



Odporúčania Slovenskej spoločnosti lekárskej genetiky (SSLG) Slovenskej lekárskej spoločnosti (SLS) pre implementáciu masívneho paralelného sekvenovania do molekulárno-diagnostickej praxe v rámci identifikácie zárodočných DNA variantov

Autorský kolektív

Radvánszky J., Minárik G., Lohajová Behulová R., Hikkel I., Hikkelová M., Ďuranová M., Petrovič R., Giertlová M., Konečný M.

Dátum uverejnenia

21.07.2022

Schválil

Výbor Slovenskej spoločnosti lekárskej genetiky (SSLG) Slovenskej lekárskej spoločnosti (SLS)

Vymedzenie obsahu odporúčaní

Odporúčania Slovenskej spoločnosti lekárskej genetiky (SSLG) Slovenskej lekárskej spoločnosti (SLS) pre implementáciu masívneho paralelného sekvenovania (MPS) do molekulárno-diagnostickej praxe charakterizujú postupy používania MPS v rámci poskytovania zdravotnej starostlivosti v zdravotníckych zariadeniach. Odporúčania boli vytvorené na základe odborných skúseností pracovnej skupiny SSLG tvorenej autorským kolektívom, boli prispôbené podmienkam používania MPS v SR, pričom vychádzajú z medzinárodných odporúčaní odborných spoločností, napr. *European Society of Human Genetics (ESHG)*, *Eurogentest*, *Association for Clinical Genomic Science (ACGS)* a *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)*.

Odporúčania SSLG pre MPS sa zaoberajú týmito oblasťami:

- **Technologická a interpretačná stránka** genetickej laboratórnej analýzy za využitia MPS postupov.
- **Sekvenovanie** a hodnotenie **zárodočných DNA variantov**.
- Sekvenovanie pomocou platforiem patriacich do tzv. **druhej generácie sekvenačných metód**.
- Rozsahom analýz od malých génových panelov, cez stredne veľké, veľké génové panely ako klinické exómy (CES; *clinical exome sequencing*) a celé exómy (WES; *whole exome sequencing*) a celé genómy (WGS; *whole genome sequencing*).

Odporúčania SSLG pre MPS sa nezaobierajú aplikáciou MPS v inom, než vo vyššie uvedenom kontexte, tj.:

- Nevzťahujú sa na analýzu **iných biomakromolekúl**, ako napr. analýzu RNA.
- Nepokrývajú aspekty **celogenómového sekvenovania využitím nízkeho pokrytia/hĺbky čítania** (napr. NIPT analýzy a niektoré typy CNV analýz).
- Nepokrývajú problematiku diagnostiky **somatických DNA variantov**.
- Nedefinujú procesy po uskutočnení MPS testovania, tj. **doplňujúce klinické a laboratórne vyšetrenia**, a to ani ak sú tieto potrebné na vyvodenie klinicky relevantných záverov z výsledkov uskutočnených MPS.
- Nepokrývajú proces **klinicko-genetickej konzultácie** spojenej s návrhom ďalšieho manažmentu na základe výsledkov MPS analýz.

1. Hlavné prvky pred-testových krokov

1.1. Kompetencie na indikácie MPS vyšetrenia, všeobecné indikačné kritériá a voľba analytických MPS postupov

Molekulárno-genetické laboratórne vyšetrenie **indikuje lekár so špecializáciou v odbore Lekárska genetika (062)**, a to po osobnej konzultácii s probandom (alebo jeho zákonným zástupcom), na základe klinicko-genetického vyšetrenia. Z hľadiska **indikácie MPS na vykonanie molekulárno-genetického vyšetrenia** odlišujeme dva základné prístupy:

- 1) V prípade, ak je indikované vyšetrenie explicitne MPS s konkrétnym rozsahom a s následným komplexným hodnotením výstupov, sa odporúča **indikácia Lekárom so špecializáciou v odbore Lekárska genetika (062)¹**, a to na základe náročnosti použitej technológie, širokého rozsahu a komplexnosti vyšetrenia a náročnosti vyhodnocovania a interpretácie dát.
 - **Výber relevantných cieľových genomických oblastí alebo rozsah MPS analýzy** (panel génov, CES, WES, WGS, a pod.), uskutoční indikujúci lekár so špecializáciou v odbore Lekárska genetika (062)¹.
- 2) V prípade ak sa MPS použije ako technická náhrada konvenčných metódik zameraných na genotypizáciu konkrétnych genomických pozícií alebo malého počtu génov/exónov sa odporúča uskutočnenie rozhodnutia o vykonaní **MPS Laboratórnym diagnostikom so špecializáciou v odbore Laboratórne a diagnostické metódy v klinickej genetike, resp. v odbore Lekárska genetika (239)**.
 - V týchto prípadoch je potrebné uskutočniť výber MPS testu s dôrazom na požadované ciele, rozsah a účely testovania, pričom musí byť zachovaný rozsah a typ sledovaných DNA zmien špecifikovaných indikujúcim lekárom.
 - Ak sa ako technická náhrada použije MPS prístup s väčším rozsahom sekvenovanej oblasti, odporúča sa **limitovať vyhodnocované oblasti** na pôvodne žiadaný rozsah molekulárno-genetického vyšetrenia, napr. pomocou bioinformatického filtrovania a využitím tzv. virtuálnych panelov.

Molekulárno-genetické laboratórne MPS vyšetrenie sa odporúča **explicitne indikovať v prípadoch**, ak:

- Vybraný MPS test poskytuje vyšší diagnostický výťažok, senzitivitu a/alebo špecifickosť oproti konvenčným postupom testovania.

- Použitie MPS predstavuje z finančného a časového hľadiska výhodnejšie technologické riešenie pre poskytovateľa alebo platcu zdravotnej starostlivosti, pričom sa neznižuje diagnostický výťažok, senzitivita a/alebo špecificita testu oproti konvenčným postupom testovania (t.j. MPS sa použije ako technická náhrada konvenčných metodík zameraných na genotypizáciu konkrétnych genomických pozícií alebo malého počtu génov/exónov).
- Zdravotný stav probanda je pravdepodobne spojený so zmenou na úrovni DNA, avšak platí niektorý s nasledujúcich predpokladov:
 - Genetická a klinická heterogenita suspektnej klinickej jednotky je vysoká.
 - Stanovenie konkrétnej diagnózy inými vyšetreniami je ťažko uskutočniteľné, príp. neefektívne (napr. iné testy nie sú dostupné, a pod.).
 - Ak boli vyčerpané možnosti genetických testov a nevedli k stanoveniu diagnózy.
 - Ak existuje podozrenie na genetické ochorenie, ale manifestácia je nejednoznačná.

1.2. Definície minimálneho obsahu informovaného súhlasu pre MPS testovanie

Okrem všeobecne platných požiadaviek na formu a obsah informovaného súhlasu (platných podľa normy ISO 15189:2012, resp. Zákona o ochrane osobných údajov (GDPR), č. 18/2018 z. z., EU General Data Protection Regulation 2016/679, ako aj príslušných zákonov o kybernetickej bezpečnosti, napr. č. 69/2018 Z. z.) sa v kontexte MPS vyšetrenia vyžaduje, aby bol proband **pred vyšetrením informovaný o povahe testu**, ako aj o tom, že MPS vyšetrenie sa bude významne líšiť minimálne v nasledujúcich bodoch:

- Vyšetrenie panelu génov vedie k identifikácii **primárnych nálezov**, ktoré sú relevantné z hľadiska primárneho zámeru testovania, ale tiež aj **náhodných nálezov** (viď vysvetlenie nižšie, kap. 11.2) vo vyšetrovaných oblastiach genómu (reportujú sa lekárovi vždy, následne sa lekár rozhodne, či budú pacientovi oznámené).
- Pri vyšetrení klinického exómu, celého exómu a celého genómu je možnosť, okrem primárneho zamerania testovania, aktívne vyhodnotiť aj iné oblasti genómu, ktoré sú však z hľadiska primárneho dôvodu testovania nezávislé. Tieto hodnotené oblasti sú sekundárne, a nálezy identifikované týmto hodnotením sa považujú za **sekundárne nálezy** (viď vysvetlenie nižšie, kap. 11.2). Odporúča sa informovať probanda o povahe týchto sekundárnych analýz.

Okrem informačnej časti súhlasu, sa odporúča aby mal proband možnosť vyjadriť svoj:

- Súhlas/nesúhlas s uskutočnením **MPS testu sekvenovaním** panelu génov (vrátane virtuálneho génového panelu), klinického exómu, celého exómu, príp. celého genómu.
- Súhlas/nesúhlas s poskytnutím identifikovaných **sekundárnych nálezov**.
- Súhlas/nesúhlas s **archiváciou biologického materiálu, ako aj genomických dát**.
- Súhlas/nesúhlas s **distribúciou a zdieľaním MPS dát** s inými relevantnými zdravotníckymi zariadeniami (napr. z hľadiska reanalýzy a reinterpretácie dát), a to výlučne **na základe žiadosti indikujúceho klinického genetika**.
- Súhlas/nesúhlas s **ďalšími možnosťami** používania biologického materiálu a získaných genomických dát pre iné účely, než účely primárneho testovania, napr. **na výskumné účely**.
- Súhlas/nesúhlas s možnosťou zdieľania pseudonymizovaných dát (ktoré sa považujú za osobné údaje) s tretími stranami pri zabezpečení ochrany osobných údajov, a to aj so zreteľom na podmienky nevyhnutného umiestňovania pseudonymizovaných dát pacientov na servre mimo

priestorov samotného poskytovateľa zdravotnej starostlivosti (napr. cloudove riešenia) (v súlade s vyššie citovanými zákonmi o ochrane osobných údajov a kybernetickej bezpečnosti).

1.3. Definície minimálneho obsahu žiadosti o vykonanie genetického MPS testovania

Žiadosť o vykonanie molekulárno-genetického MPS testovania je zasielaná spolu s biologickým materiálom, pričom sa odporúča dodržať nasledujúci minimálny obsah:

- Základné demografické údaje probanda (okrem všeobecne používaných údajov aj uvedenie pohlavia, etnicity/rasy, príp. geografického pôvodu).
- Základná suspektná diagnóza, resp. iné diagnózy (doplnené o Orpha alebo OMIM kódy).
- Komplexný opis fenotypu probanda/rodiny, aj pomocou kľúčových klinických symptómov v uniformizovanom a štandardizovanom označení podľa terminológie databázy *Human Phenotype Ontology* (HPO).
- Definovanie minimálneho rozsahu laboratórnej analýzy v zmysle použitého panelu asociovaných génov, ale aj interpretácie a reportovania výsledkov, a to v identickom znení, ako v informovanom súhlase.
- Rodinná anamnéza a/alebo rodokmeň probanda.
- Informácie o odobratom/zaslanom biologickom materiáli (minimálne v zmysle požiadaviek normy ISO 15189:2012).
- Potvrdenie o podpísaní informovaného súhlasu probanda alebo jeho zákonného zástupcu s opisom relevantných súhlasov/nesúhlasov z neho (viď predchádzajúci odsek).

2. Kompetencie realizovania genetického MPS testovania

Odporúča sa, aby bolo **molekulárno-genetické laboratórne MPS vyšetrenie** vykonané v akreditovanom zdravotníckom zariadení, t.j. v laboratóriu v rámci odbornosti lekárska genetika, ktoré sa minimálne raz za 2 roky zapája do externého hodnotenia kvality, príp. medzilaboratórnej kontroly kvality, a ktoré spĺňa nižšie uvedené minimálne požiadavky na personálne zabezpečenie.

Minimálne personálne zabezpečenie laboratória, ktoré vykonáva MPS testovanie je nasledovné: laboratórny diagnostik v odbore Laboratórna diagnostika v lekárskej genetike, resp. v odbore Laboratórne a vyšetrovacie metódy v klinickej genetike, v odbore Lekárska genetika, s preukázateľným školením zameraným na MPS analýzy, skúsenosťami vo vykonávaní MPS analýz a s vyhodnocovaním dát generovaných touto metodikou kontinuálne počas minimálne 2 rokov.

3. Minimálne laboratórne štandardy *in vitro* častí MPS diagnostiky

Laboratórny algoritmus *in vitro* častí MPS diagnostiky vrátane jednotlivých parciálnych krokov (spracovanie vzorky, izolácia DNA, príprava sekvenačných knižníc, kontrola kvality knižníc, sekvenačná analýza) by mal byť detailne zaznamenaný vo výsledkovej laboratórnej správe.

Pred uskutočnením samotného MPS je potrebné zabezpečiť vhodný odber a transport relevantného biologického materiálu, ako aj extrakciu DNA s dostatočnou kvalitou a kvantitou aj pre prípadné doplnkové analýzy (napr. segregáčna analýza). Kontrolu a evidenciu kvality a kvantity DNA je potrebné uskutočniť metódami vhodnými a postačujúcimi pre špecifické účely vybraného testu. Pri samotnej príprave vzoriek/knižníc pre MPS analýzu je nevyhnutné postupovať podľa originálnych

protokolov od príslušných výrobcov v prípade použitia komerčných kitov s príslušnou verifikáciou v laboratóriu.

V prípade v laboratóriu vytvoreného (tzv. *home-made*) alebo modifikovaného protokolu je potrebné mať tento validovaný, minimálne v rozsahu, ktorý sa vyžaduje normou ISO 15189:2012.

4. Popis *in silico* procesu laboratórnej MPS diagnostiky a definícia minimálnych interpretačných štandardov

Úlohou *in silico* laboratórneho procesu, t.j. bioinformatického spracovania dát, je postupná úprava generovaných sekvenčných čítaní a ich analýza, až do formy výsledkovej správy z MPS. Hoci celý proces delíme na tri hlavné časti (primárna, sekundárna a terciárna analýza), niektoré aspekty *in silico* procesu sú platné plošne pre všetky z nich:

- Laboratóriu vykonávajúcemu analýzu sa pri využití nástrojov a postupov na bioinformatické spracovanie MPS dát odporúča ich zjednotenie, interné definovanie štandardov celého procesu a ich následné dodržiavanie používateľmi. Využívanie širokého spektra možných nástrojov a postupov na spracovanie MPS dát môže viesť k tvorbe nesprávnych postupov, a preto je dôležité zjednotiť parciálne časti bioinformatického spracovania dát.
- V bioinformatickom procesovaní sekvenčných dát a ich výslednom hodnotení je na zabezpečenie dostatočnej kvality a spoľahlivosti výsledkov testovania odporúčaná verifikácia (pri komerčne dostupných riešeniach), resp. validácia (pri laboratóriom zostavených riešeniach) celého procesu bioinformatického spracovania dát, pričom verifikácia resp. validácia len parciálnej časti nie je dostatočná
- V prípade, ak dôjde k zmene určitých častí bioinformatického procesu, odporúča sa uskutočniť reverifikáciu, resp. revalidáciu celého procesu.
- Externé zdroje (napr. databázy, referenčné genómy) používané v rámci týchto procesov sú administrátormi pravidelne aktualizované, a preto sa odporúča aktívne sledovať ich aktuálnosť a používať najaktuálnejšie verzie. Zároveň sa odporúča zaznamenávanie použitých verzií externých zdrojov vo výsledkovej správe.

Hlavnou úlohou **primárnej analýzy** je spracovanie generovaného sekvenčného signálu a sekvenčných čítaní, správna identifikácia báz a správne odstránenie artefaktov s nízkou kvalitou čítania. Výstupom procesu sú prefiltrované a správne upravené sekvenčné čítania vo formáte FASTQ súboru.

- Odporúča sa na primárnu analýzu použiť výrobcom odporúčané bioinformatické riešenia špecifické pre použitú sekvenčnú platformu.

Úlohou **sekundárnej analýzy** je správne mapovať čítania voči referenčnej DNA sekvencii a správne identifikovať prítomné sekvenčné varianty. Výstupom uvedeného procesu sú čítania namapované na referenčnú sekvenciu (formát BAM a BAI) a vytvorenie zoznamu spoľahlivo identifikovaných sekvenčných variantov (formát VCF, príp. gVCF). Hlavné ciele a odporúčania sekundárnej analýzy sú nasledovné:

- Odporúča sa posúdiť hĺbku pokrytia nielen vo formáte BAM, ale aj vo formáte VCF (t.j. počet čítaní príslušnej bázy, z ktorých bola reálne uskutočnená genotypizácia), ktorá sa považuje za štandard,

ako napr. minimálne 20x hĺbka pokrytia v prípade zárodočného variantu typu SNV alebo malý indel, prípadne 100x pre varianty typu CNV (pri použití Illumina sekvenovania a WES prístupu).

- Odporúča sa rešpektovať výrobcom odporúčané špecifiká prípravy DNA knižníc, špecifiká použitej sekvenačnej platformy, ako aj typy identifikovaných DNA variantov, resp. efektívne hĺbky pokrytia.
- Odporúča sa v správe z MPS definovať rozsah pokrytia cieľovej oblasti ako aj oblasti s menšou ako odporúčanou hĺbkou pokrytia:
 - V prípade ak sa použije MPS ako technická náhrada Sanger sekvenovania malého počtu génov/exónov, následne sa odporúča dosekvenovanie nedostatočne pokrytých oblastí tak, aby sa dosiahol rovnaký diagnostický výťažok, senzitivita a špecificita ako konvenčne používané technológie.
 - V prípade použitia MPS ako primárnej metódy sa odporúča dosekvenovať nedostatočne pokryté oblasti na základe dodatočného vyžiadania lekárskeho genetikom (report nepokrytých oblastí má byť na vyžiadanie dostupný pre indikujúceho lekára).
- Na identifikáciu rôznych typov sekvenčných variantov sa odporúča použiť na to určené analyzáčne nástroje a zaznamenávať ich vo výsledkovej správe (napr. CNV moduly, moduly na analýzu repetitívnych sekvencií).

Terciárna analýza MPS dát predstavuje postupy anotácie a filtrovania DNA variantov, vyhodnotenia a interpretácie výsledkov v definovaných genomických oblastiach. Odporúča sa venovať špeciálnu pozornosť preferenciám indikujúceho lekára, s dôrazom pri reportovaní DNA variantov patriacich do skupiny náhodných a sekundárnych nálezov.

- Po anotácii zoznamu DNA variantov sa uskutoční analýza zameraná na **primárne cieľové oblasti**, čiže filtrovanie variantov, ktoré je v súlade so žiadosťou o vyšetrenie a informovaným súhlasom. Filtrovanie DNA variantov môže byť realizované rôznymi spôsobmi, napr. špecifikáciou zoznamu génov, definíciou fenotypových prejavov ochorenia, príp. suspektnou diagnózou.
- Z hľadiska primárneho zamerania testovania môže byť filtrovanie vykonané dvoma odlišnými prístupmi, od ktorých napr. závisí, či sú DNA varianty identifikované ako primárne alebo náhodné
 - Ako **hlavný prístup** pri CES/WES/WGS sa odporúča použitie metódy filtrovania "zhora dolu" ("Top down"), ktorá je klasickým prístupom a vychádza z filtrovania variantov na základe zoznamu génov, fenotypových znakov, alebo suspektného ochorenia. Tento prístup umožňuje minimalizovať počet náhodných nálezov.
 - **Alternatívny prístup** "zdola hore" ("Bottom up") vychádza z identifikácie DNA variantov podľa ich klinického dopadu (bez predchádzajúceho filtrovania podľa génov alebo symptomatológie), s následným vyhľadávaním variantov v súlade s asociovaným fenotypom pacienta. Uvedená stratégia sa považuje za doplňujúcu, a to pre prípady, v ktorých sa nepodarí identifikovať klinicky relevantné varianty pomocou "top down" stratégie. Avšak tento prístup je potenciálne spojený s väčším množstvom identifikovaných klinicky relevantných DNA variantov, ktoré nesúvisia s primárnym dôvodom vyšetrenia, t.j. náhodných nálezov.
- Zároveň sa odporúča, pri vykonaní CES/WES/WGS, uskutočnenie hodnotenia **sekundárnych cieľových oblastí**, a to v rozsahu génov a DNA variantov, ktoré sú klinicky relevantné a nimi determinovaný fenotyp je závažný, ale ovplyvniteľný. Za hodnotené sekundárne oblasti sa

považujú gény v rozsahu príslušných a aktuálnych odborných odporúčaní venujúcich sa explicitne tejto téme.

- Vo filtrovanom zozname DNA variantov sa vhodnými bioinformatickými nástrojmi uskutoční **prioritizácia DNA variantov** z hľadiska ich pravdepodobnej klinickej relevancie, a to na základe údajov ako frekvencia variantu v populácii, predpokladaný typ dedičnosti, typ identifikovanej sekvenčnej zmeny, lokalizácie v rámci génu a proteínu, predpokladaného dopadu zmeny na proteín, informácií z funkčných štúdií, publikovaných informácií a klasifikácií v dostupných databázach, príp. internej databázy laboratória, konsenzuálnej predikcie viacerými predikčnými softvérmi.
- Výsledná klasifikácia potenciálneho klinického efektu identifikovaných DNA variantov prebehne v súlade s aktuálnymi odbornými odporúčaniami (napr. ACMG, Richards a kol., 2015; Riggs a kol., 2020), pričom zdroj interpretácie je jednoznačne uvedený v správe. Odporúča sa pritom použiť klasifikáciu do 5 základných tried, a to **benígne, pravdepodobne benígne, patogénne, pravdepodobne patogénne** varianty, a **varianty s neznámym klinickým efektom**. V prípade potreby je možné deliť varianty s neznámou signifikanciou na ďalšie podskupiny. Pomocou nich je možné vymedziť napr. varianty **potenciálne klinicky významné (alebo tzv. HOT-VUS)**, ktoré síce nemôžu byť klasifikované za “pravdepodobne patogénne”, ale existujú dôkazy o ich potenciálnej patogénnej/benígnej povahe, prípadne je možné definovať doplnkové informácie/vyšetrenia, podľa ktorých by bolo možné jednoznačnejšie klasifikovať dané varianty smerom k patogénnej/benígnej povahe.
- Ak sa klinicky relevantný a potenciálne reportovateľný sekvenčný variant klasifikuje automatizovaným spôsobom, je jeho klasifikáciu potrebné nezávisle preveriť.
- Ak sa identifikuje klinicky relevantný a potenciálne reportovateľný sekvenčný variant, odporúča sa jeho kvantitatívne a kvalitatívne parametre prehodnotiť v súvislosti s charakterom okolitej sekvencie, a tiež overiť pomocou vhodného vizualizačného nástroja (napr. IGV), a to na úrovni mapovaných čítaní (BAM a BAI súbor).

5. Interpretácia a oznamovanie výsledkov MPS analýz

5.1. Interpretácia výsledkov

Interpretácia výsledkov MPS analýzy sa vykonáva na viacerých úrovniach:

- Hodnotenie výsledkov MPS analýzy a **molekulárno-genetickú interpretáciu identifikovaných DNA variantov uskutočňuje laboratórny diagnostik** so špecializáciou v odbore Laboratórne a diagnostické metódy v klinickej genetike, pričom ich reportuje formou **výsledkovej správy** smerom k indikujúcemu lekárovi so špecializáciou v odbore Lekárska genetika¹.
 - Odporúča sa reportovať smerom k indikujúcemu odborníkovi **primárne nálezy**, a to v súlade s minimálnymi požiadavkami na správu definovanými nižšie.
 - Odporúča sa rutinne hodnotiť a reportovať smerom k indikujúcemu odborníkovi **náhodné nálezy** v primárne hodnotených cieľových oblastiach, a tiež v prípade uskutočnenia CES/WES/WGS rutinne hodnotiť a reportovať aj **sekundárne nálezy** v relevantných génoch (viď vysvetlenie nižšie, kap. 11.2), a to v rozsahu patogénnych a pravdepodobne patogénnych variantov.
- **Indikujúci lekár** (lekársky genetik) klinicky interpretuje výsledky molekulárno-genetickej MPS analýzy **probandovi** (alebo zákonnému zástupcovi, resp. splnomocnenej osobe) **alebo odosielajúcemu lekárovi**.

- Rozhodnutie o interpretácii náhodných nálezov pacientovi uskutoční lekársky genetik.
- Rozhodnutie o interpretácii sekundárnych nálezov pacientovi uskutoční lekársky genetik v kontexte so získaným informovaným súhlasom.
- Odporúča sa, aby bol na tieto aspekty probanda upozornený už počas predtestovej konzultácie. V prípade vyjadrenia nesúhlasu zo strany probanda sa neodporúča uvedené nálezy reportovať.

5.2. Hlavné aspekty a definícia minimálneho obsahu výsledkovej správy

Laboratórna správa o výsledku molekulárno-genetického MPS testovania obsahuje minimálne nižšie uvedené prvky. V prípade potreby je vhodné použiť aj elektronické prílohy správy, napr. informácie o špecifických parametroch a nastaveniach laboratórnej a bioinformatickej analýzy, príp. na vyžiadanie zoznam všetkých identifikovaných DNA variantov, a to bez špecifického filtrovania (okrem základného filtrovania na dostatočnú technickú kvalitu).

Minimálny rozsah a obsah správy o výsledkoch molekulárno-genetického testovania je definovaný príslušnými normami (napr. ISO 15189:2012). V kontexte špecifik MPS analýz správa obsahuje navyše minimálne nasledujúce prvky:

- Suspektná diagnóza, ak je známa, príp. hlavná indikácia pre MPS testovanie.
- Stručná rekapitulácia klinického/fenotypového nálezu, príp. relevantné genealogické údaje, so zameraním na fenotyp probanda asociovaný s indikáciou testovania.
- Požadovaný rozsah génov zahrnutých do MPS analýzy, príp. iná definícia genomických oblastí záujmu (vrátane definovania typov DNA variantov).
- Použitá laboratórna diagnostická metóda s rozsahom sekvenovanej genomickej oblasti (celý genóm, celý exóm, klinický exóm, menší panel génov/exóny), príp. senzitivita a špecificita použitej metódy.
- Typ doplnkových testov napr. dodatočné sekvenovanie Sangerovým sekvenovaním, MLPA (v zmysle kompletnosti pokrytých cieľových oblastí a doplnenia komplementárnymi metodikami).
- Analyzovaný rozsah hodnotenej oblasti genómu (oblasť, v ktorej boli hodnotené identifikované varianty), uvedenie typov interpretovaných DNA variantov (napr. SNV, malé indely, STR, CNV, chromozómové aberácie, aneuploidie, zmeny metylácie atď.), uvedenie minimálneho efektívneho pokrytia a minimálnej hĺbky čítania cieľovej oblasti (s konkrétnym uvedením identifikátorov, napr. genomických koordinátov nedostatočne pokrytých oblastí, resp. konkrétne nepokryté gény a exóny v cieľových oblastiach).
- Stručný opis použitej bioinformatickej analýzy, spolu s opisom hlavných nástrojov a zdrojov anotácie variantov (databázy, *in silico* predikčné nástroje, automatické nástroje na klasifikáciu klinického dopadu variantov, atď.) a postupov filtrovania a prioritizácie variantov.
- Limitácie použitých laboratórnych a bioinformatických metód, napr. detekcia expanzie tandemových opakovaní, CNV variantov, variantov mimo cieľovej oblasti.
- Použité referenčné sekvencie a ich konkrétne verzie.
- Uvedenie zoznamu DNA variantov identifikovaných v cieľovej genomickej oblasti po prioritizácii a filtrovaní sekvenčných variantov, a to s klasifikáciou klinického významu: **“patogénny”**, **“pravdepodobne patogénny”**, príp. iné varianty, vrátane variantov s neznámou signifikanciou, ktoré môžu byť potenciálne klinicky relevantné.

- Uvádzanie DNA variantov pomocou aktuálne platnej nomenklatúry spoločnosti *Human Genome Variation Society* (HGVS), a to na úrovni genomickej referenčnej sekvencie (“g.”), kódujúcej DNA referenčnej sekvencie (“c.”) a proteínovej referenčnej sekvencie (“p.”), príp. mitochondriálnej referenčnej sekvencie (“m.”), všetko vzhľadom k jednoznačne definovanej a voľne dostupnej referenčnej sekvencii genómu, príslušného génu, príp. rs identifikátor DNA variantu.
- Pri každom reportovanom variante uviesť interpretáciu, t.j. príslušnú aktuálnu klasifikáciu klinického významu, pričom je vhodné uviesť aj konkrétne kritériá, ktoré daný variant v kontexte hodnotenia spĺňa (napr. frekvencia v populačných databázach, lokalizácia vo funkčných doménach proteínu, asociácia s typom dedičnosti atď.).
- Odporúča sa, aby na vyžiadanie bola dostupná elektronická príloha s kompletným zoznamom anotovaných DNA variantov identifikovaných v cieľových oblastiach analýzy.
- Jednoznačný záver vyšetrenia s interpretáciou príslušných klinicky relevantných DNA variantov s ďalšími molekulárno-genetickými odporúčaniami, ak také existujú.

6. Laboratórna evidencia a dokumentácia procesov postupov MPS

Odporúča sa dodržiavať všeobecne definované normy laboratórnej evidencie (napr. ISO 15189:2012), vrátane podrobnej laboratórnej evidencie a dokumentovania bioinformatických postupov, t.j. použité nástroje, ich verzie a nastavenia.

7. Archivácia biologického materiálu a generovaných sekvenačných dát, ich ochrana a zdieľanie

Odporúča sa, aby laboratória vykonávajúce MPS zabezpečili archiváciu biologického materiálu ako aj archiváciu generovaných dát minimálne v podobe FASTQ súborov, optimálne aj v podobe BAM, BAI a VCF súborov použitých pri hodnotení výsledkov MPS analýzy v zmysle príslušného zákona.

Dáta získané prostredníctvom MPS analýz (predovšetkým väčšieho rozsahu, napr. CES, WES, WGS) môžu obsahovať informácie použiteľné pre identifikáciu osôb na individuálnej úrovni a sú preto považované za osobné údaje podliehajúce ochrane osobných údajov podľa pravidiel GDPR, resp. zákona č. 18/2018. Každé laboratórium preto musí mať interné predpisy a postupy zamedzujúce úniku a potenciálnemu zneužitiu týchto informácií.

Sekvenačné dáta spracované v rôznych úrovniach (FASTQ, BAM, VCF) môžu byť potenciálne využiteľné aj pri následných analýzach alebo reanalýzach, pri ktorých nemusí byť nevyhnutné opakovať laboratórnu časť sekvenačnej analýzy, resp. postačuje reanalýza už získaných sekvenačných dát. V takýchto prípadoch sa odporúča využiť zdieľanie sekvenačných dát medzi laboratóriami, pričom toto je podmienené formalizovanou požiadavkou zo strany lekárskeho genetika. Lekársky genetik v žiadosti definuje svoju požiadavku s ohľadom na dôvod reanalýzy pôvodne získaných sekvenačných dát a definuje pracovisko, ktoré reanalýzu vykoná.

Súčasťou zdieľania generovaných dát môže byť aj pseudonymizovaný/anonymizovaný súbor klinicky relevantných sekvenčných variantov, spolu s prislúchajúcimi údajmi umožňujúcimi klasifikáciu klinického dopadu variantu, do medzinárodných databáz sekvenčných variantov (napr. dbSNP, ClinVar, HGMD, atď.), príp. do databáz špecifických pre ochorenie (ak sú relevantné).

8. Reanalýza MPS dát

V nadväznosti na uskutočnený rozsah MPS vyšetrenia je možné uskutočniť reanalýzu pôvodných výstupov MPS dát, príp. rozšírenie pôvodne hodnotenej genomickej oblasti, ale až na základe dodatočného písomného vyžiadania lekárskeho genetika.

9. Overovanie nálezov získaných pomocou MPS

Overovanie nálezov získaných pomocou MPS je možné riešiť z pohľadu dvoch hlavných alternatívnych dôvodov vykonania overovacích analýz:

- 1) Overovanie sa uskutočňuje použitím tej istej alebo alternatívnej metodiky, príp. z nového odberu biologického materiálu, a to **na vylúčenie zámeny** biologických vzoriek, príp. k nim prislúchajúcich molekulárno-genetických dát. V týchto prípadoch **sa odporúča vykonať overovania** relevantných nálezov podľa štandardne zaužívaného postupu v laboratóriu, a to v rozsahu “patogénnych” a “pravdepodobne patogénnych” DNA variantov, prípadne ďalších variantov ktoré sú potenciálne klinicky relevantné.
- 2) V prípade overovania z **pohľadu technickej spoľahlivosti MPS výsledkov** je potrebné zvážiť vybrané kvalitatívne a kvantitatívne parametre analýzy konkrétnych klinicky relevantných DNA variantov. Ak kvalitatívne a kvantitatívne parametre identifikovaných variantov **vykazujú vysokú spoľahlivosť** (počet čítaní variantu, hĺbka čítania variantu, pomer čítaní variantu z oboch smerov), **nevyžaduje sa overiť** identifikované varianty alternatívnou metodikou.
 - **Kontrolu kvalitatívnych a kvantitatívnych parametrov** individuálnych variantov sa odporúča uskutočniť v prípade DNA variantov s kauzálnym klinickým efektom, t.j. v prípade reportovaných variantov.
 - **Parametre** na kontrolu kvality DNA variantu predstavujú skóre kvality genotypu, celkový počet čítaní pre relevantnú oblasť (pokrytie oblasti záujmu), podiel čítaní potvrdzujúcich alternatívnu alelu, skóre kvality mapovania čítaní alternatívnej alely, orientácia čítaní alternatívnej alely, umiestnenie variantu v rámci čítaní potvrdzujúcich jeho prítomnosť, celkový sekvenčný kontext variantu (zvýšenú pozornosť je potrebné venovať napr. DNA variantom v homopolymérnych a repetitívnych oblastiach).
 - Odporúča sa, aby si hranice spoľahlivosti relevantných parametrov stanovilo laboratórium na základe verifikačných resp. validačných postupov.
 - Ak je **spoľahlivosť identifikovaných variantov neistá**, t.j. nie sú splnené parametre spoľahlivosti, vyžaduje sa **uskutočnenie konfirmačnej analýzy** prítomnosti DNA variantu inou metódou.
 - V prípade, ak sa identifikované DNA varianty neoverujú z nového odberu biologického materiálu, alebo pomocou nezávislej metódy, **odporúča sa identitu vyšetrovanej vzorky a MPS dát overiť** (napr. pomocou vybraných klinicky neutrálnych genomických markerov). Genotypizácia DNA markerov sa môže uskutočniť konvenčnou metódou z pôvodnej biologickej vzorky, pričom sa prislúchajúce genotypy extrahujú aj priamo z MPS dát a porovnávajú sa vzájomne.

10. Predpokladaný ďalší audit a revízia týchto odporúčaní

Pravidelná revízia predloženého dokumentu v období 1x za 4 roky, pričom revízii bude podliehať celý dokument, a to na základe otázok vyvstávajúcich z rutinného využívania tohto dokumentu v praxi, ako

aj na základe nových vedomostí a zmien legislatívy SR/EU a medzinárodných/domácich usmernení a odporúčaní relevantných odborných spoločností. V prípade významných zmien v technológii sa bude vykonávať revízia podľa potreby.

11. Vymedzenie základných pojmov

11.1. Generácie sekvenačných metód

V súčasnosti delíme DNA sekvenačné metódy na tri generácie, ktoré sú odlišené najmä princípmi technologických postupov. Každá z uvedených generácií sekvenovania môže využívať odlišné technologické postupy a môže pozostávať z rôznych sekvenačných platforiem.

- (1) Za **prvú generáciu** sa všeobecne považuje metóda Sangerovho DNA sekvenovania, založená na terminácii vznikajúcich reťazcov pomocou dideoxynukleotid trifosfátov a následnej separácii fragmentov pomocou kapilárnej elektroforézy (Sanger a kol., 1977). Jednou z najdôležitejších črt tejto metódy je potreba klonálnej amplifikácie cieľovej sekvencie za účelom zosilnenia generovaných špecifických signálov. Druhou charakteristickou črtou je dĺžka "čítanej" DNA sekvencie, t.j. 600-1000 bp. Optimálne využitie metódy je najmä v prípadoch, pri ktorých je potrebná analýza malého počtu dobre známych sekvenčných variantov, alebo génov s malým počtom exónov (Kircher a Kelso, 2010).
- (2) **Druhá generácia** sekvenačných metód vyžaduje klonálnu amplifikáciu cieľových sekvencií pred uskutočnením samotnej sekvenačnej reakcie. Má však podstatne vyššiu kapacitu a umožňuje paralelné sekvenovanie miliónov krátkych fragmentov DNA v jednej reakcii (35-1000 bp, v závislosti od použitej platformy a technológie). Prvýkrát sa pri nej použil pojem **masívne paralelné sekvenovanie** (Mardis, 2008), prípadne vysokoparalelné sekvenovanie alebo sekvenovanie novej generácie (Next Generation Sequencing, NGS). Za hlavné metodiky biomedicínskych aplikácií môžeme aktuálne označiť práve etablované systémy 2. generácie sekvenačných metód, ktoré sa dostali aj do rutínnej klinickej diagnostickej praxe. Platformy a testy patriace do tejto generácie sú hlavným predmetom tohto dokumentu.
- (3) Platformy **tretej generácie** predstavujú jednomolekulové DNA sekvenovanie, fungujúce často aj bez klonálnej amplifikácie DNA molekúl. Uvedené technológie používajú citlivejšie detekčné systémy, príp. iné nukleotid špecifické fyzikálne signály (ako napr. zmena elektrického prúdu v nanopóroch). Uvedená technológia umožňuje redukciu možnosti chýb vyplývajúcich práve z klonálnej amplifikácie. Výhodou je tiež dĺžka čítaní cieľovej oblasti, ktorej sekvencia sa stanoví v rámci jedného čítania, pričom platformy aktuálne ponúkajú dĺžky individuálnych čítaní 10-60 kb. V rámci uvedených techník tak klesajú nároky na vyhodnocovanie výsledkov, maximalizuje sa množstvo získaných informácií, napr. zväčšuje sa dynamický rozsah priamej detegovateľnosti chromozómových prestavieb a variácií počtu kópií, zlepšujú sa možnosti stanovenia vzájomnej fázy rôznych variantov na homologických chromozómoch, ako aj možnosti analýzy repetitívnych oblastí (Schadt a kol. 2010).

Prvá generácia sekvenačných metód sa všeobecne považuje za technologicky homogénnu. Naopak druhá a tretia generácia sekvenačných metód je výrazne heterogénna, a to najmä z hľadiska rozsahu analyzovaných genomických oblastí, resp. typov identifikovateľných sekvenčných zmien, ako aj z hľadiska technológie prípravy sekvenačných knižníc, v princípoch generovania a detekcie signálov, v samotnom prístrojovom vybavení a v použítom spotrebnom materiáli (Mardis 2008; Metzker 2010). Najväčšiu zmenu oproti klasickým analýzám predstavuje množstvo generovaných sekvenačných dát, a následná bioinformatická časť hodnotenia výsledkov, ktorá sa pre väčšinu nálezov uskutočňuje

automatizovane. Detailná kontrola klinicky relevantných výsledkov je však stále dôležitá a nevyhnutná (Kubiritova a kol., 2019).

11.2. Typy nálezov pri používaní genetických MPS analýz

Typy klinicky relevantných nálezov rozdeľujeme do troch kategórií, a to v súvislosti s interpretáciou výsledkov analýzy a vo vzťahu k primárne stanovenej cieľovej oblasti analýzy. **Primárne nálezy** sú relevantné z hľadiska primárneho zamerania analýzy, čiže prinášajú potenciálnu odpoveď na základnú klinickú indikáciu (napr. jednoznačne asociujú s fenotypom probanda). **Sekundárne nálezy** nevysvetľujú základnú klinickú indikáciu, prinášajú však iné klinicky relevantné informácie a vyžadujú aktívne vyhľadávanie aj mimo primárnych cieľových oblastí analýzy. Ich aktívne vyhľadávanie v sekvenčných dátach je relevantné najmä pri použití rozsiahlejších génových panelov, akými sú napr. klinické exómy, celé exómy, celé genómy. **Náhodné**, alebo **nevyžiadané nálezy** prinášajú klinicky relevantné informácie, ktoré nesúvisia so základnou klinickou indikáciou, ale boli náhodne identifikované. Na rozdiel od sekundárnych nálezov, ich identifikácia teda nie je výsledkom aktívneho vyhľadávania sekvenčnej variability mimo primárneho cieľa testovania. Konkrétne zaradenie nálezu do týchto kategórií však mnohokrát závisí od celkového kontextu analýzy (Kalia a kol., 2016; Ormond a kol., 2019).

11.3. Klasifikácia MPS testov

Z hľadiska rozsahu testovanej genomickej oblasti sa analýzy založené na MPS najčastejšie rozdeľujú na:

- (1) **Sekvenovanie súboru určitých definovaných oblastí genómu** je selektívne sekvenovanie vybraných génov, resp. genomických lokusov. Sú vo všeobecnosti menej náročné z finančného, technologického, aj z analyzačného pohľadu, avšak je pri ich používaní potrebné uskutočniť selektívne obohatenie vzorky o oblasti záujmu. Gény v takýchto paneloch sú najčastejšie vybrané na základe ich asociácie, resp. kauzality vo vzťahu s určitým ochorením, alebo so skupinou ochorení (napr. neuromuskulárny panel, metabolický panel, a pod.). Výhodou je možnosť analýzy väčšieho počtu vzoriek v rámci kapacity daného sekvenáčného behu, alebo dosiahnutie väčšej hĺbky čítania sekvencie. Počet génov, alebo rozsah oblastí, zahrnutých do sekvenovania je vysoko variabilný, pričom môžeme jednotlivé prístupy rozdeliť nasledovne:
 - (a) **Panelové sekvenovanie** - zamerané na sekvenovanie panelov génov s rôznou početnosťou, kam môžu byť typicky zaradené **špecifické panely klinicky príbuzných a geneticky heterogénnych ochorení**, ako napr. neuromuskulárny panel, metabolický panel, a pod.
 - (b) **Sekvenovanie tzv. klinického exómu (CES)**, t.j. analýza proteín kódujúcej časti klinicky relevantných génov, zväčša uvedených v databázach OMIM, alebo Orphanet, čiže génov, ktorých asociácia s určitým ochorením je všeobecne známa.
 - (c) **Celoexómové sekvenovanie (WES)**, t.j. všetky proteín kódujúce oblasti, čiže exóny známych génov, exón-intrón hranice, prípadne aj 5'- a 3'-neprekľadané oblasti, podľa dizajnu konkrétneho produktu.
- (2) **Celogenómové sekvenovanie** ponúka množstvo dát z kódujúcich aj z nekódujúcich oblastí genómu a eliminuje niektoré technické limitácie génových panelov vychádzajúce z prípravy knižníc, resp. procesu obohatenia sekvencií. So zväčšovaním sekvenovanej oblasti sa rapídne zvyšujú aj nároky na ich analýzu, interpretáciu a archiváciu, čím následne klesá hĺbka čítania sekvencie.

V rámci vyššie uvedených prístupov možno využiť aj tzv. virtuálne génové panely, ktoré sa dajú z aplikačného hľadiska považovať za samostatnú kategóriu a predstavujú určitý hybrid predchádzajúcich technologických kategórií. V nich sa sekvenčné dáta generujú na úrovni panelov génov až celého genómu, vyhodnotia sa však iba vybrané genomické oblasti záujmu (vybrané virtuálne génové panely), a to pomocou bioinformatickej selekcie príslušných čítaní. V rámci týchto virtuálnych génových paneloch sa následne identifikujú, analyzujú a hodnotia sekvenčné varianty. Výhodou tohto postupu je, že v prípade potreby je možné bioinformatickú analýzu ľahko rozšíriť o ďalšie oblasti, a to bez potreby opakovania laboratórnych procesov.

12. Zoznam skratiek

bp - bázoové páry

MPS - masívne paralelné sekvenovanie

NGS - next generation sequencing, sekvenovanie ďalšej generácie

IS - informovaný súhlas

ESHG - European Society of Human Genetics

ACGS - Association for Clinical Genomic Science

ACMG - American College of Medical Genetics and Genomics

SSLG - Slovenská spoločnosť lekárskej genetiky

HGVS - Human Genome Variation Society

SNV - Single Nucleotide Variants

CNV - Copy Number Variation

CES - Clinical Exome Sequencing

WES - Whole Exome Sequencing

WGS - Whole Genome Sequencing

13. Odporúčaná literatúra

- Association fo Clinical genetic Science, Practice guidelines for sanger sequencing analysis and interpretation. ACGS 2016. Available from:
http://www.acgs.uk.com/media/1025065/acgs_sanger_sequencing_bpg_update_2016.pdf
- Kalia, S.S., Adelman, K., Bale, S.J., Chung, W.K., Eng, C., Evans, J.P., Herman, G.E., Hufnagel, S.B., Klein, T.E., Korf, B.R., McKelvey, K.D., Ormond, K.E., Richards, C.S., Vlangos, C.N., Watson, M., Martin, C.L., Miller, D.T., 2017. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet. Med.* 19, 249–255.
- Kircher, M., Kelso, J., 2010. High-throughput DNA sequencing—concepts and limitations. *Bioessays* 32, 524–536.
- Kubiritova Z, Gyuraszova M, Nagyova E, Hyblova M, Harsanyova M, Budis J, Hekel R, Gazdarica J, Duris F, Kadasi L, Szemes T, Radvanszky J. (2019): On the critical evaluation and confirmation of germline sequence variants identified using massively parallel sequencing. *J Biotechnol.* 298:64-75.
- Mardis ER: Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 9387-402, 2008

- 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, 2020. Best practices for the analytical validation of clinical whole-genome sequencing intended for the diagnosis of germline disease. Medical Genome Initiative. 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., 2016. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. Eur. J. Hum. Genet. 24, 1515.
- Metzker, M.L., 2010. Sequencing technologies - the next generation. Nat. Rev. Genet. 11, 31–46.
- Ormond, K.E., O'Daniel, J.M., Kalia, S.S., 2019. Secondary findings: How did we get here, and where are we going? Journal of Genetic Counseling. <https://doi.org/10.1002/jgc4.1098>
- Regier, A.A., Farjoun, Y., Larson, D.E., Krasheninina, O., Kang, H.M., Howrigan, D.P., Chen, B.-J., Kher, M., Banks, E., Ames, D.C., English, A.C., Li, H., Xing, J., Zhang, Y., Matise, T., Abecasis, G.R., Salerno, W., Zody, M.C., Neale, B.M., Hall, I.M., 2018. Functional equivalence of genome sequencing analysis pipelines enables harmonized variant calling across human genetics projects. Nat. Commun. 9, 4038.
- Rehm, H.L. et al., ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. Gen. Med. 2013; 15:733-747
- Richards, S. et al., Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology, Gen. Med. 2015; 17:405-424
- Riggs et al., Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen), Genet Med. 2020;22(2):245-257.
- Roy, S., Coldren, C., Karunamurthy, A., Kip, N.S., Klee, E.W., Lincoln, S.E., Leon, A., Pullambhatla, M., Temple-Smolkin, R.L., Voelkerding, K.V., Wang, C., Carter, A.B., 2018. Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines: A Joint Recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists. J. Mol. Diagn. 20, 4–27.
- Sanger F, Nicklen S, a Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A, 74(12):5463-5467, 1977.
- Schadt EE, Turner S, a Kasarskis A: A window into third-generation sequencing. Hum Mol Genet, 19(R2):R227-R240, 2010.