



Original

Implementación de un panel de genes para el diagnóstico genético de la discinesia ciliar primaria



Noelia Baz-Redón^{a,b,1}, Sandra Rovira-Amigo^{a,b,c,1}, Ida Paramonov^{a,d}, Silvia Castillo-Corullón^e, María Cols Roig^f, María Antolín^{a,d}, Elena García Arumí^{a,d,g}, Alba Torrent-Vernetta^{a,b,c}, Inés de Mir Messa^{a,c}, Silvia Gartner^{a,c}, Ignacio Iglesias Serrano^{a,c}, M. Araceli Caballero-Rabasco^h, Óscar Asensio de la Cruzⁱ, Gerardo Vizmanos-Lamotte^j, Carlos Martín de Vicente^k, María del Mar Martínez-Colls^l, Ana Reula^m, Amparo Escribano^{e,n}, Francisco Dasí^{n,o}, Miguel Armengot-Carceller^{m,p,q}, Eva Polverino^{a,r}, Esther Amengual Pieras^s, Rosanel Amaro-Rodríguez^t, Marta Garrido-Pontnou^u, Eduardo Tizzano^{a,d}, úria Camats-Tarruella^{a,g,2}, Mónica Fernández-Cancio^{a,g,2} y Antonio Moreno-Galdó^{a,b,c,g,*,2}

^a Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España

^b Departamento de Pediatría, Obstetricia, Ginecología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

^c Sección de Alergología Pediátrica, Neumología Pediátrica y Fibrosis Quística, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España

^d Área de Genética Clínica y Molecular, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España

^e Unidad de Neumología Pediátrica, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Universidad de Valencia, Valencia, España

^f Sección de Neumología Infantil y Unidad de Fibrosis Quística, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, España

^g CIBER de Enfermedades raras, CIBERER, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, España

^h Unidad de Neumología Pediátrica, Hospital del Mar, Barcelona, España

ⁱ Unidad de Neumología Pediátrica, Hospital Parc Taulí, Sabadell, Barcelona, España

^j Servicio de Pediatría, Pôle Pédiatrique de Cerdagne - ALEPPA, Osséja, Francia

^k Unidad de Neumología Pediátrica, Hospital Miguel Servet, Zaragoza, España

^l Unidad de Neumología Pediátrica, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, España

^m Grupo de Biomedicina Molecular, Celular y Genómica, IIS La Fe, Universidad de Valencia, Valencia, España

ⁿ Departamento de Fisiología, Universidad de Valencia, Valencia, España

^o UCIM, Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, Valencia, España

^p Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, España

^q CIBER de Enfermedades Respiratorias, CIBERES, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, España

^r Servicio de Neumología, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España

^s Hospital de Son Llàtzer, Palma de Mallorca, Baleares, España

^t Servicio de Neumología, Hospital Clínic, Barcelona, España

^u Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 12 de enero de 2020

Aceptado el 18 de febrero de 2020

On-line el 3 de abril de 2020

Palabras clave:

Discinesia ciliar primaria

Secuenciación masiva

Panel de genes

Videomicroscopía óptica de alta velocidad

Microscopía electrónica

RESUMEN

Introducción: La discinesia ciliar primaria (DCP) es una enfermedad caracterizada por una alteración en la estructura ciliar que impide el correcto aclaramiento de las secreciones respiratorias. Su diagnóstico es complejo y se basa en una combinación de técnicas. El objetivo de este estudio fue diseñar un panel de genes incluyendo todos los genes causantes conocidos y comprobar su utilidad diagnóstica en una cohorte de pacientes españoles.

Métodos: Estudio transversal multicéntrico de pacientes con sospecha elevada de DCP, aplicando los criterios de la European Respiratory Society. Diseño de un panel de genes para secuenciación masiva con la tecnología de captura SeqCap EZ technology, incluyendo 44 genes relacionados con la DCP.

Resultados: Se incluyó a 79 pacientes de los que 53 presentaron un diagnóstico de DCP confirmado o muy probable. La sensibilidad del panel de genes fue del 81,1% con una especificidad del 100%. Se encontraron

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: amoreno@vhebron.net (A. Moreno-Galdó).

¹ Estos autores deben considerarse primer autor de forma conjunta.

² Estos autores deben considerarse autores seniors de forma conjunta.

<https://doi.org/10.1016/j.arbres.2020.02.010>

0300-2896/© 2020 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

variantes candidatas en alguno de los genes del panel en 43 de los pacientes con DCP, siendo 51,2% (22/43) homocigotos y 48,8% (21/43) heterocigotos compuestos. Los genes causales más frecuentes fueron *DNAH5* y *CCDC39*. Encontramos 52 variantes distintas, 36 no descritas previamente en la literatura.

Conclusiones: El diseño y la implementación de un panel de genes a medida tiene un alto rendimiento diagnóstico genético de la DCP, lo que permite conocer mejor la afectación causal de estos pacientes y sentar las bases para futuros abordajes terapéuticos.

© 2020 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Implementation of a Gene Panel for Genetic Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia

A B S T R A C T

Keywords:

Primary ciliary dyskinesia
Massive sequencing
Gene panel
High-speed optical video microscopy
Electron microscopy

Introduction: Primary ciliary dyskinesia (PCD) is characterized by an alteration in the ciliary structure causing difficulty in the clearance of respiratory secretions. Diagnosis is complex and based on a combination of techniques. The objective of this study was to design a gene panel including all known causative genes, and to corroborate their diagnostic utility in a cohort of Spanish patients.

Methods: This was a multicenter cross-sectional study of patients with a high suspicion of PCD, according to European Respiratory Society criteria, designed around a gene panel for massive sequencing using SeqCap EZ capture technology that included 44 genes associated with PCD.

Results: We included 79 patients, 53 of whom had a diagnosis of confirmed or highly probable PCD. The sensitivity of the gene panel was 81.1%, with a specificity of 100%. Candidate variants were found in some of the genes of the panel in 43 patients with PCD, 51.2% (22/43) of whom were homozygotes and 48.8% (21/43) compound heterozygotes. The most common causative genes were *DNAH5* and *CCDC39*. We found 52 different variants, 36 of which were not previously described in the literature.

Conclusions: The design and implementation of a tailored gene panel produces a high yield in the genetic diagnosis of PCD. This panel provides a better understanding of the causative factors involved in these patients and lays down the groundwork for future therapeutic approaches.

© 2020 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La discinesia ciliar primaria (DCP) es una enfermedad rara (1/15.000 recién nacidos) caracterizada por una alteración en la estructura y función ciliar que impide el correcto aclaramiento de las secreciones respiratorias^{1,2}. Sus manifestaciones clínicas incluyen tos productiva, rinitis crónica, otitis de repetición, bronquitis recurrentes, bronquiectasias³, infertilidad masculina, subfertilidad femenina y *situs inversus* (50%)^{1,2} o heterotaxia (6-12%)⁴.

Aunque los síntomas son característicos, algunos de ellos son similares a los de otras enfermedades respiratorias, de manera que, el diagnóstico de DCP es complicado de realizar y se basa en una combinación de diferentes pruebas. La European Respiratory Society (ERS)⁵ y la American Thoracic Society (ATS)⁶ han realizado recomendaciones diagnósticas con enfoques y algoritmos diferentes. Así, un valor disminuido de óxido nítrico nasal (NO_n), se considera en las recomendaciones de la ERS una prueba de cribado, mientras que la ATS estima que puede ser diagnóstico, siempre que se mida con un aparato de quimioluminiscencia en pacientes de 5 años o más y se haya descartado la fibrosis quística⁶.

La videomicroscopía de alta velocidad (HSVM, *high speed video-microscopy*), que analiza la frecuencia y el patrón del batido ciliar, tiene una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico, aunque su interpretación tiene un componente de subjetividad y se puede ver alterada por las infecciones respiratorias⁷. La ERS la considera una técnica cuyo resultado alterado es altamente sospechoso del diagnóstico de DCP⁵, pero la ATS no la incluye en su algoritmo más que como una prueba de ayuda⁶. El estudio de las proteínas ciliares por inmunofluorescencia es una técnica prometedora^{8,9}, aunque no se incluye todavía en las recomendaciones diagnósticas^{5,6}.

Actualmente, la presencia de alteraciones en el estudio con microscopía electrónica (ME) (defectos de brazos externos, defectos de brazos externos e internos, defectos de brazos internos con desorganización microtubular y ausencia del par central) y el hallazgo de variantes patogénicas en el estudio genético se consideran indicadores confirmatorios de DCP^{5,6}. Mientras que la ME es una técnica compleja y da lugar a numerosos falsos positivos y negativos⁵, la realización de estudios genéticos mediante secuenciación masiva está permitiendo realizar nuevas aproximaciones con mayor rentabilidad diagnóstica.

La DCP es una enfermedad causada por variantes en distintos genes que codifican proteínas del axonema ciliar. La mayoría de los genes asociados a DCP son autosómicos con herencia recesiva, a excepción de *PIH1D3*, descrito recientemente y ligado al cromosoma X¹⁰, y 2 genes que causan DCP sindrómica: *RPGR*, ligada al cromosoma X, cuyas mutaciones dan lugar a DCP y retinitis pigmentaria¹¹, y *OFD1* cuyas mutaciones causan DCP y discapacidad intelectual¹². Actualmente, se han descrito algo más de 40 genes asociados a DCP que permiten definir el diagnóstico molecular de aproximadamente 70% de los pacientes¹³.

El objetivo de este estudio es el diseño de un panel de secuenciación masiva que incluya todos los genes causantes de DCP conocidos hasta el momento y comprobar su utilidad diagnóstica en una cohorte de pacientes con sospecha clínica de DCP.

Métodos

Pacientes

Se ha realizado un estudio transversal multicéntrico de una cohorte de pacientes remitidos a los centros diagnósticos de DCP del Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona) y del grupo de

Tabla 1
Listado de genes incluidos en el panel para estudio de la discinesia ciliar primaria

Nombre del gen	ID del gen	ID del transcrito	ID de proteína	Número de exones
ARMC4	NG.042820.1	NM.018076.3	NP.060546.2	29
C21orf59/CFAP298	NG.033839.2	NM.021254.2	NP.067077.1	7
CCDC11/CFAP53	NG.042815.1	NM.145020.3	NP.659457.2	8
CCDC39	NG.029581.1	NM.181426.1	NP.852091.1	20
CCDC40	NG.029761.1	NM.017950.3	NP.060420.2	26
CCDC65	NG.033837.1	NM.033124.4	NP.149115.2	8
CCDC103	NG.032792.1	NM.213607.2	NP.998772.1	4
CCDC114	NG.033251.1	NM.144577.3	NP.653178.3	19
CCDC151	NG.041777.1	NM.145045.4	NP.659482.3	14
CCDC164/DRC1	NG.042824.1	NM.145038.3	NP.659475.2	17
CCNO	NG.034201.1	NM.021147.4	NP.066970.3	3
DNAAF1	NG.021174.1	NM.178452.4	NP.848547.4	15
DNAAF2	NG.013070.1	NM.018139.2	NP.060609.2	3
DNAAF3	NG.032759.1	NM.001256714.1	NP.001243643.1	12
DNAAF5	NG.033137.1	NM.017802.3	NP.060272.3	13
DNAH1	NG.052911.1	NM.015512.4	NP.056327.4	81
DNAH5	NG.013081.1	NM.001369.2	NP.001360.1	86
DNAH6	NG.050957.1	NM.001370.1	NP.001361.1	81
DNAH7	NC.000002.12	NM.018897.2		69
DNAH8	NG.041805.1	NM.001206927.1	NP.001193856.1	97
DNAH9	NG.047047.1	NM.001372.3	NP.001363.2	73
DNAH11	NG.012886.2	NM.001277115.1	NP.001264044.1	82
DNAI1	NG.008127.1	NM.012144.3	NP.036276.1	24
DNAI2	NG.016865.1	NM.023036.4	NP.075462.3	17
DNAL1	NG.028083.1	NM.031427.3	NP.113615.2	10
DNAL11	NC.000001.11	NM.003462.3	NP.003453.3	6
DYX1C1/DNAAF4	NG.021213.1	NM.130810.3	NP.570722.2	11
EPB41L4A	NG.052950.1	NM.022140.3	NP.071423.4	26
GAS8	NG.046598.1	NM.001481.2	NP.001472.1	15
HYDIN	NG.033116.2	NM.001270974.1	NP.001257903.1	92
LRRRC6	NG.033068.1	NM.012472.4	NP.036604.2	17
MCIDAS	NG.051620.1	NM.001190787.1	NP.001177716.1	7
MNS1	NC.000015.10	NM.018365.2	NP.060835.1	10
NME8	NG.015893.1	NM.016616.4	NP.057700.3	18
OFD1	NG.008872.1	NM.003611.2	NP.003602.1	27
RPGR	NG.009553.1	NM.000328.2	NP.000319.1	18
RSPH1	NG.034257.1	NM.080860.3	NP.543136.1	9
RSPH3	NG.051819.1	NM.031924.4	NP.114130.3	11
RSPH4A	NG.012934.1	NM.001010892.2	NP.001010892.1	7
RSPH9	NG.023436.1	NM.152732.4	NP.689945.2	7
SPAG1	NG.033834.1	NM.172218.2	NP.757367.1	21
TEKT1	NC.000017.11	NM.053285.1	NP.444515.1	8
TTC25	NG.053115.1	NM.031421.3	NP.113609.1	13
ZMYND10	NG.042828.1	NM.015896.2	NP.056980.2	12

Los datos de ID se han obtenido de la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
ID: identificación.

DCP de Valencia para su valoración por tener una historia clínica indicativa de DCP.

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de los hospitales participantes y se solicitó para su inclusión la autorización de los padres o tutores legales para los niños menores de 12 años, de los padres o tutores y del paciente cuando su edad era entre 12 y 18 años, y de los mayores de 18 años.

Se incluyó a pacientes procedentes del Hospital Vall d'Hebron (n = 41), grupo de DCP de Valencia (n = 14), Hospital Sant Joan de Déu (Esplugues, Barcelona) (n = 14), Hospital Miguel Servet (Zaragoza) (n = 4), Hospital del Mar (Barcelona) (n = 2), Hospital Parc Taulí (Sabadell, Barcelona) (n = 1), Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona, Barcelona) (n = 1), Hospital Clínic (Barcelona) (n = 1) y Hospital Son Llàtzer (Palma de Mallorca) (n = 1).

Se siguieron las recomendaciones de la ERS⁵ para clasificar a los pacientes como DCP confirmada (historia indicativa, alteraciones diagnósticas en el estudio con ME) o muy probable (historia sugestiva, NOn bajo, alteraciones en la HSVM) y como DCP muy improbable, con base en la valoración de los datos clínicos y escala PICADAR¹⁴, NOn, HSVM o ME.

La determinación de NOn se realizó usando un analizador de óxido nítrico por quimioluminiscencia (CLD 88sp NO-analyser, ECO MEDICS AG, Duerten, Suiza). La frecuencia y el patrón de batido

ciliar se analizaron con una cámara de grabación de alta velocidad (MotionPro[®] X4, IDT, CA, EE. UU.) acoplada a un microscopio óptico.

Algunos datos de los pacientes 14 y 15 (tabla 1S, material suplementario) se han publicado previamente⁹.

Secuenciación masiva y análisis de datos

Se extrajo ADN de sangre periférica mediante extracción automática magnética (Chemagic, Perkin-Elmer, Waltham, MA, EE. UU.) o extracción manual utilizando el kit Quick-DNA[™] Midiprep Plus Kit (Zymo Research, Irvine, CA, EE. UU.). Se determinó la concentración de ADN con el reactivo Qubit dsDNA BR Assay Kit en el fluorímetro Qubit 2.0.

Para realizar el estudio genético se diseñó un panel que permite la secuenciación de exones y regiones intrónicas adyacentes (± 20 pb) a partir de la tecnología de captura SeqCap EZ (Roche Nimblegen, Pleasanton, CA, EE. UU.). En este panel se incluyeron 44 genes relacionados con la DCP, según lo descrito en la literatura en el momento del diseño (tabla 1).

La captura de las regiones de interés se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo comercial (SeqCap EZ [Roche Nimblegen, Pleasanton, CA, EE. UU.]), con una fragmentación enzimática de 21 min. La secuenciación de la librería se realizó mediante un secuenci-

ador masivo de última generación MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.). El proceso de análisis de los datos incluyó el recorte de las secuencias con Trimmomatic (Institute for Biology, Aache, Alemania)¹⁵, el alineamiento de las secuencias con el genoma humano de referencia GRCh (hg38) usando BWA-MEM¹⁶, la detección de variantes con Genome Analysis Toolkit (GATK) Haplotype Caller (Broad Institute, Cambridge, MA, EE. UU.)¹⁷ y la anotación de las variantes con ANNOVAR¹⁸. Las variantes con una cobertura inferior a 20 no se tuvieron en cuenta en el análisis. La lista de las variantes identificadas se comparó con la información de bases de datos específicas para identificar variantes ya descritas en asociación a un fenotipo conocido (HGMD, ClinVar) y bases de datos de frecuencias poblacionales (GnomAD, ExAC, 1000 genomes) para descartar aquellas variantes que están presentes en la población general por encima del 1%. En paralelo, el análisis de datos también se realizó usando VariantStudio v2.2.1 (Illumina®, San Diego, CA, EE. UU.). Se evaluó la patogenicidad de las variantes utilizando el software Alamut v2.11 (Interactive Biosoftware, Ruan, Francia), que incluye Mutation Taster, Polyphen, Aling GVG y SIFT, y Varsome (Saphetor, Lausana, Suiza), que incluye DANN, GERP y MutationTaster. Para mutaciones identificadas en regiones de *splicing* el efecto de las mismas se evaluó mediante Splice-SiteFinder, MaxEntScan, NNSPLICE, GeneSplicer y Human Splicing Finder, incluidos también en Alamut v2.11. Los datos de secuenciación masiva se reanalizaron bioinformáticamente utilizando el programa ExomeDepth¹⁹ para detectar variaciones en el número de copias (*copy number variation* [CNV]). La nomenclatura y la clasificación de las variantes está basada en las guías de la Human Genome Variation Society (HGVS) (<https://www.hgvs.org/>)²⁰ y del American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (<https://www.acmg.net/>)²¹.

Las variantes probablemente patogénicas se confirmaron en los pacientes mediante secuenciación Sanger y, cuando fue posible, se analizó la cosegregación familiar.

Análisis estadístico

Para la descripción de las variables se han utilizado el porcentaje, la mediana y el rango y la media y desviación estándar (DE). Para el cálculo de la sensibilidad y especificidad del panel de genes, se consideraron como casos diagnosticados de DCP los casos de DCP confirmada o muy probable. Para la comparación entre los pacientes adultos y niños se ha utilizado la prueba de la chi al cuadrado, considerándose estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Los análisis se han realizado con el paquete estadístico MedCalc Statistical Software version 19.1.3 (MedCalc Software bvba, Ostend, Bélgica).

Resultados

En el periodo comprendido entre enero del 2017 y noviembre del 2019 se estudió a 79 pacientes, pertenecientes a 74 familias distintas (74 casos índice), y 39 familiares. De los 79 pacientes, 26 se clasificaron como DCP muy improbable y en todos ellos el estudio genético fue negativo.

De los 53 pacientes con diagnóstico de DCP confirmado o muy probable, 35 eran pediátricos y 18 adultos. Cuarenta y tres pacientes eran de origen caucásico, 4 (7,5%) de origen marroquí, 4 (7,5%) paquistaní, uno de Oriente Medio y otro latinoamericano. Diez pacientes tenían una historia familiar de consanguinidad (tabla 2 y tabla 1S, material suplementario). Las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron la tos crónica y la rinitis crónica. Un 50% tuvo antecedentes de distrés neonatal y el 32,7% presentaba *situs inversus*. La frecuencia de bronquiectasias fue superior en los pacientes adultos (94,1%) que en los pediátricos (51,4%) (tabla 2 y tabla 1S,

Tabla 2

Características clínicas de los pacientes con discinesia ciliar primaria incluidos en el estudio

	Total (n = 53)	Adultos (n = 18)	Niños (n = 35)	p
Edad	15,0 (1-42)	23,0 (18-42)	10 (1-17)	
Género (mujeres)	41,5%	33,3%	45,7%	0,391
Índice de masa corporal ^a		21 (16-28)	-1 (-2, -6)	
Origen (caucásico)	81,1%	100%	71,4%	0,012
Consanguinidad	18,9%	0%	28,6%	0,012
<i>Situs inversus</i>	32,7%	17,6%	40,0%	0,103
Distrés neonatal	50%	57,1%	47,0%	0,061
Rinitis crónica	90,2%	87,5%	91,4%	0,121
Tos crónica	94,2%	94,1%	94,3%	0,371
Sinusitis	23,5%	56,2%	8,6%	< 0,001
Otitis de repetición	52,9%	62,5%	48,6%	0,088
Bronquitis de repetición	47,1%	75%	34,3%	0,002
Neumonías de repetición	25,0%	41,2%	17,1%	0,066
Bronquiectasias	65,4%	94,1%	51,4%	0,004

Los datos se expresan como mediana y rango (entre paréntesis) para las variables cuantitativas (edad, índice de masa corporal) y como porcentaje para las variables cualitativas.

^a El índice de masa corporal se expresa como kg/m² en los adultos y como z-score en niños.

material suplementario). El valor de la escala PICADAR fue igual o superior a 5 en 31 pacientes (65,9%). El Non se pudo determinar en 35 casos, con un valor medio de 25,9 (DE 29,1) nl/min. En 25 el valor fue inferior a 33 nl/min y en solo 2 fue superior a 77 nl/min (tabla 1S, material suplementario). Los hallazgos de la HSVM y el ME se recogen en la tabla 1S, material suplementario. En 15 casos la alteración encontrada en el ME se consideró diagnóstica. La HSVM fue muy indicativa de DCP en 52 pacientes (no disponible en el paciente 3), siendo las alteraciones encontradas: patrón estático (n = 18), patrón estático con movimiento residual (n = 12), patrón rígido desorganizado (n = 8), patrón hipercinético (n = 5), patrón rotatorio (n = 6), discinesia (n = 2) y disminución movimiento distal (n = 1).

Las muestras de ADN se secuenciaron usando nuestro panel de genes, que ha cubierto el 98,75% de los exones y zonas intrónicas flanqueantes de los 44 genes incluidos (tabla 1). La cobertura media de los resultados fue de 600× con un 80,7% de *reads on target*.

En 81,1% (43/53) de los pacientes con DCP se encontraron variantes candidatas en alguno de los genes del panel, siendo 22 (51,2%) homocigotos y 21 (48,8%) heterocigotos compuestos. En 18,9% (10/53) de los pacientes no se encontró ninguna variante que pudiera explicar el fenotipo (tabla 3). La sensibilidad de la técnica fue del 81,1% (IC del 95%, 68,0-90,6%) y la especificidad del 100% (IC del 95%, 86,8-100%). El área bajo la curva ROC fue de 0,91 (IC del 95%, 0,82-0,96). El valor predictivo positivo del panel de genes en nuestra población de estudio, en que la prevalencia de casos de DCP es del 67,1%, fue del 100% y el valor predictivo negativo del 72,2% (IC del 95%, 59,8-82,0%). Se han encontrado 52 variantes distintas (1 en *ARMC4*, 1 en *CCDC114*, 1 en *CCDC151*, 8 en *CCDC39*, 3 en *CCDC40*, 14 en *DNAH5*, 2 en *DNAH9*, 8 en *DNAH11*, 4 en *DNAI2*, 1 en *RPGR*, 3 en *RSPH1*, 1 en *RSPH4A*, 1 en *RSPH9*, 2 en *SPAG1* y 2 en *TTC25*), 16 de las cuales habían sido previamente descritas asociadas a DCP^{9,22-31} y 36 no estaban descritas previamente en la literatura (tabla 3). De las 52 variantes encontradas, 14 (26,9%) *nonsense*, 13 (25%) fueron variantes *frameshift*, 13 (25%) de *splicing*, 9 (17,3%) *missense* y 3 (5,8%) CNV. Un 51,9% (27/52) se clasificaron como patogénicas (incluyendo las 3 CNV), un 21,2% (11/52) como probablemente patogénicas y un 26,9% (14/52) como variantes de significado incierto (VUS), según la clasificación del ACMG (tabla 3).

Dieciocho pacientes presentaron variantes en genes relacionados con proteínas estructurales de los brazos externos de dineína (*DNAH5* [n = 9], *DNAH11* [n = 4], *DNAI2* [n = 4], *DNAH9* [n = 1]) y 5 con el *docking complex* de los brazos externos de dineína (*TTC25* [n

Tabla 3
Resultados del estudio genético de los pacientes con variantes descritas que correlacionan con su fenotipo

Paciente	Origen	Consanguinidad/ familia	Gen	Cigosidad	Cambio cADN	Cambio proteína	Tipo mutación	Clasificación ACMG	Cosegregación familiar	Otros familiares	Referencias
1 ^a	Caucásico	N	<i>ARMC4</i>	Hom	c.1669G>T	p.Glu557Ter	<i>Nonsense</i>	Patogénica	ND	–	Hjeij et al. ²²
2 ^a	Caucásico	N	<i>CCDC114</i>	Hom	c.1391+5G>A	–	<i>Splicing</i>	VUS	padres portadores	–	Knowles et al. ²³
3 ^a	Caucásico	ND	<i>CCDC151</i>	Hom	c.410G>A	p.Trp137Ter	<i>Nonsense</i>	Prob. patogénica	Padres portadores	–	No descrita
4 ^a	Caucásico	N	<i>CCDC39</i>	Het. comp	c.357+1G>C c.2505_2506delCA	– p.His835GlnfsTer4	<i>Splicing</i> <i>Frameshift</i>	Patogénica Prob. patogénica	Padre portador Madre portadora	–	Merveille et al. ²⁴ No descrita
5 ^a	Caucásico	N	<i>CCDC39</i>	Hom	c.2250delT	p.Gln751LysfsTer11	<i>Frameshift</i>	Prob. patogénica	Padres portadores	–	No descrita
6 ^a	Caucásico	N	<i>CCDC39</i>	Hom	c.610-2A>G	–	<i>Splicing</i>	Patogénica	ND	–	Merveille et al. ²⁴
7 ^a	Caucásico	N	<i>CCDC39</i>	Het. comp	c.547_548delTT	p.Leu183GlyfsTer3	<i>Frameshift</i>	Prob. patogénica	ND	–	No descrita
8 ^a	Caucásico	N	<i>CCDC39</i>	Het. comp	c.1528-2A>G c.216.217delTT	– p.Cys73GlnfsTer6	<i>Splicing</i> <i>Frameshift</i>	Patogénica Prob. patogénica	Padre portador	–	no descrita Merveille et al. ²⁴
9 ^a	Caucásico	N	<i>CCDC39</i>	Hom	c.357+1G>C	–	<i>Splicing</i>	Patogénica	Padre portador	–	Merveille et al. ²⁴
10 ^a	Caucásico	N	<i>CCDC39</i>	Het. comp	c.547_548delTT	p.Leu183GlyfsTer3	<i>Frameshift</i>	Prob. patogénica	Padre portador ND	–	No descrita
11 ^a	Paquistaní	S	<i>CCDC40</i>	Hom	c.2596G>T c.1416delG	p.Glu866Ter p.Ile473PhefsTer2	<i>Nonsense</i> <i>Frameshift</i>	Patogénica Patogénica	Padres portadores	Hermana afectada/ hermano portador	Antony et al. ²⁵ Antony et al. ²⁵
12	Paquistaní	S/ her de 11	<i>CCDC40</i>	Hom	c.1416delG	p.Ile473PhefsTer2	<i>Frameshift</i>	Patogénica	Padres portadores	Hermana afectada/ hermano portador	Antony et al. ²⁵
13 ^a	Caucásico	N	<i>CCDC40</i>	Het. comp	c.2T>G	p.Met1Arg	<i>Missense</i>	Prob. patogénica	Padre portador	–	No descrita
14 ^a	Caucásico	N	<i>DNAH5</i>	Het. comp	526pb inc. ex.8 y ex.9 del c.12706-2A>T	–	CVN <i>Splicing</i>	Patogénica	Madre portadora Padre portador	Hermana afectada	Baz-Redón et al. ⁹ Baz-Redón et al. ⁹
15	Caucásico	N/ her de 14	<i>DNAH5</i>	Het. comp	c.4625_4628delGAGA c.12706-2A>T	p.Arg1542ThrfsTer6	<i>Frameshift</i> <i>Splicing</i>	Prob. patogénica Patogénica	Madre portadora Padre portador	Hermana afectada	Baz-Redón et al. ⁹ Baz-Redón et al. ⁹
16 ^a	Caucásico	N	<i>DNAH5</i>	Het. comp	c.11761G>C c.13060delG	p.Gly3921Arg p.Ala4354ArgfsTer23	<i>Missense</i> <i>Frameshift</i>	VUS Patogénica	Madre portadora ND	–	No descrita Olm et al. ²⁶
17 ^a	Caucásico	N	<i>DNAH5</i>	Het. comp	c.2283_2284delAG c.3861T>G	p.Arg761SerfsTer10 p.Tyr1287Ter	<i>Frameshift</i> <i>Nonsense</i>	Patogénica Patogénica	Padre portador Madre portadora	–	No descrita No descrita
18 ^a	Caucásico	N	<i>DNAH5</i>	Het. comp	c.8311C>T c.10615C>T	p.Arg2771Cys p.Arg3539Cys	<i>Missense</i> <i>Missense</i>	VUS VUS	Madre portadora Madre no portadora	–	No descrita Faily et al. ²⁷
19 ^a	Caucásico	N	<i>DNAH5</i>	Het. comp	c.10813G>A 3,2 kb inc. ex.2 y ex.3 del	p.Asp3605Asn –	<i>Missense</i> CNV	VUS Patogénica	Padre portador	–	Raidt et al. ²⁸ No descrita
20 ^a	Caucásico	N	<i>DNAH5</i>	Hom	c.13486C>T	p.Arg4496Ter	<i>Nonsense</i>	Patogénica	Madre portadora	–	Hornef et al. ²⁹

Tabla 3 (continuación)

Paciente	Origen	Consanguinidad/familia	Gen	Cigosis	Cambio cADN	Cambio proteína	Tipo mutación	Clasificación ACMG	Cosegregación familiar	Otros familiares	Referencias
21 ^a	Caucásico	N	<i>DNAH5</i>	Het. comp	c.2575A>T c.9730G>T	p.Lys859Ter p.Glu3244Ter	<i>Nonsense</i> <i>Nonsense</i>	Patogénica Patogénica	ND	Hijo portador	No descrita No descrita
22 ^a	Caucásico	S	<i>DNAH5</i>	Hom	3,3 kb inc. ex.29 y ex.30 del		<i>CNV</i>	Patogénica	ND	-	No descrita
23 ^a	Caucásico	N	<i>DNAH9</i>	Het. comp	c.7822-1G>A c.8992C>T	- p.Gln2998Ter	<i>Splicing</i> <i>Nonsense</i>	Patogénica Patogénica	ND	-	No descrita No descrita
24 ^a	Caucásico	N	<i>DNAH11</i>	Het. comp	c.12507+1G>C c.13412_13415dupAAAC	p.Lys4473AsnfsTer11	<i>Splicing</i> <i>Frameshift</i>	Patogénica Prob. patogénica	Abuela paterna portadora Abuela materna portadora	-	No descrita No descrita
25 ^a	Caucásico	N	<i>DNAH11</i>	Het. comp	c.927_931delTAAAC c.7645+5G>A	p.Ser312LeufsTer66	<i>Frameshift</i> <i>Splicing</i>	Prob. patogénica VUS	ND	-	No descrita No descrita
26 ^a	Árabe	S	<i>DNAH11</i>	Het. comp	c.983-1G>T c.3439C>T	- p.Gln1147Ter	<i>Splicing</i> <i>Nonsense</i>	Patogénica Patogénica	ND	-	No descrita No descrita
27 ^a	Caucásico	N	<i>DNAH11</i>	Het. comp	c.3898C>T c.6983+1G>A	p.Gln1300Ter	<i>Nonsense</i> <i>Splicing</i>	Patogénica Patogénica	ND	-	No descrita No descrita
28 ^a	Paquistaní	S	<i>DNAI2</i>	Hom	c.546C>A	p.Tyr182Ter	<i>Nonsense</i>	Patogénica	Padres portadores	Hermano afectado	No descrita
29	Paquistaní	S/ her de 26	<i>DNAI2</i>	Hom	c.546C>A	p.Tyr182Ter	<i>Nonsense</i>	Patogénica	Padres portadores	Hermano afectado	No descrita
30 ^a	Caucásico	N	<i>DNAI2</i>	Hom	c.346-3T>G	-	<i>Splicing</i>	VUS	ND	-	Loges et al. ³⁰
31 ^a	Caucásico	N	<i>DNAI2</i>	Het. comp	c.184-14G>A c.740G>A	- p.Arg247Gln	<i>Splicing</i> <i>Missense</i>	VUS VUS	Padre portador Madre portadora	-	No descrita No descrita
32 ^a	Caucásico	N	<i>RPGR</i>	Hom	c.920C>A	p.Thr307Lys	<i>Missense</i>	VUS	ND	-	No descrita
33 ^a	Caucásico	N	<i>RSPH1</i>	Hom	c.85G>T	p.Glu29Ter	<i>Nonsense</i>	Patogénica	ND	-	Kott et al. ³¹
34 ^a	Caucásico	N	<i>RSPH1</i>	Hom	c.85G>T	p.Glu29Ter	<i>Nonsense</i>	Patogénica	ND	Hermano afectado	Kott et al. ³¹
35	Caucásico	N / her de 32	<i>RSPH1</i>	Hom	c.85G>T	p.Glu29Ter	<i>Nonsense</i>	Patogénica	ND	Hermano afectado	Kott et al. ³¹
36 ^a	Caucásico	N	<i>RSPH1</i>	Het. comp	c.85G>T c.275-2A>C	p.Glu29Ter -	<i>Nonsense</i> <i>Splicing</i>	Patogénica Patogénica	ND	-	Kott et al. ³¹ Kott et al. ³¹
37 ^a	Caucásico	N	<i>RSPH1</i>	Het. comp	c.70C>T c.275-2A>C	p.Arg24Trp -	<i>Missense</i> <i>Splicing</i>	VUS Patogénica	ND	-	No descrita Kott et al. ³¹
38 ^a	Marroquí	S	<i>RSPH4A</i>	Hom	c.1453C>T	p.Arg485Ter	<i>Nonsense</i>	Patogénica	ND	Hermana afectada	No descrita
39	Marroquí	S / her de 36	<i>RSPH4A</i>	Hom	c.1453C>T	p.Arg485Ter	<i>Nonsense</i>	Patogénica	ND	Hermano afectado	No descrita
40 ^a	Marroquí	S	<i>RSPH9</i>	Hom	c.293_294delITG	p.Val98GlyfsTer14	<i>Frameshift</i>	Prob. patogénica	ND	-	No descrita
41 ^a	Caucásico	N	<i>SPAG1</i>	Het. comp	c.583delA c.1855G>C	p.Ile195Ter p.Asp619His	<i>Nonsense</i> <i>Missense</i>	Prob. patogénica VUS	Madre portadora Madre no portadora	-	No descrita No descrita
42 ^a	Caucásico	N	<i>TTC25</i>	Hom	c.244delA	p.Lys82ArgfsTer29	<i>Frameshift</i>	VUS	Padres portadores	Hermana portadora	No descrita
43 ^a	Marroquí	N	<i>TTC25</i>	Hom	c.655_659delCTGAC	p.Leu219CysfsTer62	<i>Frameshift</i>	VUS	Padres portadores	-	No descrita

ACMG: American College of Medical Genetics; ex.: exón; Her: hermano; Het. comp: heterocigoto compuesto; Het: heterocigoto; Hom: homocigoto; kb: kilobases; ND: muestra no disponible; pb: pares de bases; Prob. patogénica: probablemente patogénica; VUS: variante de significado incierto; -: falta de datos.

^a Pacientes índice.

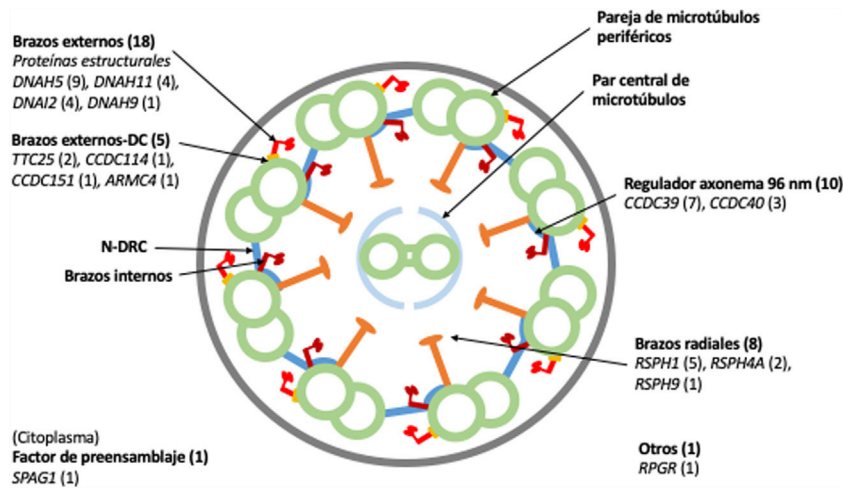


Figura 1. Diagrama transversal de un cilio indicando sus componentes estructurales y los genes en los que se han encontrado variantes. Se indica entre paréntesis el número de pacientes con variantes en cada gen. Brazos externos-DC: *docking complex* de los brazos externos de dineína; N-DRC: nexina-complejo regulador de la dineína.

= 2], *ARMC4* [n = 1], *CCDC114* [n = 1], *CCDC151* [n = 1]); 8 mostraron variantes en genes que codifican proteínas de los brazos radiales (*RSPH1* [n = 5], *RSPH4A* [n = 2], *RSPH9* [n = 1]); en 10 se detectaron variantes en genes que codifican proteínas del complejo regulador del axonema (*CCDC39* [n = 7], *CCDC40* [n = 3]); un paciente presentó variantes en *SPAG1*, que codifica una proteína probablemente relacionada con el transporte o ensamblaje citoplasmático de los complejos de dineína, y uno en *RPGR*, gen asociado a retinitis pigmentaria (fig. 1, tabla 3). Las variantes en los 3 genes más frecuentes (*DNAH5*, *CCDC39* y *RSPH1*) se presentaron solo en los pacientes de origen caucásico. En los pacientes de origen no caucásico, los genes causales más frecuentes fueron *CCDC40*, *DNAI2* y *RSPH4A*, con 2 casos cada uno.

Se ha analizado con el panel de genes a 37 familiares de 22 familias distintas. Todos los padres analizados (18 familias distintas) eran portadores de alguna de las variantes encontradas en sus hijos. Se analizaron los ADN procedentes de los abuelos maternos y la abuela materna del paciente 24 y se determinó que la variante c.12507+1G>C es de origen paterno y la c.13412_13415dupAAAC de origen materno (tabla 3).

Discusión

En una cohorte de 53 pacientes con DCP confirmada o muy probable, utilizando un panel de 44 genes mediante secuenciación masiva, se obtuvieron resultados genéticos positivos en el 81,1% de los pacientes, pudiendo describir, por lo tanto, en ellos el gen causante del defecto de la estructura ciliar. En otros 26 pacientes, remitidos por clínica respiratoria sospechosa, pero con diagnóstico de DCP muy improbable tras realizar las pruebas previas, el estudio genético fue negativo. Este es el primer estudio, en nuestro conocimiento, en describir los genes causantes de discinesia ciliar en una cohorte amplia de pacientes en España.

Con nuestros resultados hemos confirmado que, aplicado a nuestra población, el panel de genes tiene un alto rendimiento diagnóstico (sensibilidad del 81,1%) y que pudo descartar a todos los pacientes con baja sospecha de DCP (especificidad del 100%). El rendimiento de los paneles de genes aplicados a otras poblaciones ha ido aumentando a medida que se van descubriendo nuevos genes y se van incorporando a los paneles, variando entre un 43 y un 70%³²⁻³⁴, y más recientemente un 82%³⁵.

El diagnóstico de la DCP es complejo con las técnicas disponibles hasta ahora, lo que genera en los médicos y pacientes muchas incertezas diagnósticas y dudas acerca del pronóstico y evolución

de su enfermedad. La determinación de NON con punto de corte 77 nl/min tiene una alta sensibilidad (93,6%), pero una especificidad del 78,9%³⁶. El microscopio electrónico es específico (100%), pero no identifica un 21% de los casos, necesita personas muy expertas para su interpretación y a veces no se consigue una muestra adecuada^{5,37}. La HSVM tiene una excelente sensibilidad y especificidad, pero también necesita un equipo experto y a menudo repetir la prueba varias veces⁸. El estudio genético, aunque también puede no identificar un 20% de los casos, permite obtener un diagnóstico de certeza, lo que ayuda a orientar de forma más adecuada el tratamiento de los pacientes y a poder realizar un consejo genético y sentar las bases para la investigación de tratamientos específicos, como podrían ser la terapia génica o terapias proteicas¹³.

La secuenciación masiva con el panel de genes permite el estudio de variantes puntuales y de deleciones o inserciones pequeñas (*indels*) y las variantes en número de copia (CNV) de los genes descritos hasta el momento como causantes de DCP. Con esta técnica, una proporción de pacientes con DCP confirmada o muy probable, 18,9% en nuestra serie, queda sin diagnóstico genético. En ellos, el análisis del exoma completo podría ayudar a encontrar nuevos genes causantes de DCP.

La mayoría de las variantes descritas en nuestros pacientes (82,7%) causaron la pérdida de función proteica (*nonsense*, *frameshift*, CNV y *splicing*), resultados similares a los descritos en otros estudios³⁵. En 9 (17,3%) encontramos variantes *missense* de cambio de un único aminoácido y se catalogaron como VUS según la clasificación ACMG²¹, a excepción de la variante c.2T>G/p.Met1Arg (paciente 13) que afectaba al primer aminoácido y se clasificó como probablemente patogénica (tabla 3). Estas variantes *missense* se tuvieron en cuenta como causa posible de alteración proteica según las predicciones *in silico*. Idealmente, estos defectos *missense* se deberían comprobar *in vitro* mediante cultivos de células de epitelio respiratorio nasal del paciente o modelos animales.

Dado el elevado número de variantes que se pueden encontrar con la secuenciación masiva, muchas de ellas benignas, es fundamental para interpretar de forma correcta los resultados relacionar las variantes encontradas con los hallazgos del ME y la HSVM. En nuestra serie, hubo una buena relación entre la ultraestructura y los hallazgos genéticos en solo 6 casos, dadas las dificultades de interpretación de la ME y las posibilidades de alteraciones por infecciones respiratorias o por artefactos de procesamiento^{9,37}, mientras que el estudio con HSVM mostró una buena relación con los hallazgos genéticos en todos los casos.

Los pacientes 13 y 19, que tenían inicialmente una única variante en heterocigosis en los genes *CCDC40* y *DNAH5*, respectivamente,

se pudieron resolver a partir del análisis bioinformático de CNV, así como la paciente 22. En los pacientes 13 y 19 se describieron deleciones en el otro alelo que concordaba, además, con el estudio de segregación familiar, siendo la madre de la paciente 13 y el padre del paciente 19 los portadores de estas deleciones (tabla 3). En la paciente 22 se ha detectado una deleción en homocigosis en el gen *DNAH5*. El análisis bioinformático de CNV es una herramienta útil para resolver algunos casos, sobre todo en aquellos con variantes monoalélicas en un gen candidato que cuadre con el fenotipo.

Cabe destacar que todos los casos de consanguinidad de nuestra cohorte tuvieron resultado molecular positivo y fueron homocigotos para las variantes encontradas, todas ellas clasificadas como patogénicas o probablemente patogénicas (tabla 3).

La distribución de genes causantes de DCP puede ser diferente dependiendo del origen étnico³⁵. En nuestra serie *DNAH5* y *CCDC39* han sido los genes de mayor incidencia y los 2 se encontraron solo en los pacientes de origen caucásico (tabla 3). *DNAH5* se ha descrito como el gen más frecuente en estudios en población caucásica, explicando el 15-37% de los casos^{27,32,33,35} y poco frecuente en otras poblaciones como la árabe^{34,35}. El gen *CCDC39* se ha descrito previamente en pacientes de origen europeo²⁵ y es uno de los genes que predomina en población de origen árabe^{34,35}.

Las limitaciones de nuestro estudio están relacionadas principalmente con el número de pacientes estudiados que, aunque significativo para una enfermedad rara, hay que ampliar para conocer mejor la frecuencia de las diferentes variantes en nuestra población, tanto en los de origen caucásico, como no caucásico. La secuenciación masiva no permite detectar todas las deleciones/duplicaciones en los genes, lo que se ha solventado a través del análisis bioinformático con el análisis de CNV, aunque este es solo una aproximación y es conveniente confirmarlas con otros métodos. Otras limitaciones son las inherentes al estudio con un panel de genes, ya que no se analiza todo el exoma ni todo el genoma. Sin embargo, ello facilita la interpretación de los resultados, ya que en el análisis del exoma completo o del genoma pueden aparecer un número muy elevado de variantes sin significado patogénico en población sana. Además, en los paneles de genes, la cobertura de estos está optimizada respecto al estudio del exoma. Aunque el panel de genes diseñado a medida ha permitido conocer el defecto específico de los pacientes diagnosticados molecularmente, dado que cada año se describen nuevos genes de DCP³⁸⁻⁴⁰, es necesario una ampliación de este panel con los genes descubiertos hasta la fecha.

En conclusión, los resultados de este estudio muestran la utilidad del diseño y la implementación del análisis genético mediante paneles de genes a medida, que representa una herramienta de utilidad para conseguir un mejor diagnóstico de la DCP.

Financiación

El presente trabajo ha sido financiado por una ayuda de Acción Estratégica en Salud del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PI16/01233), cofinanciadas por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Programa Operativo Crecimiento Inteligente 2014-2020, una beca de la Sociedad Española de Neumología (2016) Pediátrica y una beca de la Fundació Catalana de Pneumologia (FUCAP) (2016). NCT recibió una ayuda para una *Short term Scientific Mission* de la COST Action BM1407.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores participan en la COST Action BM1407 *Translational research in primary ciliary dyskinesia: bench, bedside, and population perspectives* (BEAT PCD). AMG y SRA participan en la ERN-LUNG. Este trabajo se ha realizado en el marco del programa de doctorado de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universitat Autònoma de Barcelona. Damos la gracias al Dr. Josep Quer y a Damir García-Cehic (Vall d'Hebron Institut de Recerca [VHIR], Barcelona) por su valiosa colaboración y por su excelente asistencia en las técnicas de secuenciación masiva.

Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en doi: [10.1016/j.arbres.2020.02.010](https://doi.org/10.1016/j.arbres.2020.02.010).

Bibliografía

- Lucas JS, Burgess A, Mitchison HM, Moya E, Williamson M, Hogg C. Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Arch Dis Child*. 2014;99:850–6. [http://dx.doi.org/10.1136/archdischild.2013.304831](https://doi.org/10.1136/archdischild.2013.304831).
- Reula A, Lucas J, Moreno-Galdo A, Romero T, Milara X, Carda C, et al. New insights in primary ciliary dyskinesia. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2017;5:537–48. [http://dx.doi.org/10.1080/21678707.2017.1324780](https://doi.org/10.1080/21678707.2017.1324780).
- Martínez-García MA, Máz L, Oliveira C, Girón RM, de la Rosa D, Blanco M, et al. Spanish guidelines on the evaluation and diagnosis of bronchiectasis in adults. *Arch Bronconeumol*. 2018;54:79–87. [http://dx.doi.org/10.1016/j.arbres.2017.07.015](https://doi.org/10.1016/j.arbres.2017.07.015).
- Shapiro AJ, Davis SD, Ferkol T, Dell SD, Rosenfeld M, Olivier KN, et al. Genetic disorders of mucociliary clearance consortium laterality defects other than situs inversus totalis in primary ciliary dyskinesia: Insights into situs ambiguus and heterotaxy. *Chest*. 2014;146:1176–86. [http://dx.doi.org/10.1378/chest.13-1704](https://doi.org/10.1378/chest.13-1704).
- Lucas JS, Barbato A, Collins SA, Goutaki M, Behan L, Caudri D, et al. European respiratory society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 2017;49. [http://dx.doi.org/10.1183/13993003.01090-2016](https://doi.org/10.1183/13993003.01090-2016).
- Shapiro AJ, Davis SD, Polineni D, Manion M, Rosenfeld M, Dell SD, et al. American Thoracic Society Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia. An official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;197:e24–39. [http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201805-0819ST](https://doi.org/10.1164/rccm.201805-0819ST).
- Rubbo B, Shoemark A, Jackson CL, Hirst R, Thompson J, Hayes J, et al. National PCD Service, UK. Accuracy of high-speed video analysis to diagnose primary ciliary dyskinesia. *Chest*. 2019;155:1008–17. [http://dx.doi.org/10.1016/j.chest.2019.01.036](https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.01.036).
- Shoemark A, Frost E, Dixon M, Olsson S, Kilpin K, Patel M, et al. Accuracy of immunofluorescence in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;196:94–101. [http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201607-1351OC](https://doi.org/10.1164/rccm.201607-1351OC).
- Baz-Redón N, Rovira-Amigo S, Camats-Tarruella N, Fernández-Cancio M, Garrido-Pontnou M, Antolín M, et al. Role of Immunofluorescence and molecular diagnosis in the characterization of primary ciliary dyskinesia. *Arch Bronconeumol*. 2019;55:439–41. [http://dx.doi.org/10.1016/j.arbres.2019.01.021](https://doi.org/10.1016/j.arbres.2019.01.021).
- Olcese C, Patel MP, Shoemark A, Kiviluoto S, Legendre M, Williams HJ, et al. X-linked primary ciliary dyskinesia due to mutations in the cytoplasmic axonemal dynein assembly factor PIH1D3. *Nat Commun*. 2017;8:14279. [http://dx.doi.org/10.1038/ncomms14279](https://doi.org/10.1038/ncomms14279).
- Moore A, Escudier E, Roger G, Tamalet A, Pelosse B, Marlin S, et al. RPGR is mutated in patients with a complex X linked phenotype combining primary ciliary dyskinesia and retinitis pigmentosa. *J Med Genet*. 2006;43:326–33. [http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2005.034868](https://doi.org/10.1136/jmg.2005.034868).
- Budny B, Chen W, Omran H, Fliegau M, Tzschach A, Wisniewska M, et al. A novel X-linked recessive mental retardation syndrome comprising macrocephaly and ciliary dysfunction is allelic to oral-facial-digital type 1 syndrome. *Hum Genet*. 2006;120:171–8. [http://dx.doi.org/10.1007/s00439-006-0210-5](https://doi.org/10.1007/s00439-006-0210-5).
- Lucas JS, Davis SD, Omran H, Shoemark A. Primary ciliary dyskinesia in the genomics age. *Lancet Respir Med*. 2019. [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30374-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30374-1).
- Behan L, Dimitrov BD, Kuehni CE, Hogg C, Carroll M, Evans HJ, et al. PICADAR: A diagnostic predictive tool for primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 2016;47:1103–12. [http://dx.doi.org/10.1183/13993003.01551-2015](https://doi.org/10.1183/13993003.01551-2015).
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Genome analysis Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30:2114–20. [http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170).
- Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWAMEM arXiv:1303.3997v2 [q-bio.GN] 2013;00:1–3.
- Mckenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: A MAPREDUCE framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20:1297–303. [http://dx.doi.org/10.1101/gr.107524.110](https://doi.org/10.1101/gr.107524.110).

18. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:e164, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq603>.
19. Plagnol V, Curtis J, Epstein M, Mok KY, Stebbings E, Grigoriadou S, et al. A robust model for read count data in exome sequencing experiments and implications for copy number variant calling. *Bioinformatics.* 2012;28:2747–54, <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts526>.
20. Den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, et al. HGVS Recommendations for the description of sequence variants: 2016 Update. *Hum Mutat.* 2016;37:564–9, <http://dx.doi.org/10.1002/humu.22981>.
21. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S. ACMG Standards and Guidelines Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17:405–24, <http://dx.doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
22. Hjeij R, Lindstrand A, Francis R, Zariwala MA, Liu X, Li Y, et al. ARMC4 mutations cause primary ciliary dyskinesia with randomization of left/right body asymmetry. *Am J Hum Genet.* 2013;93:357–67, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.06.009>.
23. Knowles MR, Leigh MW, Ostrowski LE, Huang L, Carson JL, Hazucha MJ, et al. Exome sequencing identifies mutations in CCDC114 as a cause of primary ciliary dyskinesia. *Am J Hum Genet.* 2013;92:99–106, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.11.003>.
24. Merveille AC, Davis EE, Becker-Heck A, Legendre M, Amirav I, Bataille G, et al. CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs. *Nat Genet.* 2011;43:72–8, <http://dx.doi.org/10.1038/ng.726>.
25. Antony D, Becker-Heck A, Zariwala MA, Schmidts M, Onoufriadis A, Forouhan M, et al. Mutations in CCDC39 and CCDC40 are the major cause of primary ciliary dyskinesia with axonemal disorganization and absent inner dynein arms. *Hum Mutat.* 2013;34:462–72, <http://dx.doi.org/10.1002/humu.22261>.
26. Olm MAK, Marson FAL, Athanazio RA, Nakagawa NK, Macchione M, Loges NT, et al. Severe pulmonary disease in an adult primary ciliary dyskinesia population in Brazil. *Sci Rep.* 2019;9:8693, <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-45017-1>.
27. Faily M, Bartoloni L, Letourneau A, Munoz A, Falconnet E, Rossier C, et al. Mutations in DNAH5 account for only 15% of a non-preselected cohort of patients with primary ciliary dyskinesia. *J Med Genet.* 2009;46:281–6, <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2008.061176>.
28. Raidt J, Wallmeier J, Hjeij R, Onnebrink JG, Pennekamp P, Loges NT, et al. Ciliary beat pattern and frequency in genetic variants of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J.* 2014;44:1579–88, <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00052014>.
29. Hornef N, Olbrich H, Horvath J, Zariwala MA, Fliegauf M, Loges NT, et al. DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174:120–6, <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200601-0840C>.
30. Loges NT, Olbrich H, Fenske L, Mussaffi H, Horvath J, Fliegauf M, et al. DNAI2 mutations cause primary ciliary dyskinesia with defects in the outer dynein arm. *Am J Hum Genet.* 2008;83:547–58, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.10.001>.
31. Kott E, Legendre M, Copin B, Moal FD, Montantin G, Duquesnoy P, et al. Loss-of-function mutations in RSPH1 cause primary ciliary dyskinesia with central-complex and radial-spoke defects. *Am J Hum Genet.* 2013;93:561–70, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.07.013>.
32. Djakow J, Kramn L, Dusátková L, Uhlík J, Pursiheimo J-P, Svobodová T, et al. An effective combination of sanger and next generation sequencing in diagnostics of primary ciliary dyskinesia. *Pediatr Pulmonol.* 2016;509:498–509, <http://dx.doi.org/10.1002/ppul.23261>.
33. Boaretto F, Sniijders D, Salvo C, Spalletta A, Mostacciolo ML, Collura M, et al. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia by a targeted next-generation sequencing panel molecular and clinical findings in italian patients. *J Mol Diagn.* 2016;18:912–22, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.07.002>.
34. Fassad MR, Shoman WI, Morsy H, Patel MP, Radwan N, Jenkins L, et al. Clinical and genetic spectrum in 33 Egyptian families with suspected primary ciliary dyskinesia. *Clin Genet.* 2019;97:509–15, <http://dx.doi.org/10.1111/cge.13661>.
35. Fassad MR, Patel MP, Shoemark A, Cullup T, Hayward J, Dixon M, et al. Clinical utility of NGS diagnosis and disease stratification in a multiethnic primary ciliary dyskinesia cohort. *J Med Genet.* 2019 Dec 25, pii: [jmedgenet-2019-106501](http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106501) doi:10.1136/jmedgenet-2019-106501.
36. Collins SA, Behan L, Harris A, Gove K, Lucas JS. The dangers of widespread nitric oxide screening for primary ciliary dyskinesia. *Thorax.* 2016;71:560–1, <http://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-208056>.
37. Shapiro AJ, Leigh MW. Value of transmission electron microscopy for primary ciliary dyskinesia diagnosis in the era of molecular medicine: Genetic defects with normal and non-diagnostic ciliary ultrastructure. *Ultrastruct Pathol.* 2017;41:373–85, <http://dx.doi.org/10.1080/01913123.2017.1362088>.
38. Höben IM, Hjeij R, Olbrich H, Dougherty GW, Nöthe-Menchen T, Aprea I, et al. Mutations in C11orf70 cause primary ciliary dyskinesia with randomization of left/right body asymmetry due to defects of outer and inner dynein arms. *Am J Hum Genet.* 2018;102:973–84, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.03.025>.
39. Cindrić S, Dougherty GW, Olbrich H, Hjeij R, Loges NT, Amirav I, et al. SPEF2- and HYDIN-mutant cilia lack the central pair associated protein SPEF2 aiding PCD diagnostics. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2020;62:382–96, <http://dx.doi.org/10.1165/rccb.2019-00860C>.
40. Wallmeier J, Frank D, Shoemark A, Nöthe-Menchen T, Cindrić S, Olbrich H, et al. De novo mutations in FOXJ1 result in a motile ciliopathy with hydrocephalus and randomization of left/right body asymmetry. *Am J Hum Genet.* 2019;105:1030–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.09.022>.