



Sequenciamento Completo do Exoma (WES)

Metodologia

O Sequenciamento Completo do Exoma (WES, do inglês: *Whole Exome Sequencing*) é uma abordagem baseada no Sequenciamento de Nova Geração (NGS, do inglês: *Next Generation Sequencing*) utilizada para identificar variantes genéticas ligadas a um distúrbio/doença. Essa metodologia analisa as partes do DNA de um indivíduo denominadas éxons; estas regiões fornecem instruções para a produção de proteínas. Uma vez que a maioria das variantes que causam doenças estão presentes nos éxons, acredita-se que o WES seja uma técnica eficiente para identificar variantes causativas que podem levar a uma determinada doença.

O sequenciamento completo do exoma é realizado utilizando-se DNA extraído do sangue, saliva ou tecido do(a) paciente. A partir de DNA fragmentado, aproximadamente 45Mb do genoma, que correspondem a 99% da Sequência Codificante Consenso, são enriquecidos com sondas desenhadas para o genoma humano e otimizadas para a cobertura de todos os genes clinicamente relevante (Nextera DNA Flex Pre-Enrichment Library Prep, Illumina). A biblioteca gerada é sequenciada na plataforma NovaSeq 6000 (Illumina). Os dados de sequenciamento são processados pelo *pipeline* de bioinformática interno da Igenomix (v1.0). Em resumo, os dados brutos são primeiro demultiplexados, os barcodes moleculares são vinculados à ID da amostra, e os adaptadores e leituras de baixa qualidade são eliminados. Após essa etapa, as leituras provenientes são mapeadas com base na sequência referência do genoma humano. Leituras duplicadas são removidas antes da chamada e anotação das variantes. Métricas de qualidade são observadas para cada amostra, de acordo com os seguintes valores de corte: Q30 >80%, profundidade média de cobertura > 100x e porcentagem de bases com cobertura acima de 20x >95%. Amostras com parâmetros eventualmente abaixo dos valores de corte são novamente sequenciadas.

Cobertura do exoma

- Tamanho do painel: ~45Mb, correspondente a 99% da Sequência Codificante de Consenso (bancos de dados: CCDS, RefSeq, GENCODE, ENSEMBL e ClinVar)
- Profundidade média: 157,96 (>100x)
- Cobertura altamente uniforme de todo o exoma (20.000 genes):
 - >97,0% das regiões cobertas em >10x
 - >96,2% das regiões cobertas em >20x
- Leituras: 300 ciclos (2x150 bp)

Cobertura aprimorada de regiões clinicamente relevantes

- 4.555 genes associados a doenças (OMIM):
 - Profundidade média: 189 (>100x)
 - >97,0% das regiões cobertas em >20x
- Variantes patogênicas e provavelmente patogênicas pelo ClinVar:
 - Profundidade média: 201,4 (>200x)
 - >99,4% das regiões-alvo cobertas em >20x
- Variantes patogênicas e provavelmente patogênicas:
 - Profundidade média: 214 (>200x)
 - >99,3% das regiões-alvo cobertas em >20x

Tipos de variantes incluídos no estudo

- O NGS pode detectar com alta sensibilidade e especificidade:
 - SNVs
 - Indels
 - CNVs: ≥15 éxons com sensibilidade >80%
≥500Kb com sensibilidade >95%
- O NGS não pode detectar: regiões homopoliméricas, variantes em regiões de pseudogenes, fusões gênicas, translocações balanceadas, inversões, alterações de ploidia, disomia uniparental e regiões de repetição expandidas.

A interpretação das variantes é realizada por profissionais qualificados. Todas as variantes com frequência alélica inferior a 1% em bancos de dados populacionais (ExAC, 1000G, gnomAD) são avaliadas. São priorizadas variantes presentes nas regiões codificantes ou em sítios de splice conservados, variantes intrônicas e em UTRs. Uma combinação de critérios de biologia molecular, função gênica, padrão de herança da doença (OMIM), informações de bancos de dados de doenças (HGMD, ClinVar, ClinGen) e pesquisa bibliográfica (PubMed) é utilizada para correlacionar o fenótipo clínico com variantes genéticas. Além de SNVs e pequenos Indels, as variações de número de cópias (CNVs, do inglês: *Copy Number Variation*) são detectadas a partir dos dados de sequenciamento, utilizando a ferramenta *ExomeDepth* (v1.1.15) (PMID: 22942019). Este algoritmo detecta CNVs raras com base na comparação das profundidades de leitura dos dados do teste com um conjunto de dados de referência. Esta análise permite identificar CNVs ≥ 500Kb com mais de 95% de sensibilidade e CNVs com ao menos 15 éxons com mais de 80% de sensibilidade.

A patogenicidade das variantes é determinada utilizando as recomendações do *American College of Medical Genetics* (ACMG) (PMID: 25741868). Observe que a classificação das variantes pode mudar com o tempo. Para verificar se há alguma alteração na classificação das variantes relatadas, entre em contato com a Igenomix.



GPDx

Genômica precisão
diagnóstico

Igenomix[®]
WITH SCIENCE ON YOUR SIDE

As categorias de variantes estabelecidas pela ACMG são as seguintes: Patogênica, Provavelmente Patogênica, Variante de Significado Incerto (VUS, do inglês: *Variant of Unknown Significance*), Provavelmente Benigna e Benigna. Apenas variantes patogênicas, provavelmente patogênicas e de significado incerto (VUS) relacionados à indicação clínica do paciente serão relatadas neste teste genético. De acordo com as diretrizes do ACMG para relatar achados secundários no sequenciamento de exomas clínicos (PMID: 34012068), variantes patogênicas e provavelmente patogênicas nos seguintes genes são relatadas se o consentimento for indicado no Formulário de Requisição de Teste: *ACTA2, ACTC1, ACVRL1, APC, APOB, ATP7B, BMPRIA, BRCA1, BRCA2, BTBD, CACNA1S, CASQ2, COL3A1, DSC2, DSG2, DSP, ENG, FBN1, FLNC, GAA, GLA, HFE, HNF1A, KCNH2, KCNQ1, LDLR, LMNA, MAX, MEN1, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, MYBPC3, MYH11, MYH7, MYL2, MYL3, NF2, OTC, PALB2, PCSK9, PKP2, PMS2, PRKAG2, PTEN, RBBP1, RBBP4, RBBP7, RBBP8, RBBP9, RBBP10, RBBP11, RBBP12, RBBP13, RBBP14, RBBP15, RBBP16, RBBP17, RBBP18, RBBP19, RBBP20, RBBP21, RBBP22, RBBP23, RBBP24, RBBP25, RBBP26, RBBP27, RBBP28, RBBP29, RBBP30, RBBP31, RBBP32, RBBP33, RBBP34, RBBP35, RBBP36, RBBP37, RBBP38, RBBP39, RBBP40, RBBP41, RBBP42, RBBP43, RBBP44, RBBP45, RBBP46, RBBP47, RBBP48, RBBP49, RBBP50, RBBP51, RBBP52, RBBP53, RBBP54, RBBP55, RBBP56, RBBP57, RBBP58, RBBP59, RBBP60, RBBP61, RBBP62, RBBP63, RBBP64, RBBP65, RBBP66, RBBP67, RBBP68, RBBP69, RBBP70, RBBP71, RBBP72, RBBP73, RBBP74, RBBP75, RBBP76, RBBP77, RBBP78, RBBP79, RBBP80, RBBP81, RBBP82, RBBP83, RBBP84, RBBP85, RBBP86, RBBP87, RBBP88, RBBP89, RBBP90, RBBP91, RBBP92, RBBP93, RBBP94, RBBP95, RBBP96, RBBP97, RBBP98, RBBP99, RBBP100, RBBP101, RBBP102, RBBP103, RBBP104, RBBP105, RBBP106, RBBP107, RBBP108, RBBP109, RBBP110, RBBP111, RBBP112, RBBP113, RBBP114, RBBP115, RBBP116, RBBP117, RBBP118, RBBP119, RBBP120, RBBP121, RBBP122, RBBP123, RBBP124, RBBP125, RBBP126, RBBP127, RBBP128, RBBP129, RBBP130, RBBP131, RBBP132, RBBP133, RBBP134, RBBP135, RBBP136, RBBP137, RBBP138, RBBP139, RBBP140, RBBP141, RBBP142, RBBP143, RBBP144, RBBP145, RBBP146, RBBP147, RBBP148, RBBP149, RBBP150, RBBP151, RBBP152, RBBP153, RBBP154, RBBP155, RBBP156, RBBP157, RBBP158, RBBP159, RBBP160, RBBP161, RBBP162, RBBP163, RBBP164, RBBP165, RBBP166, RBBP167, RBBP168, RBBP169, RBBP170, RBBP171, RBBP172, RBBP173, RBBP174, RBBP175, RBBP176, RBBP177, RBBP178, RBBP179, RBBP180, RBBP181, RBBP182, RBBP183, RBBP184, RBBP185, RBBP186, RBBP187, RBBP188, RBBP189, RBBP190, RBBP191, RBBP192, RBBP193, RBBP194, RBBP195, RBBP196, RBBP197, RBBP198, RBBP199, RBBP200, RBBP201, RBBP202, RBBP203, RBBP204, RBBP205, RBBP206, RBBP207, RBBP208, RBBP209, RBBP210, RBBP211, RBBP212, RBBP213, RBBP214, RBBP215, RBBP216, RBBP217, RBBP218, RBBP219, RBBP220, RBBP221, RBBP222, RBBP223, RBBP224, RBBP225, RBBP226, RBBP227, RBBP228, RBBP229, RBBP230, RBBP231, RBBP232, RBBP233, RBBP234, RBBP235, RBBP236, RBBP237, RBBP238, RBBP239, RBBP240, RBBP241, RBBP242, RBBP243, RBBP244, RBBP245, RBBP246, RBBP247, RBBP248, RBBP249, RBBP250, RBBP251, RBBP252, RBBP253, RBBP254, RBBP255, RBBP256, RBBP257, RBBP258, RBBP259, RBBP260, RBBP261, RBBP262, RBBP263, RBBP264, RBBP265, RBBP266, RBBP267, RBBP268, RBBP269, RBBP270, RBBP271, RBBP272, RBBP273, RBBP274, RBBP275, RBBP276, RBBP277, RBBP278, RBBP279, RBBP280, RBBP281, RBBP282, RBBP283, RBBP284, RBBP285, RBBP286, RBBP287, RBBP288, RBBP289, RBBP290, RBBP291, RBBP292, RBBP293, RBBP294, RBBP295, RBBP296, RBBP297, RBBP298, RBBP299, RBBP300, RBBP301, RBBP302, RBBP303, RBBP304, RBBP305, RBBP306, RBBP307, RBBP308, RBBP309, RBBP310, RBBP311, RBBP312, RBBP313, RBBP314, RBBP315, RBBP316, RBBP317, RBBP318, RBBP319, RBBP320, RBBP321, RBBP322, RBBP323, RBBP324, RBBP325, RBBP326, RBBP327, RBBP328, RBBP329, RBBP330, RBBP331, RBBP332, RBBP333, RBBP334, RBBP335, RBBP336, RBBP337, RBBP338, RBBP339, RBBP340, RBBP341, RBBP342, RBBP343, RBBP344, RBBP345, RBBP346, RBBP347, RBBP348, RBBP349, RBBP350, RBBP351, RBBP352, RBBP353, RBBP354, RBBP355, RBBP356, RBBP357, RBBP358, RBBP359, RBBP360, RBBP361, RBBP362, RBBP363, RBBP364, RBBP365, RBBP366, RBBP367, RBBP368, RBBP369, RBBP370, RBBP371, RBBP372, RBBP373, RBBP374, RBBP375, RBBP376, RBBP377, RBBP378, RBBP379, RBBP380, RBBP381, RBBP382, RBBP383, RBBP384, RBBP385, RBBP386, RBBP387, RBBP388, RBBP389, RBBP390, RBBP391, RBBP392, RBBP393, RBBP394, RBBP395, RBBP396, RBBP397, RBBP398, RBBP399, RBBP400, RBBP401, RBBP402, RBBP403, RBBP404, RBBP405, RBBP406, RBBP407, RBBP408, RBBP409, RBBP410, RBBP411, RBBP412, RBBP413, RBBP414, RBBP415, RBBP416, RBBP417, RBBP418, RBBP419, RBBP420, RBBP421, RBBP422, RBBP423, RBBP424, RBBP425, RBBP426, RBBP427, RBBP428, RBBP429, RBBP430, RBBP431, RBBP432, RBBP433, RBBP434, RBBP435, RBBP436, RBBP437, RBBP438, RBBP439, RBBP440, RBBP441, RBBP442, RBBP443, RBBP444, RBBP445, RBBP446, RBBP447, RBBP448, RBBP449, RBBP450, RBBP451, RBBP452, RBBP453, RBBP454, RBBP455, RBBP456, RBBP457, RBBP458, RBBP459, RBBP460, RBBP461, RBBP462, RBBP463, RBBP464, RBBP465, RBBP466, RBBP467, RBBP468, RBBP469, RBBP470, RBBP471, RBBP472, RBBP473, RBBP474, RBBP475, RBBP476, RBBP477, RBBP478, RBBP479, RBBP480, RBBP481, RBBP482, RBBP483, RBBP484, RBBP485, RBBP486, RBBP487, RBBP488, RBBP489, RBBP490, RBBP491, RBBP492, RBBP493, RBBP494, RBBP495, RBBP496, RBBP497, RBBP498, RBBP499, RBBP500, RBBP501, RBBP502, RBBP503, RBBP504, RBBP505, RBBP506, RBBP507, RBBP508, RBBP509, RBBP510, RBBP511, RBBP512, RBBP513, RBBP514, RBBP515, RBBP516, RBBP517, RBBP518, RBBP519, RBBP520, RBBP521, RBBP522, RBBP523, RBBP524, RBBP525, RBBP526, RBBP527, RBBP528, RBBP529, RBBP530, RBBP531, RBBP532, RBBP533, RBBP534, RBBP535, RBBP536, RBBP537, RBBP538, RBBP539, RBBP540, RBBP541, RBBP542, RBBP543, RBBP544, RBBP545, RBBP546, RBBP547, RBBP548, RBBP549, RBBP550, RBBP551, RBBP552, RBBP553, RBBP554, RBBP555, RBBP556, RBBP557, RBBP558, RBBP559, RBBP560, RBBP561, RBBP562, RBBP563, RBBP564, RBBP565, RBBP566, RBBP567, RBBP568, RBBP569, RBBP570, RBBP571, RBBP572, RBBP573, RBBP574, RBBP575, RBBP576, RBBP577, RBBP578, RBBP579, RBBP580, RBBP581, RBBP582, RBBP583, RBBP584, RBBP585, RBBP586, RBBP587, RBBP588, RBBP589, RBBP590, RBBP591, RBBP592, RBBP593, RBBP594, RBBP595, RBBP596, RBBP597, RBBP598, RBBP599, RBBP600, RBBP601, RBBP602, RBBP603, RBBP604, RBBP605, RBBP606, RBBP607, RBBP608, RBBP609, RBBP610, RBBP611, RBBP612, RBBP613, RBBP614, RBBP615, RBBP616, RBBP617, RBBP618, RBBP619, RBBP620, RBBP621, RBBP622, RBBP623, RBBP624, RBBP625, RBBP626, RBBP627, RBBP628, RBBP629, RBBP630, RBBP631, RBBP632, RBBP633, RBBP634, RBBP635, RBBP636, RBBP637, RBBP638, RBBP639, RBBP640, RBBP641, RBBP642, RBBP643, RBBP644, RBBP645, RBBP646, RBBP647, RBBP648, RBBP649, RBBP650, RBBP651, RBBP652, RBBP653, RBBP654, RBBP655, RBBP656, RBBP657, RBBP658, RBBP659, RBBP660, RBBP661, RBBP662, RBBP663, RBBP664, RBBP665, RBBP666, RBBP667, RBBP668, RBBP669, RBBP670, RBBP671, RBBP672, RBBP673, RBBP674, RBBP675, RBBP676, RBBP677, RBBP678, RBBP679, RBBP680, RBBP681, RBBP682, RBBP683, RBBP684, RBBP685, RBBP686, RBBP687, RBBP688, RBBP689, RBBP690, RBBP691, RBBP692, RBBP693, RBBP694, RBBP695, RBBP696, RBBP697, RBBP698, RBBP699, RBBP700, RBBP701, RBBP702, RBBP703, RBBP704, RBBP705, RBBP706, RBBP707, RBBP708, RBBP709, RBBP710, RBBP711, RBBP712, RBBP713, RBBP714, RBBP715, RBBP716, RBBP717, RBBP718, RBBP719, RBBP720, RBBP721, RBBP722, RBBP723, RBBP724, RBBP725, RBBP726, RBBP727, RBBP728, RBBP729, RBBP730, RBBP731, RBBP732, RBBP733, RBBP734, RBBP735, RBBP736, RBBP737, RBBP738, RBBP739, RBBP740, RBBP741, RBBP742, RBBP743, RBBP744, RBBP745, RBBP746, RBBP747, RBBP748, RBBP749, RBBP750, RBBP751, RBBP752, RBBP753, RBBP754, RBBP755, RBBP756, RBBP757, RBBP758, RBBP759, RBBP760, RBBP761, RBBP762, RBBP763, RBBP764, RBBP765, RBBP766, RBBP767, RBBP768, RBBP769, RBBP770, RBBP771, RBBP772, RBBP773, RBBP774, RBBP775, RBBP776, RBBP777, RBBP778, RBBP779, RBBP780, RBBP781, RBBP782, RBBP783, RBBP784, RBBP785, RBBP786, RBBP787, RBBP788, RBBP789, RBBP790, RBBP791, RBBP792, RBBP793, RBBP794, RBBP795, RBBP796, RBBP797, RBBP798, RBBP799, RBBP800, RBBP801, RBBP802, RBBP803, RBBP804, RBBP805, RBBP806, RBBP807, RBBP808, RBBP809, RBBP810, RBBP811, RBBP812, RBBP813, RBBP814, RBBP815, RBBP816, RBBP817, RBBP818, RBBP819, RBBP820, RBBP821, RBBP822, RBBP823, RBBP824, RBBP825, RBBP826, RBBP827, RBBP828, RBBP829, RBBP830, RBBP831, RBBP832, RBBP833, RBBP834, RBBP835, RBBP836, RBBP837, RBBP838, RBBP839, RBBP840, RBBP841, RBBP842, RBBP843, RBBP844, RBBP845, RBBP846, RBBP847, RBBP848, RBBP849, RBBP850, RBBP851, RBBP852, RBBP853, RBBP854, RBBP855, RBBP856, RBBP857, RBBP858, RBBP859, RBBP860, RBBP861, RBBP862, RBBP863, RBBP864, RBBP865, RBBP866, RBBP867, RBBP868, RBBP869, RBBP870, RBBP871, RBBP872, RBBP873, RBBP874, RBBP875, RBBP876, RBBP877, RBBP878, RBBP879, RBBP880, RBBP881, RBBP882, RBBP883, RBBP884, RBBP885, RBBP886, RBBP887, RBBP888, RBBP889, RBBP890, RBBP891, RBBP892, RBBP893, RBBP894, RBBP895, RBBP896, RBBP897, RBBP898, RBBP899, RBBP900, RBBP901, RBBP902, RBBP903, RBBP904, RBBP905, RBBP906, RBBP907, RBBP908, RBBP909, RBBP910, RBBP911, RBBP912, RBBP913, RBBP914, RBBP915, RBBP916, RBBP917, RBBP918, RBBP919, RBBP920, RBBP921, RBBP922, RBBP923, RBBP924, RBBP925, RBBP926, RBBP927, RBBP928, RBBP929, RBBP930, RBBP931, RBBP932, RBBP933, RBBP934, RBBP935, RBBP936, RBBP937, RBBP938, RBBP939, RBBP940, RBBP941, RBBP942, RBBP943, RBBP944, RBBP945, RBBP946, RBBP947, RBBP948, RBBP949, RBBP950, RBBP951, RBBP952, RBBP953, RBBP954, RBBP955, RBBP956, RBBP957, RBBP958, RBBP959, RBBP960, RBBP961, RBBP962, RBBP963, RBBP964, RBBP965, RBBP966, RBBP967, RBBP968, RBBP969, RBBP970, RBBP971, RBBP972, RBBP973, RBBP974, RBBP975, RBBP976, RBBP977, RBBP978, RBBP979, RBBP980, RBBP981, RBBP982, RBBP983, RBBP984, RBBP985, RBBP986, RBBP987, RBBP988, RBBP989, RBBP990, RBBP991, RBBP992, RBBP993, RBBP994, RBBP995, RBBP996, RBBP997, RBBP998, RBBP999, RBBP1000, RBBP1001, RBBP1002, RBBP1003, RBBP1004, RBBP1005, RBBP1006, RBBP1007, RBBP1008, RBBP1009, RBBP1010, RBBP1011, RBBP1012, RBBP1013, RBBP1014, RBBP1015, RBBP1016, RBBP1017, RBBP1018, RBBP1019, RBBP1020, RBBP1021, RBBP1022, RBBP1023, RBBP1024, RBBP1025, RBBP1026, RBBP1027, RBBP1028, RBBP1029, RBBP1030, RBBP1031, RBBP1032, RBBP1033, RBBP1034, RBBP1035, RBBP1036, RBBP1037, RBBP1038, RBBP1039, RBBP1040, RBBP1041, RBBP1042, RBBP1043, RBBP1044, RBBP1045, RBBP1046, RBBP1047, RBBP1048, RBBP1049, RBBP1050, RBBP1051, RBBP1052, RBBP1053, RBBP1054, RBBP1055, RBBP1056, RBBP1057, RBBP1058, RBBP1059, RBBP1060, RBBP1061, RBBP1062, RBBP1063, RBBP1064, RBBP1065, RBBP1066, RBBP1067, RBBP1068, RBBP1069, RBBP1070, RBBP1071, RBBP1072, RBBP1073, RBBP1074, RBBP1075, RBBP1076, RBBP1077, RBBP1078, RBBP1079, RBBP1080, RBBP1081, RBBP1082, RBBP1083, RBBP1084, RBBP1085, RBBP1086, RBBP1087, RBBP1088, RBBP1089, RBBP1090, RBBP1091, RBBP1092, RBBP1093, RBBP1094, RBBP1095, RBBP1096, RBBP1097, RBBP1098, RBBP1099, RBBP1100, RBBP1101, RBBP1102, RBBP1103, RBBP1104, RBBP1105, RBBP1106, RBBP1107, RBBP1108, RBBP1109, RBBP1110, RBBP1111, RBBP1112, RBBP1113, RBBP1114, RBBP1115, RBBP1116, RBBP1117, RBBP1118, RBBP1119, RBBP1120, RBBP1121, RBBP1122, RBBP1123, RBBP1124, RBBP1125, RBBP1126, RBBP1127, RBBP1128, RBBP1129, RBBP1130, RBBP1131, RBBP1132, RBBP1133, RBBP1134, RBBP1135, RBBP1136, RBBP1137, RBBP1138, RBBP1139, RBBP1140, RBBP1141, RBBP1142, RBBP1143, RBBP1144, RBBP1145, RBBP1146, RBBP1147, RBBP1148, RBBP1149, RBBP1150, RBBP1151, RBBP1152, RBBP1153, RBBP1154, RBBP1155, RBBP1156, RBBP1157, RBBP1158, RBBP1159, RBBP1160, RBBP1161, RBBP1162, RBBP1163, RBBP1164, RBBP1165, RBBP1166, RBBP1167, RBBP1168, RBBP1169, RBBP1170, RBBP1171, RBBP1172, RBBP1173, RBBP1174, RBBP1175, RBBP1176, RBBP1177, RBBP1178, RBBP1179, RBBP1180, RBBP1181, RBBP1182, RBBP1183, RBBP1184, RBBP1185, RBBP1186, RBBP1187, RBBP1188, RBBP1189, RBBP1190, RBBP1191, RBBP1192, RBBP1193, RBBP1194, RBBP1195, RBBP1196, RBBP1197, RBBP1198, RBBP1199, RBBP1200, RBBP1201, RBBP1202, RBBP1203, RBBP1204, RBBP1205, RBBP1206, RBBP1207, RBBP1208, RBBP1209, RBBP1210, RBBP1211, RBBP1212, RBBP1213, RBBP1214, RBBP1215, RBBP1216, RBBP1217, RBBP1218, RBBP1219, RBBP1220, RBBP1221, RBBP1222, RBBP1223, RBBP1224, RBBP1225, RBBP1226, RBBP1227, RBBP1228, RBBP1229, RBBP1230, RBBP1231, RBBP1232, RBBP1233, RBBP1234, RBBP1235, RBBP1236, RBBP1237, RBBP1238, RBBP1239, RBBP1240, RBBP1241, RBBP1242, RBBP1243, RBBP1244, RBBP1245, RBBP1246, RBBP1247, RBBP1248, RBBP1249, RBBP1250, RBBP1251, RBBP1252, RBBP1253, RBBP1254, RBBP1255, RBBP1256, RBBP1257, RBBP1258, RBBP1259, RBBP1260, RBBP1261, RBBP1262, RBBP1263, RBBP1264, RBBP1265, RBBP1266, RBBP1267, RBBP1268, RBBP1269, RBBP1270, RBBP1271, RBBP1272, RBBP1273, RBBP1274, RBBP1275, RBBP1276, RBBP1277, RBBP1278, RBBP1279, RBBP1280, RBBP1281, RBBP1282, RBBP1283, RBBP1284, RBBP1285, RBBP1286, RBBP1287, RBBP1288, RBBP1289, RBBP1290, RBBP1291, RBBP1292, RBBP1293, RBBP1294, RBBP1295, RBBP1296, RBBP1297, RBBP1298, RBBP1299, RBBP1300, RBBP1301, RBBP1302, RBBP1303, RBBP1304, RBBP1305, RBBP1306, RBBP1307, RBBP1308, RBBP1309, RBBP1310, RBBP1311, RBBP1312, RBBP1313, RBBP1314, RBBP1315, RBBP1316, RBBP1317, RBBP1318, RBBP1319, RBBP1320, RBBP1321, RBBP1322, RBBP1323, RBBP1324, RBBP1325, RBBP1326, RBBP1327, RBBP1328, RBBP1329, RBBP1330, RBBP1331, RBBP1332, RBBP1333, RBBP1334, RBBP1335, RBBP1336, RBBP1337, RBBP1338, RBBP1339, RBBP1340, RBBP1341, RBBP1342, RBBP1343, RBBP1344, RBBP1345, RBBP1346, RBBP1347, RBBP1348, RBBP1349, RBBP1350, RBBP1351, RBBP1352, RBBP1353, RBBP1354, RBBP1355, RBBP1356, RBBP1357, RBBP1358, RBBP1359, RBBP1360, RBBP1361, RBBP1362, RBBP1363, RBBP1364, RBBP1365, RBBP1366, RBBP1367, RBBP1368, RBBP1369, RBBP1370, RBBP1371, RBBP1372, RBBP1373, RBBP1374, RBBP1375, RBBP1376, RBBP1377, RBBP1378, RBBP1379, RBBP1380, RBBP1381, RBBP1382, RBBP1383, RBBP1384, RBBP1385, RBBP1386, RBBP1387, RBBP1388, RBBP1389, RBBP1390, RBBP1391, RBBP1392, RBBP1393, RBBP1394, RBBP1395, RBBP1396, RBBP1397, RBBP1398, RBBP1399, RBBP1400, RBBP1401, RBBP1402, RBBP1403, RBBP1404, RBBP1405, RBBP1406, RBBP1407, RBBP1408, RBBP1409, RBBP1410, RBBP1411, RBBP1412, RBBP1413, RBBP1414, RBBP1415, RBBP1416, RBBP1417, RBBP1418, RBBP1419, RBBP1420, RBBP1421, RBBP1422, RBBP1423, RBBP1424, RBBP1425, RBBP1426, RBBP1427, RBBP1428, RBBP1429, RBBP1430, RBBP1431, RBBP1432, RBBP1433, RBBP1434, RBBP1435, RBBP1436, RBBP1437, RBBP1438, RBBP1439, RBBP1440, RBBP1441, RBBP1442, RBBP1443, RBBP1444, RBBP1445, RBBP1446, RBBP1447, RBBP1448, RBBP1449, RBBP1450, RBBP1451, RBBP1452, RBBP1453, RBBP1454, RBBP1455, RBBP1456, RBBP1457, RBBP1458, RBBP1459, RBBP1460, RBBP1461, RBBP1462, RBBP1463, RBBP1464, RBBP1465, RBBP1466, RBBP1467, RBBP1468, RBBP1469, RBBP1470, RBBP1471, RBBP1472, RBBP1473, RBBP1474, RBBP1475, RBBP1476, RBBP1477, RBBP1478, RBBP1479, RBBP1480, RBBP1481, RBBP1482, RBBP1483, RBBP1484, RBBP1485, RBBP1486, RBBP1487, RBBP1488, RBBP1489, RBBP1490, RBBP1491, RBBP1492, RBBP1493, RBBP1494, RBBP1495, RBBP1496, RBBP1497, RBBP1498, RBBP1499, RBBP1500, RBBP1501, RBBP1502, RBBP1503, RBBP1504, RBBP1505, RBBP1506, RBBP1507, RBBP1508, RBBP1509, RBBP1510, RBBP1511, RBBP1512, RBBP1513, RBBP1514, RBBP1515, RBBP1516, RBBP1517, RBBP1518, RBBP1519, RBBP1520, RBBP1521, RBBP1522, RBBP1523, RBBP1524, RBBP1525, RBBP1526, RBBP1527, RBBP1528, RBBP1529, RBBP1530, RBBP1531, RBBP1532, RBBP1533, RBBP1534, RBBP1535, RBBP1536, RBBP1537, RBBP1538, RBBP1539, RBBP1540, RBBP1541, RBBP1542, RBBP1543, RBBP1544, RBBP1545, RBBP1546, RBBP1547, RBBP1548, RBBP1549, RBBP1550, RBBP1551, RBBP1552, RBBP1553, RBBP1554, RBBP1555, RBBP1556, RBBP1557, RBBP1558, RBBP1559, RBBP1560, RBBP1561, RBBP1562, RBBP1563, RBBP1564, RBBP1565, RBBP1566, RBBP1567, RBBP1568, RBBP1569, RBBP1570, RBBP1571, RBBP1572, RBBP1573, RBBP1574, RBBP1575, RBBP1576, RBBP1577, RBBP1578, RBBP1579, RBBP1580, RBBP1581, RBBP1582, RBBP1583, RBBP1584, RBBP1585, RBBP1586, RBBP1587, RBBP1588, RBBP1589, RBBP1590, RBBP1591, RBBP1592, RBBP1593, RBBP1594, RBBP1595, RBBP1596, RBBP1597, RBBP1598, RBBP1599, RBBP1600, RBBP1601, RBBP1602, RBBP1603, RBBP1604, RBBP1605, RBBP1606, RBBP1607, RBBP1608, RBBP1609, RBBP1610, RBBP1611, RBBP1612, RBBP1613, RBBP1614, RBBP1615, RBBP1616, RBBP1617, RBBP1618, RBBP1619, RBBP1620, R*