

S1 Leitlinie: Molekulargenetische Diagnostik mit Hochdurchsatzverfahren, beispielsweise mit *Next-Generation Sequencing*

Expertengruppe:

Peter Bauer, Universitätsklinikum Tübingen, Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik und CENTOGENE AG, Rostock (federführend)

Gabriele Wildhardt, bio.logis, Zentrum für Humangenetik, Frankfurt

Dieter Gläser, Genetikum, Neu-Ulm

Clemens Müller-Reible, Universität Würzburg, Institut für Humangenetik

Hanno J. Bolz, Universitätsklinikum Köln, Institut für Humangenetik

Hanns-Georg Klein, MVZ Martinsried

Ulrich Finckh, Labor Eberhard, Dortmund und Sprechstunde für Humangenetik, Dortmund

Ute Hehr, Zentrum für Humangenetik, Regensburg

E-Mail-Verteiler:

peter.bauer@med.uni-tuebingen.de; gabriele.wildhardt@bio.logis.de; glaeser@genetikum.de;
crm@biozentrum.uni-wuerzburg.de; hanno.bolz@uk-koeln.de; hanns-georg.klein@medizinische-genetik.de;
finu@dr-finckh.de; Ute.Hehr@klinik.uni-regensburg.de;

Revision nach Kommentierung durch Uwe Kornak, Andreas Dufke und Thomas Eggermann (02.03.2017); Berücksichtigung der GfH-Mitgliederkommentare; Konsentierete Finalisierung am 21.07.2017

Die S2-Leitlinie „Humangenetische Diagnostik und genetische Beratung“, welche in der ersten Fassung 2011 publiziert wurde (medizinischegenetik 2011, 23:281-323, AWMF Registernummer 078 - 015), konnte noch nicht auf Hochdurchsatzverfahren, wie z.B. das Next-Generation Sequencing (NGS) Bezug nehmen. Mittlerweile ist durch solche Verfahren für zahlreiche Erkrankungen eine viel effizientere humangenetische Diagnostik möglich. Diese S1-Leitlinie zur molekulargenetischen Diagnostik mit Hochdurchsatzverfahren soll als Expertenmeinung Eckpunkte definieren und die Eingliederung neuer Technologien in das Gefüge der existierenden Leitlinien vorbereiten. Dabei stellt das Next-Generation Sequencing (Hochdurchsatz-Diagnostik) den aktuellen Stand der Technik bei Hochdurchsatzverfahren dar und wird daher hier vorwiegend aufgeführt. Dafür wird diese Leitlinie entlang der EuroGentest-Initiative „*Guidelines for diagnostic next-generation sequencing*“ entwickelt, welche im Eur J Hum Genet publiziert worden ist (Matthijs et al., 2016).

Inhalt

I.	Übersicht der Statements	3
II.	Präambel	5
III.	Spezifische Statements für Hochdurchsatz-basierte Diagnostik in Deutschland.....	6
IV.	Statements und Kommentare, die aus der Eurogentest-Leitlinie übernommen wurden	10
V.	Einwilligungserklärung	12
VI.	Validierung	14
VII.	Befundung	20
VIII.	Glossar	23
IX.	Anlage: Anleitung für Core Gene-Panels	24
X.	Quellen / Literaturangaben	25

I. Übersicht der Statements

- Statement 1:** Die Plausibilität der Anforderung einer Hochdurchsatz-Diagnostik wird vom beauftragten humangenetischen Diagnostiklabor geprüft. 6
- Statement 2:** Die Definition eines geeigneten Indikationsbereiches orientiert sich an der Befundkonstellation und dem erwarteten klinisch-diagnostischen Nutzen 6
- Statement 3:** Das Angebot einer Hochdurchsatz-Diagnostik setzt eine öffentlich zugängliche Liste mit krankheitsrelevanten Genen („Zielgene“ im angebotenen Panel) voraus, welche den Untersuchungsumfang für die Befundung definiert. 7
- Statement 4:** Aus einer Hochdurchsatz-Diagnostik-Genliste muss hervorgehen, welche Gene als „Hauptgene“ (Core Genes) mit sehr hoher Qualität (durchweg hohe Qualitätsparameter und in der Regel vollständige technische Abdeckung der Zielregion zu mindestens 99 Prozent, sogenannte Klasse A-Qualität) analysiert und ausgewertet werden. 7
- Statement 5:** Eine Hochdurchsatz-basierte Diagnostik folgt dem bewährten Konzept der Stufendiagnostik, bei dem medizinischer und wirtschaftlicher Nutzen zu beachten sind. 8
- Statement 6:** Eine komplexe Hochdurchsatz-Diagnostik-Untersuchung mit (noch) unklarem Ergebnis kann es erforderlich machen, zunächst die gefundenen Kandidaten-Varianten mit dem Einsender/Kliniker im klinischen und familiären Kontext zu diskutieren, bevor nach Rückmeldung ein abschließender Befund erstellt werden kann. 9
- Statement 7:** Wissenschaftliche Untersuchungen müssen klar als solche gekennzeichnet sein und können nicht ohne Validierung für diagnostische Zwecke eingesetzt werden. 9
- Statement 8:** Ein diagnostischer NGS-Test darf nicht ohne eine Validierung des Verfahrens angeboten werden. 10
- Statement 9:** Zu jedem Hochdurchsatz-Test ist vom Anbieter/Hersteller der (evidenz-basierte) klinisch-diagnostische Nutzen anzugeben. 10
- Statement 10:** Um eine hohe medizinische Qualität sowie Vergleichbarkeit und Transparenz der angebotenen Tests zu gewährleisten, sollten indikationsbezogene „Hauptgen-Listen“ („Core Gene Lists“) von Experten erstellt werden. 11
- Statement 11:** Ein einfaches Klassifizierungssystem auf der Grundlage der Abdeckung der Zielregion sollte die Vergleichbarkeit von Tests zwischen unterschiedlichen Anbietern herstellen. 11
- Statement 12:** Um eine informierte Einwilligung („Informed Consent“) zu ermöglichen, muss der Anbieter für jeden Hochdurchsatz-Test folgende Informationen bereitstellen: 12
- Statement 13:** Die Auswertestrategie muss auf die jeweilige Indikation beziehungsweise das jeweilige Gen-Panel fokussiert sein, um das Risiko von Zusatzbefunden möglichst klein zu halten. 13
- Statement 14:** Der Hochdurchsatz-Test-Anbieter sollte Informationen bereitstellen, welche die Wahrscheinlichkeit von Zusatzbefunden und den Umgang mit ihnen erläutern. 13
- Statement 15:** Wenn der NGS-Test-Anbieter entscheidet, den Patienten auch mögliche Anlageträgerschaften für indikationsferne Erkrankungen mitzuteilen, sollte er eine Opt-In-/ Opt-Out-Prozedur implementiert haben und die notwendigen organisatorischen Maßnahmen zur Umsetzung leisten. 14
- Statement 16:** Der Umgang mit Zusatzbefunden sollte für den Patienten / anfordernden Arzt klar dargestellt sein. 14
- Statement 17:** Schriftliches Informationsmaterial, welches die Inhalte der Aufklärung, eine Beschreibung der Testeigenschaften und Empfehlungen zum Umgang mit Zusatzbefunden enthält, sollte für jeden Test bereitstehen (zum Beispiel online). 14
- Statement 18:** Alle qualitätsrelevanten, bioinformatisch berechneten Daten sollten präzise und nachvollziehbar beschrieben / definiert werden. 15
- Statement 19:** Das Hochdurchsatz-Diagnostiklabor muss eine strukturierte Datenbank betreiben, welche die wichtigsten Qualitätsparameter für die Sequenzier-Plattform, alle Sequenzier-Tests und alle prozessierten Proben enthält. 15

- Statement 20:** Aspekte der Probenverfolgung und die Nutzung von molekularen Barcodes (MIDs) sollten während der Test-Validierung und Plattform-Validierung mitbetrachtet werden. 16
- Statement 21:** Richtigkeit und Präzision sollten Bestandteil der Plattform-Validierung sein. Diese Aspekte müssen nicht testspezifisch wiederholt werden. 16
- Statement 22:** Die bioinformatische Pipeline muss an die genutzte technische Plattform angepasst werden. 17
- Statement 23:** Die analytische Sensitivität und analytische Spezifität müssen während der Pipeline-Validierung für jede DNA-Varianten-Art separat festgestellt werden. 17
- Statement 24:** Das diagnostische Hochdurchsatz-Labor muss alle Elemente der bioinformatischen Pipeline mit Standard-Datensätzen validieren (public domain oder kommerziellen Software-Elemente), wenn relevante Änderungen vorgenommen werden. 17
- Statement 25:** Das diagnostische Hochdurchsatz-Labor muss für alle relevanten Varianten eine strukturierte Datenbank (einschließlich relevanter Annotation) implementieren. 18
- Statement 26:** Das diagnostische Hochdurchsatz-Labor muss alle relevanten Datensätze für die gesetzlich vorgeschriebenen Zeiträume sicher speichern / lagern können. 18
- Statement 27:** Der „befundete Bereich“, d.h. der Anteil der Zielregion, für welche eine verlässliche Genotypisierung hergestellt werden kann, muss während der Test-Entwicklung validiert und sollte dem Einsender kommuniziert werden (im Befund oder elektronisch). 18
- Statement 28:** Die Anforderungen an den „befundeten Bereich“ hängen von der Ausrichtung (Indikation) des Tests ab. 19
- Statement 29:** Sobald relevante Veränderungen am Test vorgenommen werden, müssen wichtige Qualitätsparameter neu geprüft werden und Referenz-Proben erneut prozessiert werden. Das diagnostische Labor sollte vorab festlegen, welche Proben in welchem Umfang zu diesem Zweck erneut prozessiert werden müssen. 19
- Statement 30:** Der Befundbericht eines Hochdurchsatz-Tests muss die Patienten-Identifikation und klinische (Verdachts)-Diagnose, eine kurze Test-Beschreibung, eine Zusammenfassung der Ergebnisse und die Haupteigenschaften auf einer Seite enthalten. 20
- Statement 31:** Die Verfahrensweise zur Mitteilung von genomischen Varianten muss ein diagnostisches Hochdurchsatz-Labor etablieren und dokumentieren, bevor entsprechende Analysen durchgeführt werden. 21
- Statement 32:** Für diagnostische Zwecke sollen nur Varianten in Genen mit einem bekannten (das bedeutet publizierten und bestätigten) Zusammenhang zwischen pathogenen Veränderungen und entsprechenden Phänotypen befundet werden. 22
- Statement 33:** Weil die Klassifizierung von Varianten nicht fixiert sein kann, kann es medizinisch sinnvoll sein von Fall zu Fall eine Re-Evaluation der Klassifizierung nach ACMG-Richtlinie und gegebenenfalls eine Re-Klassifizierung vorzunehmen. 22
- Statement 34:** Diagnostische Labore sollten eine klar beschriebene Prozedur haben, wie mit Zusatzbefunden umgegangen wird, bevor ein Test angeboten wird. 22

II. Präambel

Seltene genetische Erkrankungen sind in der Vergangenheit oft undiagnostiziert geblieben, weil die erforderliche Untersuchung einer großen Anzahl von Krankheitsgenen bei genetisch sehr heterogenen Erkrankungen wie kindlicher Epilepsie oder Entwicklungsverzögerung technisch bedingt häufig nicht durchführbar war. Mit der Verfügbarkeit von robusten und zuverlässigen Hochdurchsatzverfahren konnte für einige Indikationen die Positivrate an diagnostischen bzw. wegweisenden Befunden mindestens verdoppelt werden (Gilissen et al. 2014, Neveling et al. 2013, Srivastava et al. 2014). Diese erhöhte Aufklärungsquote hat zur hohen, fachlich indizierten Nachfrage einer NGS-Diagnostik (Hochdurchsatz-Diagnostik) geführt. Exemplarisch seien hier insbesondere NGS-Untersuchungen bei Kardiomyopathien, angeborenen Hirnfehlbildungen, Stoffwechseldefekten, sowie neurodegenerativen und neurosensorischen Erkrankungen erwähnt (Calvo et al. 2012, DellaMina et al. 2015, Eisenberger et al. 2013, Nemeth et al. 2013, Pugh et al. 2014, Rehm et al. 2013, Schnekenberg et al. 2014, Sikkema-Raddatz et al. 2013).

Die technische Anwendbarkeit von Hochdurchsatzverfahren einschließlich NGS in der humangenetischen Diagnostik ist unbestritten: Gleichzeitig stellen diese Technologien den Anwender im genetischen Labor vor neue Herausforderungen bei der Datenproduktion, der Datenspeicherung, vor allem aber auch bei der bioinformatischen Auswertung und der medizinisch-genetischen Interpretation. Diese Aspekte müssen berücksichtigt werden, um das Potential dieser Diagnostik mit dem größten Nutzen und dem geringsten Risiko für Patienten und deren Familien ausschöpfen zu können.

Diese Leitlinie zielt darauf ab, die Anforderungen für eine Hochdurchsatz-basierte Diagnostik von angeborenen Veränderungen des Erbguts (Keimbahn) zu definieren. Besonderheiten der somatischen Erbgut-Diagnostik, Gendosisanalysen (auch beispielsweise die nicht-invasive Pränataldiagnostik – non-invasive prenatal testing; NIPT) oder diagnostische RNA-Analysen berühren teilweise andere Verfahrensaspekte, die hier ebenso wie Hochdurchsatz-Sequenzierungen bei Nicht-Betroffenen (Carrier-Screening) nicht vordergründig thematisiert sind.

Allgemein gültige Grundlagen der humangenetischen Labordiagnostik, wie sie in der S2-Leitlinie Humangenetische Diagnostik publiziert worden sind, bilden dabei auch die Basis eines humangenetisch-diagnostisch tätigen Hochdurchsatz-Labors.

III. Spezifische Statements für Hochdurchsatz-basierte Diagnostik in Deutschland

Aktuelle Leitlinien und Richtlinien der molekularen Humangenetik sind Ausdruck ständig wachsender Qualitätsanforderungen an die Nukleinsäure-Sequenziermethodik und den daraus resultierenden molekulargenetischen Befund. Darauf basierend hat ein akkreditiertes diagnostisches Labor in der Regel bereits ein validiertes Sequenzanalyse- und Interpretationskonzept etabliert. Die Hochdurchsatz-basierte Diagnostik muss an diesen Standards gemessen werden. Ein durch NGS bedingter Ergänzungsbedarf der derzeitigen Praxis ergibt sich für die vier Bereiche „Indikationsstellung“, „Technische Besonderheiten einer hochdurchsatz-basierten Diagnostik“, „Interpretation von Hochdurchsatz-Daten“ und „Abgrenzung zwischen Diagnostik und Forschung“.

1. Plausibilitätsprüfung der Hochdurchsatz-Diagnostik

Statement 1: Die Plausibilität der Anforderung einer Hochdurchsatz-Diagnostik wird vom beauftragten humangenetischen Diagnostiklabor geprüft.

Kommentar: Die Anwendung eines Hochdurchsatz-basierten Tests kann bei vielen seltenen Erkrankungen sinnvoll sein. Die Indikationsstellung basiert je nach medizinischer Fragestellung auf formalgenetischen, klinischen, laborärztlichen, und/oder apparativ-diagnostischen Befunden. Vom einsendenden Arzt sollte mitgeteilt werden, ob grundsätzlich eine genetische/erbliche Ätiologie angenommen wird, oder ob die genetische Testung eher aus differentialdiagnostischen Erwägungen in Betracht gezogen wird. Zugesandte Aufträge zur Hochdurchsatz-Diagnostik werden anhand der übermittelten klinischen Befunde und Laborbefunde vom beauftragten humangenetischen Diagnostiklabor inhaltlich geprüft (Eingangskontrolle auf Plausibilität der Anforderung) und freigegeben.

Statement 2: Die Definition eines geeigneten Indikationsbereiches orientiert sich an der Befundkonstellation und dem erwarteten klinisch-diagnostischen Nutzen

Der diagnostische und gesundheitsökonomische Vorteil einer Hochdurchsatz-basierten Untersuchung liegt in der parallelen Testung vieler Gene in kurzer Zeit zu vergleichsweise niedrigeren Einzelkosten, wodurch eine gesteigerte diagnostische Aufklärungsquote (Ertrag an diagnostischen Befunden) erreicht wird. Darüber hinaus werden durch Nachweis oder Ausschluß einer genetischen Krankheitsursache zunehmend gravierende therapeutische oder sozialmedizinische Entscheidungen getroffen (beispielsweise müssen ärztliche Behandlungsfehler wie die Bandscheiben-Operation bei einem Patienten mit Hereditärer Spastischer Spinalparalyse, die Entscheidung zur Strahlentherapie statt Operation bei Patientinnen mit erblichen Brust- und Ovarialkarzinom, eine falsche Aneurysma-Operation bei Marfan-Patienten, eine falsche Familienberatung, falsche Diabetes-Therapie bei MODY, falsche Prognoseeinschätzung und Ablehnung einer Höhereinstufung des GdB durch eine Hochdurchsatz-Untersuchung vermieden werden). Dieser Vorteil beziehungsweise die differentialdiagnostisch und differentialtherapeutische Entscheidungsgrundlage kann – je nach Fragestellung – durch Genom-, Exom- oder Multi-Gen-Panel-Sequenzierung erzielt werden.

Evidenzbasierte Publikationsdaten belegen für Indikationsbereiche mit genetisch sehr heterogenen Krankheitsbildern wie bspw. frühkindliche Epilepsie, geistige Entwicklungsstörung, Kardiomyopathie und diverse andere bei hochparalleler Testung eine deutlich erhöhte diagnostische Aufklärungsquote im Vergleich zur bisherigen konventionellen Einzelgendiagnostik. Die Anwendungsbereiche, in denen eine Hochdurchsatz-basierte Diagnostik sinnvoll ist, nehmen kontinuierlich zu. Die diagnostische Aufklärungsquote ist jedoch nicht nur von technischen Parametern abhängig sondern vor allem auch von der jeweils untersuchten Patientenkohorte und deren klinischer Charakterisierung. Für sehr viele genetische Fragestellungen zu seltenen Erkrankungen sind konkrete Zahlen zur diagnostischen Aufklärungsquote deshalb und auch aufgrund der sehr kleinen Fallzahlen jetzt und auf absehbare Zeit nicht verfügbar, für häufigere Indikationen werden sie aus diesen Gründen zwischen verschiedenen Hochdurchsatz-Laboren erheblich variieren.

Zusätzlich kann die diagnostische Aufklärungsquote auch durch die Einbeziehung von Proben weiterer Familienangehöriger erhöht werden. Für einige Indikationsbereiche mit hoher Prävalenz von pathogenen de-novo-Varianten – beispielsweise bei Entwicklungsverzögerung– sind neben der gezielten Untersuchung des Indexpatienten auf der technischen Basis eines großen Gen-Panels oder einer Exom-Sequenzierung auch parallel durchgeführte Kontroll-Untersuchungen der Eltern („Trio-Sequenzierung“) sinnvoll, weil damit das sichere Auffinden von neu-entstandenen pathogenen Varianten (beziehungsweise der sichere Ausschluß von nicht-neu-entstandenen seltenen, unklassifizierten Varianten) für die diagnostische Fragestellung möglich ist. Gerade die Entscheidung, ob nur der Index oder ein Trio untersucht werden muss, hat also direkten Einfluss auf die geschätzte diagnostische Aufklärungsquote und die entstehenden Testkosten.

Soll eine Hoch-Durchsatz-Diagnostik im Rahmen der pränatalen Untersuchung einer auffälligen Schwangerschaft zur Anwendung kommen, gilt insbesondere, dass das Ausmaß der Untersuchung und Befundung vorab mit der Schwangeren und dem beauftragten Labor besprochen und schriftlich dokumentiert worden sind. Für den gezielten Nachweis oder Ausschluß von familiären Mutationen im Rahmen einer Pränataldiagnostik sind Hochdurchsatz-Verfahren in aller Regel nicht geeignet.

Statement 3: Das Angebot einer Hochdurchsatz-Diagnostik setzt eine öffentlich zugängliche Liste mit krankheitsrelevanten Genen („Zielgene“ im angebotenen Panel) voraus, welche den Untersuchungsumfang für die Befundung definiert.

Die Auswahl der untersuchten Gene muss mit Sorgfalt erfolgen und sich idealerweise an Leitlinien oder an Konsensus-Genlisten von Expertengruppen anlehnen. Die Auswahl darf nur Gene enthalten, für die ein Zusammenhang mit dem untersuchten Phänotyp belegt bzw. sehr wahrscheinlich ist (siehe insbesondere die Arbeiten des ClinGen-Konsortiums (Rehm et al., 2015)). Grundsätzlich kann diese Genliste auf der Ebene der Anreicherung/Sequenzierung („technische Genliste“) oder auf der Ebene der Auswertung („bioinformatische Genliste“) definiert werden.

Statement 4: Aus einer Hochdurchsatz-Diagnostik-Genliste muss hervorgehen, welche Gene als „Hauptgene“ (Core Genes) mit sehr hoher Qualität (durchweg hohe Qualitätsparameter und in der Regel vollständige technische Abdeckung der Zielregion zu mindestens 99 Prozent, sogenannte Klasse A-Qualität) analysiert und ausgewertet werden.

Damit sollen Hochdurchsatz-Diagnostikangebote transparent und vergleichbar gemacht und gleichzeitig eine sichere und vollständige Untersuchung von mindestens 99 Prozent der kodierenden Sequenz der Hauptgene

sichergestellt werden. Es ist zu berücksichtigen, dass NGS-basierte Untersuchungen aktuell möglicherweise relevante Mutationstypen (wie Repeat-Expansionen, Gendosismutationen und weitere) nicht oder nicht mit ausreichender Sensitivität erfassen können. Entsprechende Einschränkungen bzw. Empfehlungen zur Stufendiagnostik in Kombination mit anderen diagnostischen Methoden müssen vorab vom Diagnostik-Anbieter kommuniziert werden. Eine Arbeitsanleitung für die Erstellung einer Core Gene-Liste befindet sich in der Anlage. Details zur Definition von Qualitätsstandards (Klasse A, B, und C) finden sich bei Matthijs et al., 2016.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 07; Zeile 380-408:

A new rating scheme for diagnostic NGS

Laboratories will apply different (technical and diagnostic) settings for NGS tests, irrespective of guidelines. Indeed, there are too many variables still that cannot be fixed through prescriptive guidelines. Therefore, we propose a simple rating system for NGS diagnostics that will warrant fair scoring and easy comparison between what different labs are offering.

1. Type A test

This is the most complete analysis, as far as NGS is concerned. The lab warrants > 99% reliable reference or variant calls of the coding region and flanking intronic sequences, and fills all the gaps with Sanger sequencing (or another complementary sequencing analysis) and, depending on the platform used, performs extra analysis of e.g. the homopolymer stretches. This is the highest level of exactitude a lab could offer for NGS at the current stage. In a type A test, all genes of the panel are comprehensively covered.

2. Type B test

The lab describes exactly which regions are sequenced at > 99 % reliable reference or variant calls, and fills some of the gaps with Sanger (or other) sequencing. This would be a respectable assay for confirming a diagnosis, but not for excluding it. In a type B test, the core genes would be comprehensively covered, in the way that was discussed earlier.

3. Type C test

The type C test solely relies on the quality of NGS sequencing, while no additional Sanger (or other) sequencing is offered. This would be the case, for instance, if gene panels are selected from exome sequencing, without any additional sequencing to complete the analysis. Therefore, the results of a type C test would often not fulfil the criteria for a core gene list.

Statement 5: Eine Hochdurchsatz-basierte Diagnostik folgt dem bewährten Konzept der Stufendiagnostik, bei dem medizinischer und wirtschaftlicher Nutzen zu beachten sind.

Wegweisende gendiagnostische/Hochdurchsatz-Befunde können in vielen Fällen eine aufwendige und für den Patienten oft belastende apparative Zusatzdiagnostik reduzieren, bzw. eine diagnostische Odyssee vermeiden. Der Aufwand der Hochdurchsatz-Diagnostik ist an ihren möglichen Vorteilen für Therapie, Betreuung und Beratung zu messen. Somit hat die Hochdurchsatz-Diagnostik auch gesundheitsökonomische Aspekte. Zur Vermeidung von Zusatzbefunden sollte der analysierte Bereich auf die jeweils klinisch relevanten Gene beschränkt werden (s.a. Stellungnahme der GfH zu genetischen Zusatzbefunden in Diagnostik und Forschung vom 28.5.2013). Soweit medizinisch sinnvoll sollte eine genetische Stufendiagnostik unter Einbeziehung weiterer Methoden (z.B. Chromosomenanalyse, Molekulare Karyotypisierung oder Repeatlängenbestimmung) in der differentialdiagnostischen Abklärung erfolgen.

2. Technische Besonderheiten einer Hochdurchsatz-basierten Diagnostik

Die Expertengruppe ist sich einig, dass insbesondere die aktuelle EuroGenTest-NGS-Diagnostik-Leitlinie praktisch alle relevanten technischen Definitionen enthält (Matthijs et al., 2016). Die wichtigsten Statements

werden im folgenden Kapitel übernommen, kommentiert und, wo erforderlich, an Normen und gesetzliche Vorgaben in Deutschland angepasst.

3. Interpretation von Hochdurchsatz-Diagnostik

Statement 6: Eine komplexe Hochdurchsatz-Diagnostik-Untersuchung mit (noch) unklarem Ergebnis kann es erforderlich machen, zunächst die gefundenen Kandidaten-Varianten mit dem Einsender/Kliniker im klinischen und familiären Kontext zu diskutieren, bevor nach Rückmeldung ein abschließender Befund erstellt werden kann.

Die Interpretation von Hochdurchsatz-Diagnostik erfolgt bei Hochdurchsatz-Diagnostik-Panels mit unklarem Ergebnis in der Regel zweischrittig. Zunächst werden Varianten klassifiziert, die dann im Kontext der Fragestellung, der klinischen Angaben und der Familien-Anamnese interpretiert werden. Bei unklarem Ergebnis kann ein Befund entstehen, der auch vom Auftraggeber im klinischen Kontext mit beurteilt werden muss.

4. Abgrenzung zwischen Diagnostik und Forschung

Statement 7: Wissenschaftliche Untersuchungen müssen klar als solche gekennzeichnet sein und können nicht ohne Validierung für diagnostische Zwecke eingesetzt werden.

Eine klare Definition von diagnostischen Analysen in Abgrenzung zu wissenschaftlichen Analysen ist notwendig, um den Wert von in der Regel teuren (Validierung von Testsystemen) diagnostischen Untersuchungen gegenüber den oft über Forschungsgelder abgedeckten wissenschaftlichen Untersuchungen darzustellen. Dabei spielen insbesondere analytische Aspekte wie die Sicherheit bei der Probenprozessierung, der bioinformatischen Analyse und der Varianteninterpretation eine wichtige Rolle. Darüber hinaus ist die Patientensicherheit durch Definition der Analyseinhalte, die durch die Aufklärung abgedeckt sind und mitgeteilt werden dürfen, zu gewährleisten.

IV. Statements und Kommentare, die aus der Eurogentest-Leitlinie übernommen wurden

Statement 8: Ein diagnostischer NGS-Test darf nicht ohne eine Validierung des Verfahrens angeboten werden.

Statement 9: Zu jedem Hochdurchsatz-Test ist vom Anbieter/Hersteller der (evidenz-basierte) klinisch-diagnostische Nutzen anzugeben.

Kommentar: Der diagnostische Nutzen ergibt sich in den meisten Fällen aus der „Aufklärungsquote“ (diagnostic yield) der Untersuchung für die klinische Indikation. Dabei kann der klinisch-diagnostische Nutzen auch bei vergleichsweise kleiner „diagnostischer Aufklärungsquote“ überragend relevant sein (siehe auch Kommentierung zu Statement 2). Die „diagnostische Aufklärungsquote“ im Sinne eines gesundheitsökonomisch nutzbaren Parameters definiert sich als Wahrscheinlichkeit die krankheitsverursachende Veränderung zu finden bezogen auf die untersuchte Patientenkohorte. Dabei wird klar, dass sowohl die Sensitivität der Hochdurchsatz-Methode als auch die klinischen Merkmale der Patientenkohorte wichtige Einflußfaktoren darstellen. Sie definiert den Nutzen einer Untersuchung aus klinischer Sicht, also bezogen auf die Indikation. Unter dem Gesichtspunkt der „diagnostischen Aufklärungsquote“ müssen eine „Hauptgen-Liste“ und ein „diagnostischer Algorithmus“ entwickelt werden (siehe unten). Dabei stellt die „diagnostische Aufklärungsquote“ keinen Labor-Qualitätsparameter dar. Die analytische Qualität wird durch Sensitivität und Spezifität definiert.

Die „diagnostische Aufklärungsquote“ ist also ein Indikator für die Effizienz eines Tests jenseits der einfachen analytischen Beschreibung und kann für das anbietende Labor, aber auch für das Gesundheitssystem, als Steuerungsinstrument genutzt werden. Bei einer Erkrankung, die ausschließlich durch Mutationen in einem Gen verursacht wird – beispielsweise die Cystische Fibrose (CF) mit Mutationen im *CFTR*-Gen – wird auch die Testung aller CF-Patienten für weitere Gene die diagnostische Aufklärungsquote nicht steigern können. Im Gegensatz dazu werden bei genetisch und klinisch heterogenen Erkrankungen (wie bei der hypertrophen Kardiomyopathie), bei denen keine Häufungen von Mutationen in einigen der über 40 Krankheitsgene bekannt sind, Hochdurchsatz-Gen-Panels mit allen bekannten HOCM-Genen die diagnostische Aufklärungsquote deutlich steigern können (Mook et al. 2013).

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 04; Zeile 240-265:

*The diagnostic yield is not a lab quality parameter (for this we use sensitivity and specificity) but may be a good indicator of the efficiency of the test beyond its analytical aspects and of the test clinical utility. It can also be used as a managerial tool, at the level of the laboratory or by the healthcare care system. For a disorder that is, in almost all cases, caused by a mutation in a single gene, testing a set of 10 or more genes with low, individual mutation detection rates is not beneficial from a clinical or healthcare point of view. For example, *CFTR* is the only gene known to cause cystic fibrosis (CF) and mutations in this gene are detected in over 98% of patients, even though mutations in handful of other genes are known to cause a CF like phenotype. Testing all patients with the clinical diagnosis of CF for a large number of genes using NGS will not necessarily yield a higher mutation detection rate (diagnostic yield) in patients, at least not at comparable costs. Testing other genes may be considered after mutations in *CFTR* have been excluded. In contrast, for genetically and clinically heterogeneous diseases, where many different genes are known to be involved without a major contribution by a single gene, NGS analysis of large gene panels will substantially increase the diagnostic yield. For example, the number of genes known to cause cardiomyopathies has increased spectacularly over the past years. To date, over 50 genes are recognized as causal for either or both dilated cardiomyopathies (DCM) and hypertrophic cardiomyopathies (HCM). Sequencing all those genes in one test does increase the detection rate at considerably lower costs¹⁶.*

The decision whether or not to use a NGS approach should not only be based on the expected diagnostic yield and the benefit for the patient population, but also on financial grounds. It may thus depend on the number of patients being analyzed. Sequencing six genes using Sanger sequencing may be the method of choice when the test is only requested for few patients per year. Analyzing larger numbers of patients will favor the choice for NGS. In this light, it has been shown that NGS scanning of BRCA1 and BRCA2 will be profitable in most laboratories, eventually¹⁷. It is expected that in the near future this scale will tip more often towards NGS, as new technologies are emerging fast. Also reorganization of smaller genetic laboratories into larger diagnostic hubs as genetic testing is mainstreamed will make NGS a more preferable option.

Statement 10: Um eine hohe medizinische Qualität sowie Vergleichbarkeit und Transparenz der angebotenen Tests zu gewährleisten, sollten indikationsbezogene „Hauptgen-Listen“ („Core Gene Lists“) von Experten erstellt werden.

Kommentar: Sofern eine Hauptgen-Liste bisher nicht durch Leitlinien oder eine unabhängige Expertengruppe definiert worden ist, sollte ein Diagnostiklabor zunächst selbst Hauptgene definieren, welche dann in Klasse-A Qualität untersucht werden sollten. Darüber hinaus können auch konsentrierte Hauptgen-Listen anhand der aktuellen Literatur modifiziert werden. Eine Anleitung zur Erstellung von Hauptgenlisten findet sich im Anhang dieser Leitlinie.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 06; Zeile 300-307 und 310-312:

In summary, the ideas about a core gene list are the following:

- *the list must result in a ‘substantial contribution’ to the quality of life of a patient, and hence the genes must be chosen with care;*
 - *a two-tier system would be acceptable, whereby some genes are scrutinized more in detail (in other words: with a more complete coverage) than others;*
 - *the list must not inflict with the efficiency of a service, i.e. overzealous testing is not helpful;*
 - *the use of core gene panels must lead to better diagnosis of the group of disorders, if not it lacks clinical utility.*
- Consensus between labs about the core set promotes uniformity in testing between different laboratories and ensures equity of testing for patients from different regions. The statement also relates to the requirement of ISO15189 that the tests, which are being offered, have to be clinically relevant.*

Statement 11: Ein einfaches Klassifizierungssystem auf der Grundlage der Abdeckung der Zielregion sollte die Vergleichbarkeit von Tests zwischen unterschiedlichen Anbietern herstellen.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 07; Zeile 380-408 und 411-433:

A new rating scheme for diagnostic NGS

Laboratories will apply different (technical and diagnostic) settings for NGS tests, irrespective of guidelines. Indeed, there are too many variables still that cannot be fixed through prescriptive guidelines. Therefore, we propose a simple rating system for NGS diagnostics that will warrant fair scoring and easy comparison between what different labs are offering.

1. Type A test

This is the most complete analysis, as far as NGS is concerned. The lab warrants > 99% reliable reference or variant calls of the coding region and flanking intronic sequences, and fills all the gaps with Sanger sequencing (or another complementary sequencing analysis) and, depending on the platform used, performs extra analysis of e.g. the homopolymer stretches. This is the highest level of exactitude a lab could offer for NGS at the current stage. In a type A test, all genes of the panel are comprehensively covered.

2. Type B test

The lab describes exactly which regions are sequenced at > 99 % reliable reference or variant calls, and fills some of the gaps with Sanger (or other) sequencing. This would be a respectable assay for confirming a diagnosis, but not for excluding it. In a type B test, the core genes would be comprehensively covered, in the way that was discussed earlier.

3. Type C test

The type C test solely relies on the quality of NGS sequencing, while no additional Sanger (or other) sequencing is offered. This would be the case, for instance, if gene panels are selected from exome sequencing, without any additional sequencing to complete the analysis. Therefore, the results of a type C test would often not fulfil the criteria for a core

gene list. The lab would still be bound to specify what the reportable range would be, according to the instructions given in section on validation.

Adding MLPA and independent assays for repeat expansions may further increase the sensitivity of the test, but this aspect belongs to the 'diagnostic routing' rather than to the scoring system, presented here. The scoring system solely applies to the sequencing – by means of NGS, Sanger or other – of the region of interest, otherwise the scoring system would become too complicated or would require further (sub)classification. Admittedly, the scoring system will have to be updated when deletion and duplication analysis will be intrinsically covered by NGS, but the principles would remain the same.

In addition, it should allow people – patients, referring doctors, as well as private or public reimbursement agencies – to compare the tests and the prices. We propose that the labs should mention this rating on their clinical reports and websites. For instance, a laboratory that uses a targeted capture assay for, say 10 or 20 genes, and warrants Sanger sequencing of all the genomic regions where reliable calls cannot be obtained or guaranteed by NGS, would be allowed to publicize its test as a 'type A diagnostic NGS test'. As a result, most currently available tests are probably 'type B diagnostic NGS tests', except when no additional experiments are done to fill NGS gaps by Sanger (or other); in the latter case, the test would get the default 'type C diagnostic NGS test' rating. Note that, even for offering type C test, the (accredited) diagnostic lab is bound to calculate the quality parameters, mentioned in the section on validation, and provide this information in the report (see section on reporting).

A database for NGS panels is currently being compiled by EuroGentest, and will eventually be made available through Orphanet (J. Schmidke, M. Stuhmann, personal communication). Such a database could adopt the above scoring system, to ease the comparison between the test offer of the different laboratories – or even make it a requisite for inclusion in the database. In this way, the scoring system will become important for quality assurance as well. If professional, national or international organizations issue minimal test criteria for certain disease(s), a laboratory's offer would be evaluated against these criteria. This also implies that research laboratories that deliver "diagnostic results" have to adopt similar standards (see section on reporting).

Eventually, the system could be completed with a utility score, which would focus on the clinical pertinence of a specific test. In this way, one could imagine that a two-dimensional frame would be generated, with the described 'technical' score on one axis, and a 'clinical' score on the other axis. Any particular test and disease combination could then be scored. It is a concept and has to be further developed.

V. Einwilligungserklärung

Diese Statements wurden praktisch unverändert aus der EuroGentest-Richtlinie übernommen.

Statement 12: Um eine informierte Einwilligung („Informed Consent“) zu ermöglichen, muss der Anbieter für jeden Hochdurchsatz-Test folgende Informationen bereitstellen:

- a. die Erkrankungen, die mit dem Test untersucht werden können, sowie insbesondere auch Erkrankungen, die nicht im Zusammenhang mit den Gesundheitsstörungen des Untersuchten stehen und die als Zufallsbefunde erfasst werden könnten.
- b. die zu untersuchenden Gene
- c. den zu befundenden Bereich („reportable range“)
- d. die analytische Sensitivität und Spezifität

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 08; Zeile 503-511.

This information should be available either on the laboratory website or upon request.

The implications – or side effects, to put it frankly - of a test based on NGS are mainly based on the chance of unsolicited and secondary findings. While unsolicited findings are found in the genes linked to the tested disease, secondary findings are found in disease genes not implicated in the etiology of the tested disease. Secondary findings are not an issue in the case of targeted sequencing but are particularly important in case of WES or WGS. Since the results of a diagnostic test should be primarily directed towards answering the question related to the medical condition of a patient (see section on

distinction between research and diagnostics), it is advised to use a gene panel approach (either targeted capture or targeted analysis).

Statement 13: Die Auswertestrategie muss auf die jeweilige Indikation beziehungsweise das jeweilige Gen-Panel fokussiert sein, um das Risiko von Zusatzbefunden möglichst klein zu halten.

Wenn das Einverständnis des Patienten nicht den Umgang mit Zusatzbefunden umfasst, dürfen über die medizinische Fragestellung hinausgehende Varianten nicht beobachtet, dokumentiert oder berichtet werden. Im Gegensatz dazu stellen Zusatzbefunde beispielsweise für behandelbare Erkrankungen (siehe auch die ACMG Genliste; Green et al., 2013) nach entsprechender Aufklärung und Dokumentation des Einverständnisses kein Risiko sondern einen zusätzlichen Nutzen von genetischen Hochdurchsatzanalysen dar. Ähnlich können Informationen zur pharmakogenetischen Disposition der untersuchten Patienten betrachtet werden.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 09; Zeile 514-523.

The chance of unsolicited findings in a gene panel is very low and is mainly dependent on the genes involved. Indeed some genes (and even some specific mutations) in a gene panel can be involved in diseases not related to the clinical phenotype: a gene panel for movement disorders may contain the ATM gene involved in ataxia-telangiectasia, but with specific mutations having breast cancer susceptibility. In such a case the chance of unsolicited findings cannot be avoided. Furthermore, one always has to be aware of the fact that heterozygous mutations in recessive conditions might be detected, thereby detecting disease carriers which might have consequences for reproduction, especially in consanguineous families. While unsolicited findings and carrier status should be described in the main report, secondary findings, if provided, should be described in a separate report (see section on reporting).

Statement 14: Der Hochdurchsatz-Test-Anbieter sollte Informationen bereitstellen, welche die Wahrscheinlichkeit von Zusatzbefunden und den Umgang mit ihnen erläutern.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 10; Zeile 525-559.

Information on the risk of unsolicited findings might be specified by stating a risk for certain genes in the panel, as done in the examples given in the previous paragraph. However, this may not be straightforward: on one hand, the laboratory may not be capable of giving a comprehensive evaluation of the risk for the known genes (especially if the panel is large); while on the other hand, the risks are often not very clear and might even be unknown at the time the test is performed. The laboratories might have to provide a general statement about the fact that the results of a gene panel analysis might involve broader phenotypes than the disease initially tested for. Hence, it will also be related to the kind of test that is being offered.

In any case, the physician should consider – and check - a number of features before prescribing a NGS test:

- 1. Technical aspects, i.e. be aware that this is a comprehensive test versus a simple gene test, while the sensitivity may still be limited, depending on the disease;*
- 2. The risk for unsolicited and secondary findings for the specific NGS test being offered;*
- 3. The diagnostic indication, i.e. the appropriate test has to be prescribed (see section on diagnostic/clinical utility);*
- 4. The latter implicates the provision of extensive clinical information to the laboratory, knowing that this information is essential for the correct interpretation of the results and for the writing of an adequate report. In this context, it is noted that in some countries, the laboratory has a duty (e.g. in Germany) or a right (e.g. in Belgium) to refuse a genetic test, if it is not properly ordered. This principle should be applied to NGS tests as well.*

If the doctor is uncertain about any of the above, he or she should seek advice or refrain from requesting the NGS test. The clinician must have a contact person responsible for NGS tests. The laboratory should advise whom to contact for further information.

Evidently, the quality with which the unsolicited and secondary findings are interpreted (in terms of pathogenic versus neutral versus ‘unknown significance’) should be the same as for the rest of the test.

Protocol for dissemination of unsolicited and secondary findings

Before implementing a NGS-based test, the clinical (genetic) centre needs to set up an ‘unsolicited and secondary findings protocol’ which has to be in accordance with the decisions of an ethical committee. It should be decided whether patients are offered opt-in, opt-out options to get additional information besides the initial diagnostic result. If these options are provided, the different outcomes should be classified based on the severity of a disease, the age of onset, mortality, existence of effective treatment, etc. Useful classification models have already been published^{20,21}, but the

options that can be offered are highly dependent on local policies. The protocol should also specify whether unsolicited findings and carrier status are reported.

Statement 15: Wenn der NGS-Test-Anbieter entscheidet, den Patienten auch mögliche Anlageträgerschaften für indikationsferne Erkrankungen mitzuteilen, sollte er eine Opt-In-/ Opt-Out-Prozedur implementiert haben und die notwendigen organisatorischen Maßnahmen zur Umsetzung leisten.

In Deutschland sind hier insbesondere auch die Vorgaben des GenDG zu beachten und den Ausführungen der GEKO in der jeweils aktuellen Fassung Folge zu leisten.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 11; Zeile 562-572.

Unsolicited findings and carrier status on genes included in the tested gene panel should be reported in the main report. Secondary findings should be described in a separate report.

The availability of a multidisciplinary committee of experts or a local ethical board that can be assembled on an ad hoc basis to discuss the return of a debatable secondary finding to the referring physician is optional. If no ethical board is available, e.g. in the case of a commercial laboratory offering NGS testing in a clinical context, a board of experts should be consulted on a regular basis to discuss on how to deal with unsolicited finding and to determine whether the results are actionable or not. The board could consist of at least 3 experts with clinical experience, including board certified human geneticists and the clinician(s) of other specialties, directly involved in the care of the individual case, should be consulted. The cases and the outcome of the discussions should be documented in a quality-managed form and signed by the board members.

Statement 16: Der Umgang mit Zusatzbefunden sollte für den Patienten / anfordernden Arzt klar dargestellt sein.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 12; Zeile 575-577.

Pre-test genetic counselling is necessary and should include a discussion on both expected results and the potential for unsolicited and secondary findings. Both unsolicited and secondary findings have to be defined and the policy of the laboratory on the dissemination of those findings should be outlined.

Statement 17: Schriftliches Informationsmaterial, welches die Inhalte der Aufklärung, eine Beschreibung der Testeigenschaften und Empfehlungen zum Umgang mit Zusatzbefunden enthält, sollte für jeden Test bereitstehen (zum Beispiel online).

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 13; Zeile 580-584.

Information should be provided about the interpretation of results, especially the fact that this interpretation may alter with increasing knowledge. The concept of unsolicited and secondary findings needs to be discussed in the pre-test phase. A written informed consent is recommendable and is compulsory in some centres, but may not be required unless several options for returning the results of unsolicited and secondary findings can be chosen.

VI. Validierung

Alle Komponenten eines diagnostischen Tests müssen vor dem Einsatz am Patienten validiert werden. Für NGS-basierte diagnostische Analysen sollten die Richtigkeit, analytische Präzision, analytische Sensitivität, Spezifität, der befundete Bereich („reportable range“) und der Referenzbereich empirisch bestimmt und validiert werden (Gargis et al. 2012). Diese Parameter werden während der **technischen („Plattform-Validierung“)**, der **bioinformatischen („Pipeline-Validierung“)** bzw. der **Test-Validierung** erhoben und sind

oft nicht unabhängig voneinander bestimmbar. Insofern kann eine Validierung oft nur übergreifend stattfinden.

Plattform-Validierung: Der technische Prozess schließt nicht nur das Sequenziergerät, sondern auch die DNA-Isolation, DNA-Bibliothek-Produktion, gegebenenfalls die Anreicherung und die geräte-spezifische Datenprozessierung mit ein. Die Plattform-Validierung stellt fest, dass ein System in der Lage ist, Nukleotid-Sequenzen korrekt zu bestimmen (Gargis et al. 2012). Sie sollte auch ermitteln, wie akkurat verschiedene DNA-Varianten detektiert werden können.

Pipeline-Validierung: Weil die NGS-Daten immer nur nach einer bioinformatischen Prozessierung ausgewertet werden können, bezieht sich die Plattform-Validierung sehr eng auf die Pipeline-Validierung. Die analytische Sensitivität und Spezifität sollte während der Pipeline-Validierung ermittelt werden.

Test-Validierung: Eine Test-Validierung umfasst alle Schritte im Ablauf vom Probeneingang mit DNA-Präparation bis zur Ergebnisliste der befundbaren Varianten. Die Priorisierung von Varianten und die medizinische Interpretation werden normalerweise von der Test-Validierung ausgenommen, weil letztere nur in Bezug auf die klinische Fragestellung, die Literaturerkenntnisse und andere äußere Umstände zustande kommen. Diese Einflussfaktoren variieren erheblich. Die Test-Validierung ist nicht ohne Plattform- und Pipeline-Validierung möglich. Aus praktischer Sicht erscheint es sinnvoll, diese Validierung auf genomische Regionen zu konzentrieren, die befundet werden sollen. Die Test-Validierung sollte schlussendlich belegen, dass der Hochdurchsatz-Test in der Lage ist, Varianten in der definierten Zielregion reproduzierbar aufzufinden ohne unverhältnismäßig viele falsch-positive Beobachtungen zu machen.

Statement 18: Alle qualitätsrelevanten, bioinformatisch berechneten Daten sollten präzise und nachvollziehbar beschrieben / definiert werden.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 14; Zeile 705-709.

Especially the details of the calculation of a metric should be well-documented to make the interpretation of the metric clear. To facilitate automated handling of Quality Control (QC) values, quality metrics should be defined and documented in a uniform terminology and standardized file formats should be used. For example, the qcML project⁵¹ maintains a generic XML file format for storing QC data and an ontology of QC terms for proteomics and genomics.

Statement 19: Das Hochdurchsatz-Diagnostiklabor muss eine strukturierte Datenbank betreiben, welche die wichtigsten Qualitätsparameter für die Sequenzier-Plattform, alle Sequenzier-Tests und alle prozessierten Proben enthält.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 15; Zeile 711-722.

NGS technology requires the monitoring of run specific features such as the number of samples pooled, the proportion of clusters assigned to each sample and the base quality score by position. Every sequencing runs have to be monitored whether or not the instrument specifications are met. Moreover, there should be a definition of minimal requirements for important quality measures (i.e. base quality, read length, etc. depending on platform characteristics). Analysis/sample specific features such as informative coverage, uniformity of coverage, strand bias, GC bias, mapping quality, proportion of reads mapped, proportion of duplicated reads, proportion of target covered at minimum coverage depth, proportion of target not covered, mean coverage, calling accuracy, number of variants and transition/transversion ratio also have to be monitored. Some of the QC measures that should be routinely monitored for all samples are described in more details in Supplementary table 2.

Statement 20: Aspekte der Probenverfolgung und die Nutzung von molekularen Barcodes (MIDs) sollten während der Test-Validierung und Plattform-Validierung mitbetrachtet werden.

Hierbei ist insbesondere von Bedeutung, ob nicht-zugeordnete Sequenzinformationen im Sinne einer Kontamination (beispielsweise mit nicht-humaner DNA) oder eine mögliche Probenverwechslung (Detektion von Barcodes, die nicht für die Prozessierung eingesetzt waren) beobachtet wurden.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 16; Zeile 725-732 und 735-753.

Monitoring data should not be reported but used as continuous validation.

It is important to keep track of exceptions such as the number of times that a sample has been sequenced to reach the defined quality criteria and the correction of eventual sample swaps. A sample tracking method should be used since NGS workflows are very complex and comprise multiple processing steps both in the lab and during the computational analysis. For example, common SNPs could be included as enrichment targets and genotyped by independent methods (i.e. Sequenom or qPCR genotyping; see Supplementary table 3). Samples that have been swapped and for which the swap cannot be explained should not be considered for the diagnostic report.

The proportion of un-mapped reads and un-assigned MIDs should also be tracked as it can help identifying grossly deviant samples/analyses (due to contamination during the workflow). Contamination can also be detected by checking the allele balance at homozygous reference sites or by finding discrepancies between the genotypes from the data and those from an independent sample tracking method. Finally, comparisons and monitoring between different assays should be achieved by generic enrichment contents. Indeed, quality control regions can be added to all panels/exome enrichments in addition to the SNPs for sample identification. Calculating the number of aberrant base calls (non-wild type calls), invalid base calls (denoted as base 'N') and sporadic indels in those regions would help identifying deviant samples. Moreover benchmarking these parameters allows for a direct comparison of different versions of a diagnostic test as well as for inter-test comparisons. Different sequencing platforms, enrichment methods, etc. could be compared and these regions would allow for proficiency testing. Of course, the variants called in quality control regions have to be excluded from the quality metrics calculations. We propose to use three large exons located on different chromosomes for generic enrichment (Supplementary table 4). The use of three regions instead of one provides a backup in case of large deletions or enrichment problems. Exons are used since they are already contained in exome enrichments and, thus, have to be added as custom content to panels only. The selected exons contain between 0 and 6 SNVs per individual (2 SNVs on average) but do not contain known indels. As an example, the count of indels in these regions allowed the detection of a sequencer control crash that led to one missing base in each read.

Statement 21: Richtigkeit und Präzision sollten Bestandteil der Plattform-Validierung sein. Diese Aspekte müssen nicht testspezifisch wiederholt werden.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 17; Zeile 763-766 und 769-788.

Platform validation

During platform validation, the laboratory has to make sure that all its devices and reagents satisfy the manufacturers' requirements. The limitations of each technology must be identified and taken into account during test development and data analysis.

Accuracy can be established by determining the discrepancy between a measured value and the true value, i.e. for NGS the most up-to-date reference sequence. Adequate coverage needed is dependent on the type of variation present in the sequence and its copy number. This parameter and thresholds for allelic read percentage therefore should be determined empirically and validated during test validation. Less coverage is needed to accurately detect homozygous or hemizygous SNPs than heterozygous SNPs.

Precision refers to the agreement between replicate measurements of the same material. An adequate number of samples (minimum 3) should be analyzed to establish precision by assessing reproducibility (between-run precision) and repeatability (within-run precision) during test validation. Repeatability can be established by preparing and sequencing the same samples multiple times (minimum 3) under the same conditions and evaluating the concordance of variant detection and performance. Reproducibility assesses the consistency of results from the same sample under different conditions such as between different runs, different sample preparations, by different technicians, and using different instruments. A concordance between 95 and 98% would be satisfactory⁶.

Reference range is defined as "the range of test values expected for a designated population of persons"⁵. For NGS, it is "the normal variation of sequence within the population that the assay is designed to detect." In other words, any variant detected that is not known as normal should be considered as potentially pathogenic, and may require additional

investigation, e.g. by using an automated prioritization tool to establish the clinical significance. This distinction between a normal and disease-associated variant obviously is not always well defined. Also cataloging known normal and disease-associated variants in databases will be invaluable (see section on reporting).

Statement 22: Die bioinformatische Pipeline muss an die genutzte technische Plattform angepasst werden.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 18; Zeile 790-794 und 796-807.

Analysis pipeline validation

Evidently every sequencing technology harbors its strengths and weaknesses. The bioinformatics tools must reflect these characteristics. For example, variants within homopolymer regions should be carefully looked at in pyrosequencing and semiconductor sequencing, while dual-color sequencing by hybridization warrants specific color spacing procedures. During pipeline validation the diagnostic specifications must be measured by assessing analytical sensitivity and specificity. Several methods can be used to do so:

- the comparison of genotypes called from the diagnostic test with SNP array genotypes; however such a comparison might be biased since dbSNP variants included in most SNP arrays are usually used to train and enhance the genotyping algorithms;
- a blind comparison of genotypes called from the diagnostic test with Sanger confirmed variants, the drawback of this method being the low number of variants usually available;
- the comparison of genotypes called using two different NGS technologies;
- the analysis of an artificial dataset in which true variants and errors are known;
- the resequencing and/or analysis of well characterized publically-available DNA samples such as 1000 Genomes project DNA samples available via Coriell repositories while the corresponding sequencing datasets are accessible⁵².

Statement 23: Die analytische Sensitivität und analytische Spezifität müssen während der Pipeline-Validierung für jede DNA-Varianten-Art separat festgestellt werden.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Informatio ; Statement 19; Zeile 808-817.

The availability of very well characterized samples is the ideal situation and approaches are made towards a “platinum” data set (GenomeInABottle consortium⁵³). The latter project provides open data access for an exhaustively sequenced three generation family for which DNA samples can be ordered via the Coriell repository. Consensus variant lists from sequencing data for three to five different technical platforms which have been fully validated by cross-checks or additional methods are available. DNA samples of these individuals can be used for platform and bioinformatic pipeline validation as well as for the comparison of bioinformatics tools^{54,55}. In accordance with validation procedures set forth for Sanger sequencing validation², we suggest to validate about 300 variants per platform in order to specify the sensitivity and specificity of the system. Increasing the number of validated variants would increase the accuracy with which sensitivity and specificity are determined.

Statement 24: Das diagnostische Hochdurchsatz-Labor muss alle Elemente der bioinformatischen Pipeline mit Standard-Datensätzen validieren (public domain oder kommerziellen Software-Elemente), wenn relevante Änderungen vorgenommen werden.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 20; Zeile 820-833.

Obviously, the same rules apply to commercial software and proprietary or public software used or developed by the lab. Usually, updating the content of capture probes, selector probes or amplicons will not greatly affect these characteristics but the bioinformatics pipeline interdepends on the chemistry and the chosen enrichment. Therefore, any changes in chemistry, enrichment protocols or the bioinformatics analysis platform will warrant re-validation. Usually, the number of samples to use when repeating the analysis for revalidation should correspond to the number of samples of a normal test (e.g. 6 exomes on 2 lanes of HiSeq2500).

In general, the laboratories are encouraged to perform proficiency testing once the test has been validated, and participate in External Quality Assessment (EQA) schemes as soon as they will be available. This is a requirement of the ISO 15189 norm for the accreditation of medical laboratories, but also effective in monitoring performance in the laboratories. In this context, laboratories are also invited to share well-characterized samples and data files to collaboratively improve and standardize practice for diagnostics.

Statement 25: Das diagnostische Hochdurchsatz-Labor muss für alle relevanten Varianten eine strukturierte Datenbank (einschließlich relevanter Annotation) implementieren.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 21; Zeile 837-844.

An in-house database containing all relevant variants provides an important tool in order to identify platform-specific artifacts, keep track of validation results, and provide an exchange proxy for locus-specific databases and meta-analyses. Typically, this database should allow for further annotations (for example false-positives, published mutations, segregating variants, etc.) which greatly streamline the diagnostic process.

Care should be taken to choose a cut-off variant frequency in the 'normal' population for the (automated) classification of variants. The cut-off will differ depending on the expected inheritance pattern (dominant, recessive, X-linked) and the database that is being used as a reference.

Statement 26: Das diagnostische Hochdurchsatz-Labor muss alle relevanten Datensätze für die gesetzlich vorgeschriebenen Zeiträume sicher speichern / lagern können.

Ohne präzise gesetzliche Vorgaben in Deutschland wird man sich an gängige Standard-Dateiformate (FASTQ, BAM, VCF) anlehnen. Dabei sind auch die Regelungen des GenDG zu berücksichtigen.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 22; Zeile 847-863.

Storing NGS raw data is challenging because of the volume of the data. No standards exist for the extent of data storage. In general, a minimal data set that allows repetition of the diagnostic analysis should be stored. Currently, the consensus is that the FASTQ files have to be stored. Generally, data storage should stick to the standard open file formats FASTQ, BAM and VCF which should also be used for data exchange with other laboratories. If the BAM file is stored, it must be possible to generate the original FASTQ files from it, i.e. it should contain the unmapped reads. If the reads have been trimmed, the FASTQ files have to be stored as well. The stored VCF file should contain all good quality variants prior to filtering according to allele frequency, position in the genome, etc. If the VCF files are stored, it is advantageous to use a genome VCF (gVCF) file (including information on covered positions) so that variant frequencies can be reliably computed from them. Proprietary vendor file formats should be avoided because they might become difficult to read once the vendor discontinues the use of the file format. The use of check-sums in order to guarantee integrity of the data is encouraged.

When storing the analysis results, full log files have to be stored in addition to the analysis results. The log files should be as complete as possible, making the whole analysis from FASTQ data to the diagnostic report reproducible. The log files should contain all tools and databases used along with the tool and database version/timestamp and the parameters. Pipelines, tools and databases should be archived. It is recommended to use a version control system.

Statement 27: Der „befundete Bereich“, d.h. der Anteil der Zielregion, für welche eine verlässliche Genotypisierung hergestellt werden kann, muss während der Test-Entwicklung validiert und sollte dem Einsender kommuniziert werden (im Befund oder elektronisch).

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 23; Zeile 876-888.

Test validation

A diagnostic test should be carefully developed and optimized prior to validation. Importantly, the clinical target or regions of interest, i.e. all coding regions plus the conserved splice sites⁷, have to be defined prior to launching the assay. When describing the clinical target, the name and version of the transcript used must be stated. The clinical target must be defined according to the best practices guidelines for genes and diseases available at the European level such as the gene cards⁵⁶, the gene dossiers⁵⁷ or the EMQN best practice documents⁵⁸. As the list of causative genes evolves constantly, the clinical target must be regularly updated.

Some areas of the clinical target may not be sequenced reliably and should therefore be excluded from the reportable range. Clinically relevant regions not included in the reportable range (due to technical reasons) should be genotyped by another technique such as Sanger sequencing (see section on diagnostic/clinical utility). Mutation types that can be detected as well as the prevalence of such mutations in the tested disorders have to be taken into account when developing the test.

Statement 28: Die Anforderungen an den „befundeten Bereich“ hängen von der Ausrichtung (Indikation) des Tests ab.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 24; Zeile 892-894.

An exome sequencing assay with the aim to achieve a high diagnostic yield does not require additional analysis to achieve high coverage in all genomic regions covered, but needs clear communication to the clinician that the test cannot be used to exclude a particular clinical diagnosis (also cf. reportable range).

Statement 29: Sobald relevante Veränderungen am Test vorgenommen werden, müssen wichtige Qualitätsparameter neu geprüft werden und Referenz-Proben erneut prozessiert werden. Das diagnostische Labor sollte vorab festlegen, welche Proben in welchem Umfang zu diesem Zweck erneut prozessiert werden müssen.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 25; Zeile 920-922.

For instance, the test should be revalidated if a new genome build is used, software tools are updated, the gene panel is modified (for targeted re-sequencing), instrumentation and/or reagents are changed. Laboratories are encouraged to take part in proficiency testing once their test has been validated.

VII. Befundung

Befunde nach Hochdurchsatz-Diagnostik sollten den Grundsätzen zur Befundung (S2-Leitlinie Humangenetische Diagnostik) und einschlägigen diagnostischen Standards (RILiBÄK, DIN EN ISO 15189) folgen.

Dabei ist es essentiell, dass die Nomenklatur der *Human Genome Variation Society* (HGVS; <http://www.hgvs.org/mutnomen/>) benutzt wird und dabei die zugrunde gelegte Referenz-Sequenz (*genome build*) sowie die Referenzsequenz für Gen- und Transkriptannotierung genannt werden. Zusätzlich sollten die genomischen Koordinaten mitgeteilt werden, um einheitliche bioinformatische Analysen und eine konsistente Speicherung in Datenbanken zu gewährleisten. Eine Exon-Annotierung (Nummerierung) wird nicht benötigt und kann sogar irreführend sein, weil diese Information durch Versionierung verändert werden kann.

Um gängige klinische und administrative Anforderungen zu erfüllen, muss ein Befund Patienten- und Proben-Identifikatoren, eine Wiederholung der klinischen Fragestellung, die Details der genetischen Untersuchung, Ergebnisse, Interpretation und eine abschließende Wertung enthalten (ausführlich in S2k-Leitlinie).

Statement 30: Der Befundbericht eines Hochdurchsatz-Tests muss die Patienten-Identifikation und klinische (Verdachts)-Diagnose, eine kurze Test-Beschreibung, eine Zusammenfassung der Ergebnisse und die Hauptkenntnisse auf einer Seite enthalten.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 26; Zeile 1019-1023 und 1037-1092.

Minimal content of a report

Reports of NGS results should follow the general principles of clinical genetic reporting⁵⁹ and be in line with international diagnostic standards ISO 15189, and with professional guidelines like those issued by the Human Genetics Society of Australasia⁸, by the Clinical Molecular Genetics Society (CMGS) in the UK⁶⁰, and by the Swiss Society of Medical Genetics⁶¹. It is essential that results are reported in a clear and consistent manner, since laboratory reports may be read by both experts and non-experts. Therefore, the use of a phenotype checklist attached to the initial request form could be considered to maximize the quality of a report provided to the clinician.

In general, it is essential to use the mutation nomenclature according to Human Genome Variation Society (HGVS)^{62,63} and to include genome build and reference sequence used for gene, transcript and variant description. The HGNC approved gene symbol should be used at least once, for reference.

In addition, it is strongly recommended to include genomic coordinates in order to ensure uniform bioinformatics analysis and consistent documentation of identified variants. Exon annotation of the identified variants is not required since version updates of the reference sequences occur frequently.

To fulfill administrative, clinical and technical requirements, a patient report should contain patient and sample identification, restatement of the clinical question, specification of genetic tests used, results, interpretation, and a final conclusion.

The one-page report thus lists all the essential data about the test. In terms of the results, this includes all pathogenic (class 5) and likely pathogenic (class 4) variants, evidently. Whether or not UVs (class 3) variants are reported will depend on local practice (see below). The rationale for offering a one page summary is that the clinician will probably only scan the summary, and not look at all the information. Hence, the clinically significant conclusions and the relevant test and test quality data should feature on the first page.

The full report has to be much more elaborate, and contain much more details. We propose to work with supplements (or annexes) appended to the summary report, in which important test characteristics and details are described in addition to brief, clinical diagnostic report. Each page supplement should carry the patient identifier, a page number, the date, and be unequivocally linked to the corresponding report. Four examples reports with and without annexes are available as supplementary information.

One supplement is dedicated to test characteristics and bioinformatics details of targeted capture or exome sequencing. In case of capture assays and if the analysis of WES/WGS is restricted to a disease-associated set of genes based on the

patient's clinical indications, it is required to include the complete list of genes diagnostically targeted. This gene list should be selected by a team of experts, according to the criteria given in the section on diagnostic/clinical utility. The validation of the assay should warrant that the listed genes are tested at high quality, as explained in sections on diagnostic/clinical utility and validation.

Furthermore, a succinct but complete description of technical issues like the target enrichment approach (if any), the NGS platform, and the data analysis pipeline used are required in the report. Versioning is very important in this respect, and a requisite of the report. NGS testing meets new or other limitations in its performance and analysis compared with Sanger sequencing. It is therefore essential to include in the report disclaimers related to the test performance and the analytical limitations. For example, a thorough examination of all coding exons may not always be feasible due to lack of coverage. The test might also miss specific variant types (such as CNVs, repetitive DNA, deep intronic mutations...). Also, the report should describe the pipeline-related test limitations, such as the possibility of incorrect template mapping due to pseudogenes and unreliable calling of large deletions/insertions. An indication on how the NGS test differs from previous tests – i.e. how it compares to earlier testing (possibly already applied to the same patient) – should also be given. What is the major change, what is the benefit of the new test? All this could feature on a first supplement, on the website or in brochures provided by the laboratory.

It is advisable that reports mention whether variants reported to be pathogenic were confirmed by another independent method. There are two main reasons to confirm variants with a second independent method: (a) remaining uncertainty about the quality of the variant calling and (b) potential sample swaps if no independent tracking system is used.

All test characteristics and bioinformatics details could also be part of a test description on a dedicated website. One can refer to this website in the patient report, but then again, versioning is important.

A second supplement would be specific for each patient and include some quality issues as well as test performance data. It is essential to report (analytical) performance related to the minimum threshold that is guaranteed for the test. It is strongly recommended to report the performance related to the clinical target which is used for analysis in a given sample (see section on validation). The minimum threshold should be evidence based and must have been established during the test validation process. It is recommended to include the total number of variants observed in the analyzed gene panel in this specific sample; this can be used as a monitoring quality parameter of the whole pipeline. In addition, it is required that the report states whether some regions were not well covered and not complemented by another technique in a given sample. Laboratories must be able to show detailed information about the regions that were not successfully sequenced or analyzed. Laboratories may opt to make this information available either in the report or by other means (i.e. on a secure website). It might be useful to mention which gaps not attainable using NGS were filled by Sanger (or other means). It is recommended to provide the estimated diagnostic yield of the test, if possible.

A third supplement would include the variants retained after analysis of the processed data (i.e. variants of class 4 and 5 and eventually class 3 depending on local policy) in a clear and adequately structured format. It is essential to include the inheritance analysis model (autosomal dominant, recessive, X-linked, de novo ...) applied to the sequencing data and variant files. When summarizing the variant findings, it is recommended to include the gene name, zygosity, cDNA nomenclature, protein nomenclature and genomic position.

Statement 31: Die Verfahrensweise zur Mitteilung von genomischen Varianten muss ein diagnostisches Hochdurchsatz-Labor etablieren und dokumentieren, bevor entsprechende Analysen durchgeführt werden.

Grundsätzlich wird empfohlen, „neutrale“ und „wahrscheinlich neutrale“ Varianten nicht mitzuteilen. Alle wahrscheinlich und sicher pathogenen Varianten sind grundsätzlich, abhängig vom bestehenden Auftrag und Einverständnis, reportierbar. Die unklaren Varianten (VUS) können anhand einer definierten Routine entsprechend lokaler Gegebenheiten mitgeteilt werden oder einer Übermittlung auf Anfrage vorbehalten werden.

Es ist akzeptabel, VUS in einem Anhang zusammenzufassen, solange diese Praxis im klinischen Befund klar erläutert wird. Alle Hochdurchsatz-Labore werden angehalten, gut dokumentierte Varianten in nationalen und internationalen Datenbanken zugänglich zu machen.

Grundsätze zur Terminologie und Klassifizierung von Varianten sind in den Standards und Leitlinien des American College of Medical Genetics publiziert und weltweit aufgenommen worden (Richards et al., 2015)

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information; Statement 27; Zeile 1093-1105 und 1109-1112.

Criteria for classifying variants can be found in the best practice guidelines⁶⁴. A brief discussion on the classification of variants from a diagnostic standpoint is given in the following section. In general, it is recommended not to report likely benign or benign variants (class 1 and class 2 variants according to Plon et. al⁶⁵) but instead to report only clearly causal variants or very strong candidate variants that suggest/predict functional impairment and warrant further testing in the family. Thus, it is a requisite to report all pathogenic and likely pathogenic variants (class 5 and class 4). When multiple variants of potential clinical significance are identified, it is recommended to discuss the likely relevance of each variant to the patient's phenotype and prioritize variants accordingly. When analyzing a large set of disease-related genes, the number of UVs will become high. The choice to report UVs in a patient's report is a local policy and has to be described beforehand. It is strongly advised to only limit such reports to UVs found in genes relevant to the primary indication for testing. It is acceptable to report the UVs in a separate supplementary data file without confirmation by a second method as long as this is clearly stated in the clinical report.

Of course, laboratories are free to apply different layouts for the presentation of the results and supplements, but all the parameters mentioned above should either be included in the report or be available, and the accessibility of these parameters, as well as of the results in the patient's report, should be guaranteed.

Statement 32: Für diagnostische Zwecke sollen nur Varianten in Genen mit einem bekannten (das bedeutet publizierten und bestätigten) Zusammenhang zwischen pathogenen Veränderungen und entsprechenden Phänotypen befundet werden.

Statement 33: Weil die Klassifizierung von Varianten nicht fixiert sein kann, kann es medizinisch sinnvoll sein von Fall zu Fall eine Re-Evaluation der Klassifizierung nach ACMG-Richtlinie und gegebenenfalls eine Re-Klassifizierung vorzunehmen.

Eine solche Reklassifikation ist nicht Bestandteil des abgeschlossenen Untersuchungsauftrages und muss ggf. neu durch den Einsender oder einen anderen betreuenden Arzt nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis des Patienten beauftragt werden. Nach Re-Klassifizierung ist dann insbesondere zu klären, ob auch weitere Familienangehörige oder Unverwandte mit derselben Varianten informiert werden können bzw. dürfen.

Statement 34: Diagnostische Labore sollten eine klar beschriebene Prozedur haben, wie mit Zusatzbefunden umgegangen wird, bevor ein Test angeboten wird.

Siehe auch Matthijs et al., 2016; Supplementary Information ; Statement 29; Zeile 1155-1168 und 1171-1174.

Unsolicited and secondary findings

A specific aspect of NGS strategies is the possibility of detecting unsolicited and secondary findings. In this document, we do not intend to rehearse the discussion about such findings; we only wish to point out that the laboratories should deal with the issue before engaging in NGS diagnostics. Even though the use of gene panels minimizes the chance of detecting such results, it is essential that laboratories have a clearly defined protocol for addressing unsolicited and secondary findings (see section on informed consent). Unsolicited findings and carrier status on genes included in the tested gene panel should be in the main report. The protocol should further define, prior to the result being available, (i) which secondary findings will systematically be searched for and reported in an additional separate data file or will be available on request; (ii) if unsolicited and secondary findings will be routinely confirmed by independent methods. Commonly encountered examples of unsolicited and secondary findings detected during testing include: detection of carrier status for autosomal recessive disorders; detection of variants involving genes associated with dominant, adult-onset conditions; detection of variants related to cancer; detection of variants involved in pharmacogenetics. Recent publications address this issue and discuss how to report on unsolicited and secondary findings^{10,66,67,68}. Uncertainty associated with reporting unsolicited and secondary findings is usually best managed with input from a medical genetic specialist. Clinicians may give patients the option of not receiving certain results (see section on informed consent).

VIII. Glossar

Diagnostische Aufklärungsquote – „*diagnostic yield*“

Die „Diagnostische Aufklärungsquote“ ist die Wahrscheinlichkeit, die krankheitsverursachende Veränderung zu finden (bezogen auf die untersuchte Patientenkohorte). Dieser Parameter ist im Alltag praktisch nicht ermittelbar, weil die untersuchte Patientenkohorte nicht standardisiert werden kann. Für einige Indikationsbereich gibt es publizierte Schätzwerte, die herangezogen werden können.

Hochdurchsatzverfahren

Testverfahren, welche in wenigen Tagen die hochparallele Sequenzanalyse von dutzenden bis tausenden Genorten eines Patienten erlauben. Molekulargenetische Hochdurchsatzverfahren werden derzeit regelmäßig mit Next-Generation Sequencing (NGS) gleichgesetzt, wobei sich die Ausführungen dieser Leitlinie nicht auf die derzeitige Analyse-Technologie beschränkt und auch zukünftige Hochdurchsatzmethoden, die im Prinzip zu ähnlichen analytischen Ergebnissen und diagnostischen Befunden führen können, einschließt.

Bioinformatische Pipeline

Datenverarbeitung und –auswertung für genetische Hochdurchsatz-Analysen. Für das Next-Generation Sequencing umfasst die bioinformatische Pipeline typischerweise die Qualitätskontrolle der Rohdaten (Bildaten und abgeleiteten Sequenzier-Reads), das Mapping der Sequenzier-Reads, das Varianten-Calling für diese Mappings, die Annotierung der Varianten mit internen und externen Datenbankinformationen (beispielsweise den Populationshäufigkeiten in der Allgemeinbevölkerung) und die Filtrierung der Gesamt-Variantenlisten im Hinblick auf die klinische Fragestellung.

IX. Anlage: Anleitung für Core Gene-Panels

Core Gene-Panels für die humangenetische Diagnostik

Ein Core Gene-Panel bezieht sich auf (mehrere) klinische Kernsymptome (bspw. Muskelschwäche) und umfasst alle erforderlichen, in der Regel häufig krankheitsursächlichen Gene, die mindestens bei einer diagnostischen Abklärung untersucht und beurteilt werden müssen. Alle Gene des Core Gene-Panels müssen zu mehr als 99 Prozent in ausreichender Qualität abgedeckt sein, d.h. sie dürfen keine diagnostischen Lücken (Gaps) aufweisen (s. Empfehlungen von EuroGentest, Klasse A-Analysen). Für Copy-Number-Veränderungen bestehen derzeit noch keine Empfehlungen.

Kriterien

- 1) Gene aus etablierter Standard-/Stufendiagnostik, für die diagnostische, prophylaktische oder therapeutische Konsequenzen bzw. Vorsorgeempfehlungen oder Empfehlungen für die Analyse der familiären Segregation bereits bekannt und/oder etabliert sind (z.B. Gene aus existierenden Leitlinien oder Empfehlungen von Fachgesellschaften)
- 2) Für die Auswahl weiterer Gene eignen sich Literatur- (Pubmed) und Datenbank-Recherchen (OMIM, Orphanet, GeneReviews, HGMD, LOVDs).

Einschlusskriterien für Core Genes

- möglichst mehrfach beschrieben, auch in verschiedenen Familien
- wissenschaftlich belegte funktionelle Signifikanz im Zusammenhang mit der Erkrankung
- diagnostische Sensitivität > 1% der klinisch gesicherten Fälle
- diagnostische Sensitivität 0,1 – 1% bei sehr seltenen Erkrankungen

Ausschlusskriterien

- isolierte Evidenz aus Assoziationsstudien
 - genetische Varianten mit hoher Frequenz in der Normalbevölkerung in Abhängigkeit von der jeweiligen Erkrankung und dem Vererbungsmodus
- 3) Befundrückführungszeiten: in Abhängigkeit von der Größe des Panels bis maximal 12 Wochen
 - 4) Aktualisierung der Core Gene List: alle 12 Monate

Extended Gene Panels

- Pathway-basierte Informationen
- Risiko-Allele -> Zunahme an klinischer Evidenz kann zur Aufnahme in „Core Gene List“ führen

Research Gene Panels

- Hypothesen-basierte Informationen
- Dokumentation kann zur Aufnahme in die „Extended Gene Panel List“ oder – bei klinischer Evidenz - gleich zur Aufnahme in die „Core Gene List“ führen.

X. Quellen / Literaturangaben

Calvo et al., Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Sci Transl Med* 2012; 4: 118ra10.

DellaMina et al., Improving molecular diagnosis in epilepsy by a dedicated high-throughput sequencing platform. *Eur J Hum Genet* 2015; 23: 354-364.

Eisenberger et al., Increasing the yield in targeted next-generation sequencing by implicating CNV analysis, non-coding exons and the overall variant load: the example of retinal dystrophies. *PLoS One* 2013; 8: e78496.

Gargis et al., Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice. *Nat Biotechnol* 2012; 30:1033-6.

Gilissen et al., Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* 2014; 511: 344–347.

Green et al., American College of Medical Genetics and Genomics: ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med* 2013, 15:565e574

Matthijs et al., Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet* 2016; 24: 2-5.

Mook et al., Targeted sequence capture and GS-FLX Titanium sequencing of 23 hypertrophic and dilated cardiomyopathy genes: implementation into diagnostics. *J Med Genet* 2013; 50: 614-626.

Nemeth et al., Next generation sequencing for molecular diagnosis of neurological disorders using ataxias as a model. *Brain* 2013; 136: 3106-3118.

Neveling et al., A post-hoc comparison of the utility of sanger sequencing and exome sequencing for the diagnosis of heterogeneous diseases. *Hum Mutat* 2013; 34: 1721-1726.

Pugh et al., The landscape of genetic variation in dilated cardiomyopathy as surveyed by clinical DNA sequencing. *Genet Med* 2014; 16: 601-608.

Rehm HL. Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic. *Nat Rev Genet* 2013; 14: 295-300.

Rehm et al., ClinGen – the clinical genome resource. *N Engl J Med* (2015); 372: 2235-2242.

Richards et al., Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and the Association of Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17: 405-424.

Schnekenberg et al., Next-generation sequencing in childhood disorders. *Arch Dis Child* 2014; 99: 284-290.

Sikkema-Raddatz et al., Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics. *Hum Mutat* 2013; 34: 1035-1042.

Srivastava, S. et al., Clinical whole exome sequencing in child neurology practice. *Ann Neurol* 2014; 76: 473-483.

S2-Leitlinie „Humangenetische Diagnostik und genetische Beratung“, *medizinischegenetik* 2011, 23:281-323, AWMF Registernummer 078 - 015