

Hinweise zur Akkreditierbarkeit der Whole-Exome-Sequenzierung (WES) im Rahmen der DIN EN ISO 15189

Erarbeitet durch die GutachterInnen des DAkKS-Arbeitskreises
der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH)
im Fachbereich Molekulare Humangenetik

Stand: 16.04.2021

Diese Handreichung ist als Hinweis für die Implementierung des Whole Exome Sequencing (WES) und verwandter analytischer Ansätze nach DIN ISO EN15189 formuliert worden. Sie stellt eine Sammlung von Aspekten dar, die bei der Erfüllung der Normanforderungen helfen sollen. Sie spiegelt den Stand der Diskussionen zum Zeitpunkt der Erstellung wider und hat keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Rückmeldungen und Vorschläge für Erweiterungen und Änderungen sind daher willkommen und können an die GfH-Geschäftsstelle (organisation@gfhev.de) gerichtet werden.

Begriffsbestimmungen

Der Begriff Whole Exome Sequencing (WES) wird hier beispielhaft für alle analytischen Verfahren der Massiv-Parallelen Sequenzierung verwendet, bei denen eine Auswahl/Eingrenzung der zu untersuchenden Gene nicht primär auf der Basis von klinischen Befunden erfolgt/möglich ist (wie es z.B. bei der Zusammenstellung eines Gen-Panels der Fall ist). Vielmehr zielt der WES-Ansatz auf die Analyse der Gesamtheit aller annotierten Gene ab. Das „Clinical Exome“ (Mendeliom) umfasst alle Gene, für die eine klinische Relevanz/ein monogener Erbgang belegt ist. Alle Aussagen zu WES gelten im Folgenden sinngemäß auch für „Clinical Exome“ und „Mendeliom“.

Im Sinne der Norm und der Anlage zur Akkreditierungsurkunde ist der Begriff „Analyt“ als die Summe aller analysierten Genbereiche zu definieren. Diese Definition erfolgt einerseits durch die Angaben des Herstellers des Anreicherungs-Kits (Angabe der genauen Bezeichnung und Version), andererseits durch die Einschränkungen, die sich ggf. im Rahmen der Etablierung/Verifizierung ergeben haben (z.B. durch eine Negativliste der nicht ausreichend abgedeckten Bereiche).

Anwendungsbereiche

WES kann einerseits als ein einheitlicher nass-chemischer Workflow eingesetzt werden, der die Daten für die Auswertung von „bio-informatischen“/virtuellen Sub-Panels liefert, die sich auf verschiedene klinisch fassbare Fragestellungen beziehen. Für diese klinisch eindeutig eingrenzenden Fragestellungen sind vorab auf den Untersuchungsanlass bezogene Core-Gene zu definieren. Pro Fall muss die Konformitätsbewertungsstelle (KBS) in Abhängigkeit von der Indikation/dem Untersuchungsanlass Typ A-C-Gene definieren, für die sie die erforderliche Coverage pro Base definieren muss (siehe Bauer et al.).

Andererseits kann WES auch zur Abklärung der möglichen genetischen Ursachen einer komplexen, aber *a priori* nicht einzuordnenden Symptomatik/klinischen Entität auch als „first line“-Analytik verwendet werden.

Anforderungen für die Akkreditierung

Das **Personal** der KBS muss Erfahrungen im Bereich der NGS-Analytik vorweisen können. Neben der beruflichen Qualifikation (z.B. FÄ für Humangenetik oder Fachhumangenetiker) ist eine mehrjährige diagnostische Erfahrung in der molekulargenetischen Analytik von Sequenzveränderungen für genetisch heterogene Erkrankungen (incl. der Auswertung und Variantenbewertung) erforderlich.

Die **Verifizierung/Validierung** des gesamten WES-Workflows soll mit Hilfe von geeignetem Referenzmaterial erfolgen, dessen Variantendatensätze allgemein zugänglich sind, z.B. Genome-in-a-bottle-Proben.

- Dabei sollen alle Typen von molekularen Varianten, über die berichtet werden soll, berücksichtigt werden (z.B. SNVs und CNVs).
- Spezifität und Sensitivität des WES im Gesamtlauf sind zu ermitteln, z.B. anhand der Gene für ausgewählte und/oder häufige Fragestellungen.
- Zur Ermittlung der Robustheit des Gesamtverfahrens sollen Inter- und Intra-Assay-Vergleiche durchgeführt werden.
- Es ist eine Risikoabschätzung einer möglichen Probenvertauschung vorzunehmen, ggf. ist eine orthogonale Methode anzuwenden (Probenidentifikationsprüfung z.B. durch ein SNP-Panel).
- Die Ergebnisse der Verifizierung/Validierung sind nachvollziehbar zu dokumentieren und von verantwortlichem Personal vor der Freigabe zu bewerten.
- Relevante Änderungen sowohl der Laborprozesse als auch der bioinformatischen Module incl. der Pathogenitätsbewertung müssen dokumentiert werden. Bei signifikanten Änderungen ist eine erneute Validation des Gesamtprozesses notwendig.
- Die Leistungsdaten des Gesamtverfahrens, die in der Verifizierung ermittelt wurden, müssen den Einsendern auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden.

Die **Kriterien für die technische Freigabe** eines WES-Ansatzes sind auf der Basis der Verifizierung zu definieren und für jeden Lauf zu prüfen. Dazu gehören u.a. die minimal erforderliche Abdeckung pro Base (Coverage-Analyse) und die Ermittlung der nicht abgedeckten Bereiche, die in den Befundbericht aufzunehmen sind.

Die auf der Basis von WES-Daten erstellten **Befundberichte** müssen Angaben über die eingesetzte Methodik (Chemie, Geräte, Bioinformatik), Qualitätsparameter und Pathogenitätsbewertung enthalten.

Unabhängig von der Darstellung der WES-Analytik in der Anlage zur Akkreditierungsurkunde muss die KBS die Zusammensetzung von virtuellen Gen-Panels in der „**aktuellen Liste der Verfahren im (flexiblen) Geltungsbereich**“ der validierten Analyten führen.

Ringversuche und Laborvergleiche

- Teilnahme an methodischen Ringversuchen im Bereich NGS zum Vergleich der technischen Leistungsdaten (z.B. Coverage, Wiederfindungsrate von Varianten etc.).
- Wenn möglich, Teilnahme an indikationsspezifischen Ringversuchen für genetisch heterogene Erkrankungen (z.B. HBOC). Neben den Qualitätsparametern der Analyse und der Liste der ermittelten Varianten sollten solche RVs auch die Interpretation der Varianten und die Abfassung eines Befundberichts umfassen.
- Falls keine geeigneten Ringversuche zur Verfügung stehen, sollen Laborvergleiche durchgeführt werden, die sich an den Kriterien für RVs orientieren.

Zugrunde liegende Literatur

Bauer P, Wildhardt G, Gläser D, Müller-Reible C, Bolz HJ, Klein H-G, Finckh U, Hehr U. S1-Leitlinie: Molekulargenetische Diagnostik mit Hochdurchsatz-Verfahren der Keimbahn, beispielsweise mit Next-Generation Sequencing. AWMF-Register-Nr. 078/016

Brandt T, Sack LM, Arjona D, Tan D, Mei H, Cui H, Gao H, Bean LJH, Ankala A, Del Gaudio D, Knight Johnson A, Vincent LM, Reavey C, Lai A, Richard G, Meck JM. Adapting ACMG/AMP sequence variant classification guidelines for single-gene copy number variants. *Genet Med*. 2020 Feb;22(2):336-344

Marshall CR, Chowdhury S, Taft RJ, Lebo MS, Buchan JG, Harrison SM, Rowsey R, Klee EW, Liu P, Worthey EA, Jobanputra V, Dimmock D, Kearney HM, Bick D, Kulkarni S, Taylor SL, Belmont JW, Stavropoulos DJ, Lennon NJ; Medical Genome Initiative. Best practices for the analytical validation of clinical whole-genome sequencing intended for the diagnosis of germline disease. *NPJ Genom Med*. 2020 Oct 23;5:47.

Matthijs G, Souche E, Alders M, Corveleyn A, Eck S, Feenstra I, Race V, Sistermans E, Sturm M, Weiss M, Yntema H, Bakker E, Scheffer H, Bauer P; EuroGentest; European Society of Human Genetics. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet*. 2016 Jan;24(1):2-5.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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 May;17(5):405-24

Silva M, de Leeuw N, Mann K, Schuring-Blom H, Morgan S, Giardino D, Rack K, Hastings R. European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. *Eur J Hum Genet*. 2019 Jan;27(1):1-16