914	HOM	missense	553	4,548	G	A	0,4622093	0,42262	0,49	0,17680436
APOC3	chr11	1,17E+08	HOM	synonymous	688	1,687	T	C	0,7403399	0,700658	0,62	0,741254
APOE	chr19	45409167	HET	missense	518	269,249	C	G	N	0,623211	0,62	N
CETP	chr16	57015545	HET	splicing	496	242,252	C	T	0,35639533	0,017174	0,27	0,2679709
CETP	chr16	57016092	HOM	missense	494	0,494	G	A	0,68139535	0,574479	0,55	0,41469517
CYP7A1	chr8	59411042	HET	splicing	549	284,264	G	A	0,5909302	0,534507	0,51	0,42215163
GPIHBP1	chr8	1,44E+08	HET	synonymous	697	357,340	G	T	0,42535543	0,358687	0,38	0,23082256
LDLR	chr19	11210912	HET	synonymous	669	329,340	C	T	0,116976745	0,085271	0,06	0,039037675
LDLR	chr19	11221454	HOM	splicing	589	0,589	T	C	N	1	1	N
LDLR	chr19	11221457	HET	splicing	598	305,289	G	C	0,46139535	0,351373	0,28	0,09623241
LDLR	chr19	11224265	HET	synonymous	716	364,350	A	G	0,6161628	0,655266	0,65	0,73558784
LDLR	chr19	11227602	HET	synonymous	769	389,380	C	T	0,4504651	0,00022	0,28	0,11030413
LDLR	chr19	11230881	HET	synonymous	746	382,363	T	C	0,4526744	0,344068	0,33	0,197458
LDLR	chr19	11231101	HET	stopgain	741	384,357	C	A	N	.	N	N

patient + Miseq info | low coverage | varianten | CNV calls | CNV excluded

Gereed

17D2191 voorbeeld - Microsoft Excel

A39 | LDLR

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
39	LDLR	chr19	11231101	HET	stopgain	741	384,357	C	A	N	.	N	N
40	LDLR	chr19	11233941	HOM	synonymous	679	0,679	A	G	0,765	0,757863	0,79	0,6874716
41	LDLRAP1	chr1	25889632	HOM	missense	475	0,457	T	C	0,53315496	0,467818	0,46	0,3447571
42	LDLRAP1	chr1	25890189	HOM	synonymous	660	2,656	A	G	0,5551163	0,61711	0,59	0,7825692
43	LDLRAP1	chr1	25890247	HET	missense	673	350,322	C	T	0,049651165	0,03196	0,02	0,010213345
44	LIPA	chr10	90984990	HET	splicing	570	300,270	G	A	0,1961628	0,310123	0,35	0,10417613
45	LIPA	chr10	91007360	HET	missense	599	316,283	T	G	0,2983721	0,259046	0,27	0,12891512
46	LIPC	chr15	58834741	HET	synonymous	736	363,372	G	T	0,58795434	0,511302	0,45	0,56113136
47	LIPC	chr15	58838038	HOM	synonymous	706	2,702	C	G	0,5146785	0,379535	0,33	0,24520986
48	LIPC	chr15	58853079	HOM	missense	414	0,413	C	A	0,9853215	0,936843	0,93	0,8670164
49	LIPC	chr15	58853109	HOM	synonymous	472	5,467	A	G	0,9853215	0,934614	0,93	0,86747265
50	LIPG	chr18	47093864	HET	missense	683	348,335	C	T	0,29139534	0,239831	0,24	0,107353605
51	LPL	chr8	19805708	HET	missense	591	288,302	G	A	0,017674418	0,024341	0,01	0,045392647
52	MTTP	chr4	1E+08	HET	startloss	580	287,291	G	A	N	0,234613	0,22	N
53	MTTP	chr4	1E+08	HET	synonymous	506	247,259	C	G	0,03976744	0,06928	0,05	0,15978211
54	MTTP	chr4	1,01E+08	HET	missense	697	347,349	T	C	0,25790697	0,252109	0,22	0,27192184
55	MTTP	chr4	1,01E+08	HOM	synonymous	643	2,640	T	C	0,3638372	0,527724	0,51	0,7442125
56	MTTP	chr4	1,01E+08	HET	synonymous	491	248,243	T	C	0,035581395	0,029246	0,02	0,005901044
57	MTTP	chr4	1,01E+08	HOM	missense	589	1,587	C	G	0,3639535	0,999782	0,51	0,73468
58	MTTP	chr4	1,01E+08	HET	synonymous	703	371,332	C	A	0,039302327	0,067204	0,05	0,15524285
59	MTTP	chr4	1,01E+08	HET	synonymous	676	316,360	T	C	0,12418605	0,103058	0,07	0,08896959
60	MTTP	chr4	1,01E+08	HET	missense	568	292,276	A	C	0,039302327	0,071413	0,05	0,15501589
61	MTTP	chr4	1,01E+08	HET	splicing	624	344,280	C	T	0,039302327	0,047851	0,05	0,15478893
62	MTTP	chr4	1,01E+08	HET	missense	778	370,407	G	A	0,03546512	0,030137	0,02	0,005901044
63	MYLIP	chr6	16145325	HOM	missense	737	2,735	A	G	0,4760465	0,686678	0,74	0,8865184
64	PCSK9	chr1	55505732	HOM	splicing	624	0,624	A	G	0,9483863	0,905429	0,91	0,839684
65	PCSK9	chr1	55518316	HET	splicing	601	306,295	C	T	0,44465116	0,399793	0,38	0,4845665
66	PCSK9	chr1	55523033	HOM	synonymous	672	0,672	A	G	0,9997674	0,981146	0,99	0,9405356
67	PCSK9	chr1	55524197	HOM	synonymous	694	2,692	A	G	0,83348835	0,833903	0,86	0,7871085
68	PCSK9	chr1	55524237	HOM	missense	645	1,642	G	A	0,83348835	0,830302	0,85	0,7871085
69	PCSK9	chr1	55524339		splicing	399	4,71,119	CGTGTGTC	C,CGT	N	.	N	N
70	PCSK9	chr1	55529187	HET	missense	493	272,221	G	A	0,9646512	0,88328	0,9	0,7426237
71	SAR1B	chr5	1,34E+08	HET	splicing	542	113,222	AT	A	N	.	N	N
72	SCARB1	chr12	1,25E+08	HOM	synonymous	530	1,528	A	G	0,5172093	0,648887	0,67	0,8159328
73	SLCO1B1	chr12	21327652	HET	splicing	459	85,216	T	TA	N	.	N	N
74	SLCO1B1	chr12	21329738	HET	missense	586	297,289	A	G	0,40373397	0,578495	0,59	0,7651205
75	SLCO1B1	chr12	21331549	HET	missense	580	279,300	T	C	0,15534884	0,110414	0,12	0,036087155
76	SLCO1B1	chr12	21331625	HET	synonymous	543	269,274	C	T	0,39976743	0,452409	0,45	0,54493874
77	STAP1	chr4	68436883	HOM	splicing	566	0,566	T	C	0,904773	0,738384	0,72	0,777576
78	STAP1	chr4	68442968	HOM	synonymous	443	2,438	A	G	0,637093	0,498863	0,43	0,48365864

patient + Miseq info | low coverage | **varianten** | CNV calls | CNV excluded

Gereed

100%

14:53
10-5-2017

17D2191 voorbeeld - Microsoft Excel

A37 | LDLR

SLCO1B1	chr12	21331549	HET	missense	580	279,300	T	C	0,15534884	0,110414	0,12	0,036087155
SLCO1B1	chr12	21331625	HET	synonymous	543	269,274	C	T	0,39976743	0,452409	0,45	0,54493874
STAP1	chr4	68436883	HOM	splicing	566	0,566	T	C	0,904773	0,738384	0,72	0,777576
STAP1	chr4	68442968	HOM	synonymous	443	2,438	A	G	0,637093	0,498863	0,43	0,48365864
STAP1	chr4	68447040	HET	synonymous	544	285,257	C	T	0,2667442	0,188734	0,14	0,14162506
STAP1	chr4	68447200	HET	splicing	615	291,324	A	G	0,32651162	0,276474	0,27	0,31820247

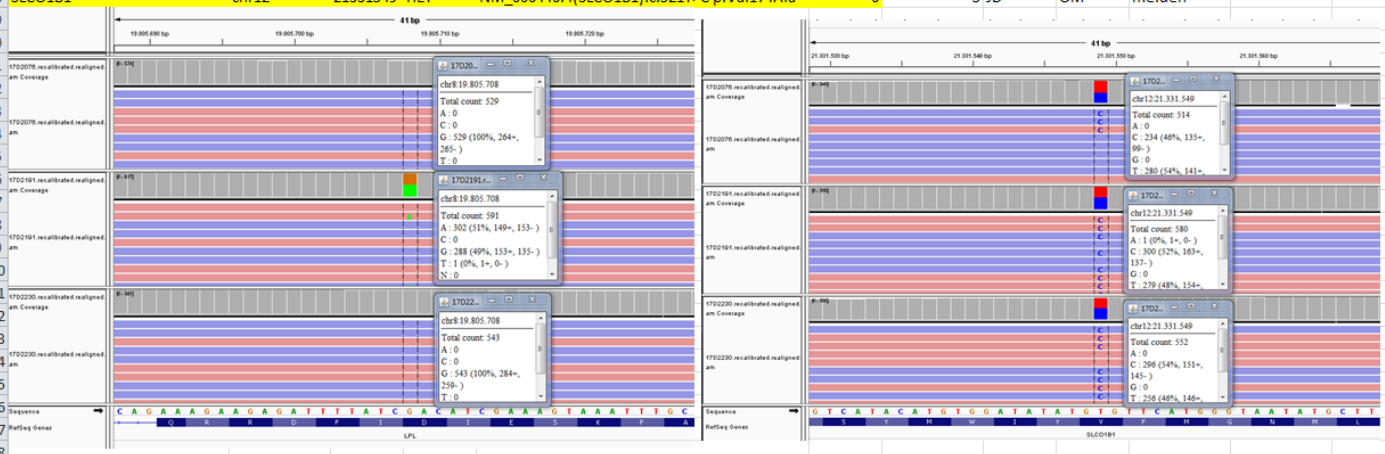
Paraaf Staf:

Eerste beoordeling Cartagenia: AW

FH bevestigd JD

VARIANTEN IN BRIEF NIET BEVESTIGEN

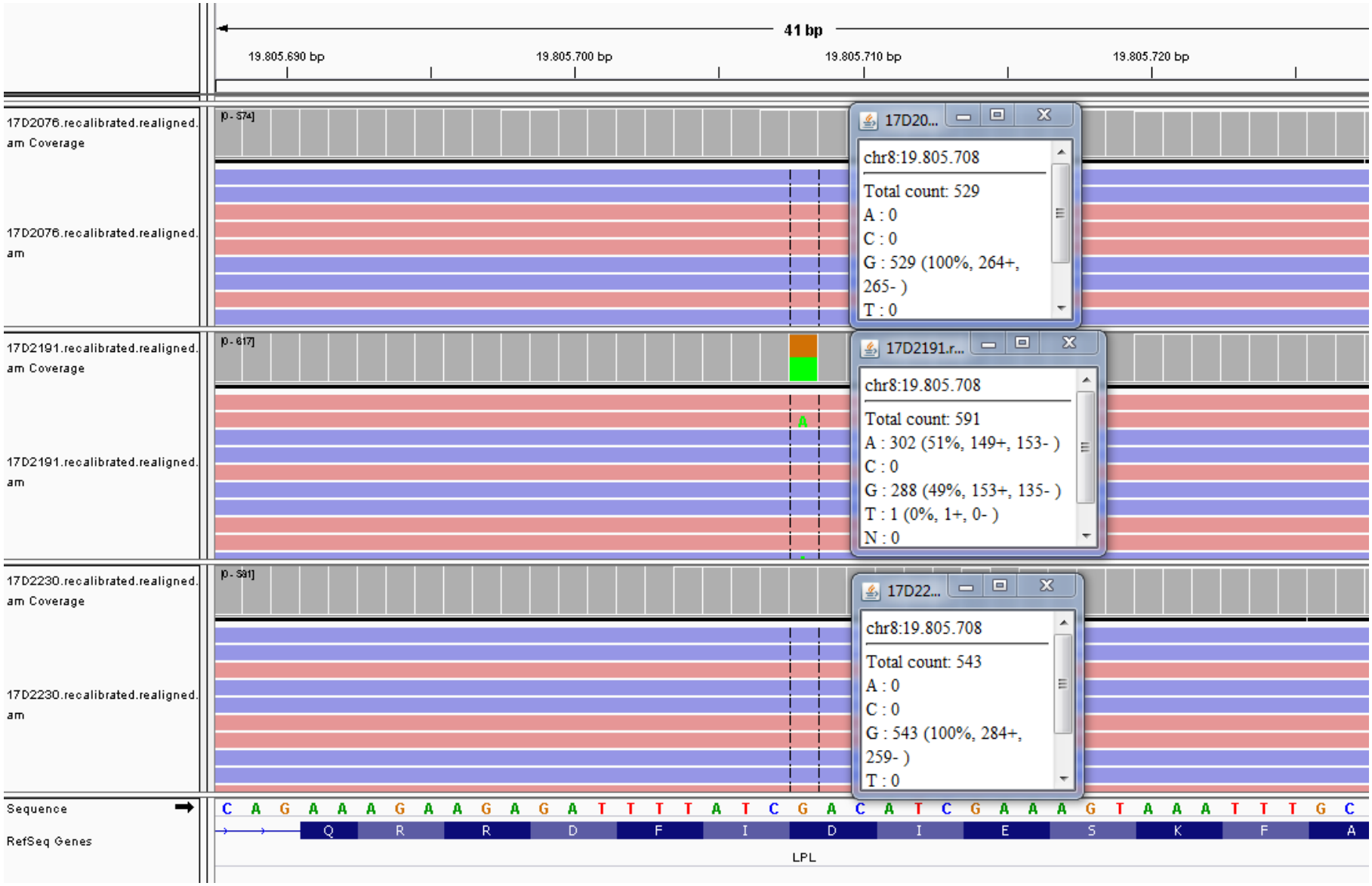
Gen	Chr.	g.Pos.	Zygosity	Mutatie	Exon	Klassificatie	Paraaf sta	Paraaf NGS-connaisseur.	
LPL	chr8	19805708	HET	NM_000237.2(LPL):c.106G>A; p.Asp36Asn	2	5	JD	OM	melden
LDLR	chr19	11231101	HET	NM_000527.4(LDLR):c.2043C>A; p.Cys681*	14	5	JD	OM	melden
SLCO1B1	chr12	21331549	HET	NM_006446.4(SLCO1B1):c.521T>C p.Val174Ala	6	5	JD	OM	melden



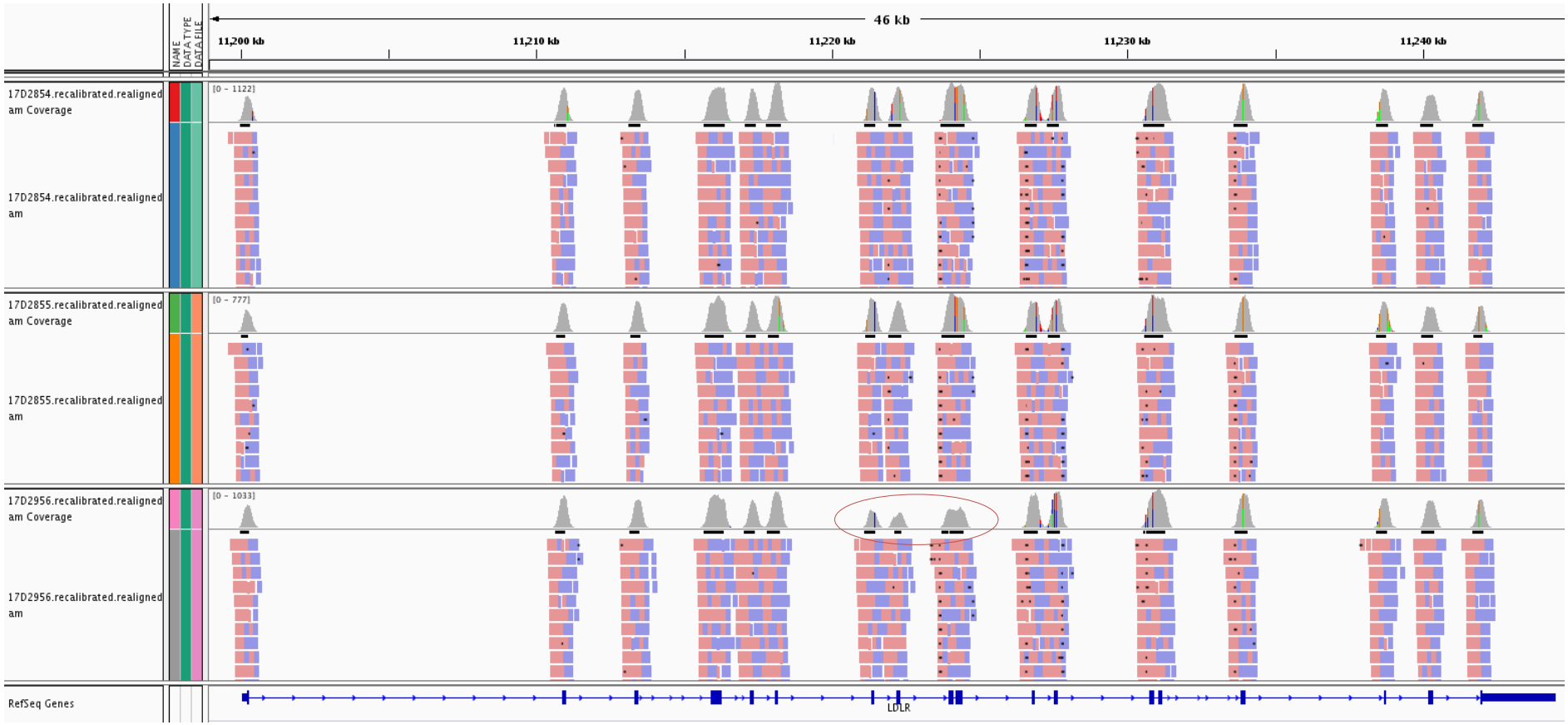
patient + Miseq info | low coverage | varianten | CNV calls | CNV excluded

Gereed | Gemiddelde: 1871395,307 | Aantal: 13 | Som: 11228371,84 | 100%

14:51 10-5-2017


41 bp
19.805.690 bp
19.805.700 bp
19.805.710 bp
19.805.720 bp
17D2076.recalibrated.realigned.bam Coverage
17D2076.recalibrated.realigned.bam
17D20...
chr8:19.805.708
Total count: 529
A : 0
C : 0
G : 529 (100%, 264+, 265-)
T : 0
17D2191.recalibrated.realigned.bam Coverage
17D2191.recalibrated.realigned.bam
17D2191.r...
chr8:19.805.708
Total count: 591
A : 302 (51%, 149+, 153-)
C : 0
G : 288 (49%, 153+, 135-)
T : 1 (0%, 1+, 0-)
N : 0
17D2230.recalibrated.realigned.bam Coverage
17D2230.recalibrated.realigned.bam
17D22...
chr8:19.805.708
Total count: 543
A : 0
C : 0
G : 543 (100%, 284+, 259-)
T : 0
Sequence
C A G A A A G A A G A G A T T T T A T C G A C A T C G A A A G T A A A T T T G C
RefSeq Genes
Q R R D F I D I E S K F A
LPL

CNV CALLS						
17D2956	Z-score	Gen	Freq	Mean	Std	
chr19:11221308-11221467	-6,9	LDLR	12/1651	OK	OK	NM_000527 LDLR E7-10 del
chr19:11222170-11222335	-10,1	LDLR	9/1651	OK	OK	NM_000527 LDLR E7-10 del
chr19:11223934-11224145	-7,5	LDLR	8/1651	OK	OK	NM_000527 LDLR E7-10 del
chr19:11224191-11224458	-7,6	LDLR	9/1651	OK	OK	NM_000527 LDLR E7-10 del



deletie exon 7, 8, 9 en 10

Bench Lab NGS | AMC Intranet - Intranet

Veilig | https://amc.ngs.cartagenia.com/patient/analysis/view.html?analysisid=11637#genotype

A new version of Bench Lab NGS has been deployed on your server. Please read the Release Notes to familiarize yourself with the changes introduced by this patch/release. Read later | I have read the Release Notes, don't show again

Agilent Technologies | Bench Lab NGS

Joep Defesche

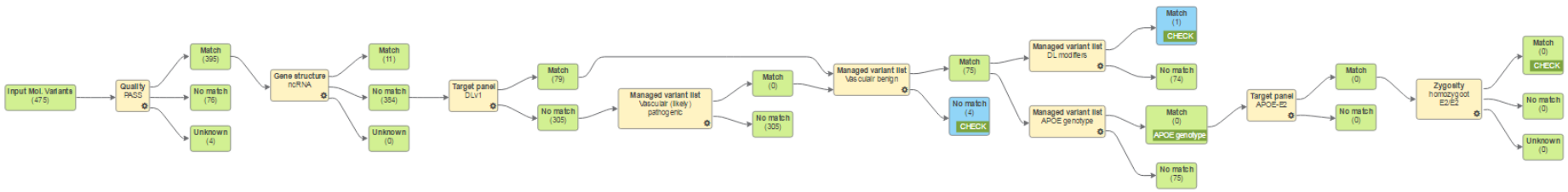
Upload Files | Patients | Analyses | Gene Profiles | MVL | Search | Help

Patient: P_17D2191 > Analysis: A_17D2191

Request Sign-off

General | Variant triage | Variant review | Reports

Triage & Classify - DLv1.4



Variant List: 475 variants (total) ▸ 5 variants (2 classification tree bins) | Search | Show warning list | Export | Summary | Filter

CHECK

APOE genotype | CHECK

	Gene	Position	Ref	Patient	Read Depth	Type	Transcript	cDNA	Location	Exon	Effect	Protein	Labels	Classification	References	MVL APOE	MVL DL m	MVL Vasc	MVL Other	Simil.	Info	Assessme
	ANGPTL3	1:63,064,436	T	T C	557	snp	NM_014495.3	c.565T>C	exonic	2	synonymous	p.=	CHECK									
	DOCK7	1:63,064,436	T	T C	557	snp	NM_001271999.1	c.1683-12141A>G	intronic	15			CHECK									
	LPL	8:19,805,708	G	G A	591	snp	NM_000237.2	c.106G>A	exonic	2	nonsynonymous	p.Asp36Asn	CHECK									
	SLCO1B1	12:21,331,549	T	T C	580	snp	NM_006446.4	c.521T>C	exonic	6	nonsynonymous	p.Val174Ala	CHECK									
	LDLR	19:11,231,101	C	C A	741	snp	NM_000527.4	c.2043C>A	exonic	14	stopgain	p.Cys681*	CHECK									

Copyright © 2017, Agilent Technologies - v4.3.5(46df53a)

14:38 10-5-2017

gen panel voor Dyslipidemie

gen panel voor dyslipidemie					
fenotype	gen	cDNA	exonen	intron seq.	overerving
hypercholesterolemie	LDLR	2583	18	4171	dominant
	APOB	13692	29	8700	dominant
	PCSK9	2079	12	3600	dominant
	LIPA	1200	10	3000	recessief
	LDLRAP1	927	9	2700	recessief
	ABCG5	1956	13	3900	recessief
	ABCG8	2022	13	3900	recessief
	STAP1	888	9	2700	dominant
hypo-alfalipoproteinemie	ABCA1	6786	50	15000	dominant
	LCAT	1323	6	1800	dominant
	APOA1	804	4	1200	dominant
hyper-alfalipoproteinemie	SCARB1	1530	13	3900	dominant
	CETP	1482	16	4800	dominant
	LIPG (EL)	1503	10	3000	dominant
	LIPC (HL)	1500	9	2700	dominant
	APOC3	300	3	900	dominant
hypertriglyceridemie	LPL	1428	10	3000	dominant
	APOC2	306	4	1200	dominant
	APOA5	1101	4	1200	dominant
	GPI-HBP1	555	4	1200	dominant
	LMF1	1704	11	3300	dominant
	APOE	954	4	1200	dominant / recessief
chylomicron retention disease	SAR1B	597	8	2400	recessief
hypocholesterolemie	ANGPTL3	1383	7	2100	dominant
	MTTP	2685	19	5700	dominant
	IDOL (MYLIP)	1338	7	2100	dominant
	APOB				dominant
	PCSK9				dominant
cerebrotendineuze xanthomatose	CYP27A1	1596	9	2700	recessief
statine resistentie	CYP7A1	1515	6	1800	recessief
myopathie op statines	SLCO1B1	2076	15	4500	dominant
		57813	332	98371	
totaal				156516	

rapportage

- indicatie: hypercholesterolemie, hypertriglyceridemie, familiaire mutatie etc.
- uitgevoerd onderzoek: meestal NGS dyslipidemie panel 29 genen
- uitslag: wel of geen mutatie gevonden op basis van indicatie
- aanvullende bevindingen: mutaties niet in relatie tot indicatie
- toelichting methode en kwaliteit

aanvullende bevindingen

niet gerapporteerd:

- varianten met onduidelijke klinische relevantie
- dragerschap mutaties recessieve aandoeningen

bijvoorbeeld: LIPA, CYP27A1, ABCG5/G8, CYP7A1

wel gerapporteerd:

- klinisch relevante varianten m.b.t. gezondheidsrisico en behandeling
- vaak: hypertriglyceridemie, laag HDL, statine intolerantie
- waar mogelijk literatuurverwijzingen

rapportage

Opmerkingen

Er zijn geen aanwijzingen voor pathogene mutaties in de resterende met dyslipidemie geassocieerde genen met NextGen sequentie en CNV analyse.
Alle coderende exonen van de 29 in de toelichting genoemde genen, inclusief de 20 flankerende intron nucleotiden, zijn geanalyseerd met sequentie analyse. Met deze techniek kunnen puntmutaties en kleine deleties of inserties worden gedetecteerd.
Er is CNV analyse gedaan om exon deleties of duplicaties te kunnen identificeren.
De aanwezigheid van mutaties buiten de geanalyseerde fragmenten kan echter niet worden uitgesloten.
Alleen pathogene mutaties worden gerapporteerd. Mutaties waarvan de klinische relevantie niet duidelijk is worden niet gemeld.

Toelichting

Methode en kwaliteit:

Apparaat: MiSeq
Experiment nr: DL_046-22483 (experiment in Genesis)
Chemie: MiSeq Reagent Kit v2, 2 x 150 bp
Analyse programma s: BWA-MEM(0.7.5), GenomeAnalysisTK-2.8 Haplotype Caller, Cartagenia v4.2.3.
Verrijking target sequenties: Nimblegen SeqCap easy choice (OID42813) van versie DLv2.
Minimale coverage (met minimaal MAPQ20 en BaseQ20) van 30 reads
Gemiddelde verticale coverage (met minimaal MAPQ20 en minimaal BaseQ20): 650 ± 139,
Sanger sequencing is gebruikt voor bevestigingen van gevonden mutaties en analyse van gebieden met coverage lager dan 30 reads.
Op grond van validatie experimenten schatten wij de gevoeligheid van de gecombineerde test (NextGen en Sanger) voor nucleotide substituties en deleties, inserties en duplicaties tot 68 nucleotiden op >99% (100% in onze validatie).

Next Generation Sequencing met Illumima/MiSeq Dyslipidemie pakket

samenvatting

- veel genen, veel patiënten
- lange hands-on tijd: 3 weken
- controle, sequencing en analyse: >1 week
- snp check
- 100% coverage; niet bij-Sangeren
- inclusief CNV analyse (deleties, duplicaties)
- geen bevestiging
- analyse: op geleide van fenotype?
- kosten: 3x basis tarief