

Technische Informationen WES und Genpaneldiagnostik

Informationsblatt für einsendende verantwortliche Ärztinnen und Ärzte

Betriebszeiten und Kontakt

Telefonische Erreichbarkeit für Rückfragen:

Montag – Donnerstag: 9:00 – 15:00 Uhr

Freitag: 9:00 – 13:00 Uhr

Tel.: 0731 / 150-599

molekulare-diagnostik@blutspende.de

Bitte beachten Sie, dass wir aus Gründen des Datenschutzes telefonisch keine Auskunft zu Befunden geben können.

Standort Labor

IKT/MVZ Ulm gemeinnützige GmbH

Abt. Molekulare Diagnostik, Molekulare Therapie und Experimentelle Transplantation

Helmholtzstraße 10

89081 Ulm

Zweckbestimmung

Das In-house In-vitro-Diagnostikum (IH-IVD) „Whole-Exome-Sequenzierung mittels NextSeq 2000 (Illumina)“ ist ein System bestehend aus einem Instrument, Kits, Reagenzien, Kontrollmaterialien sowie bioinformatischer Software.

Das IH-IVD ist zur qualitativen Detektion, Bestimmung, Bewertung und Interpretation genetischer Varianten (Single Nucleotide Variants (SNVs), Insertionen und Deletionen (InDels)) im kodierenden Bereich des menschlichen Genoms (Exom) sowie in indikationsbezogenen Genpanels vorgesehen.

Mittels zielgerichtetem Target Enrichment, Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierter Amplifikation und massiv-paralleler Sequenzierung (MPS, engl. massively parallel sequencing) werden Sequenzdaten erzeugt, die anschließend nach indikationsbezogenen Genpanels (spezifiziert in IH-IVD-01-01 Zweckbestimmung) bioinformatisch gefiltert und ausgewertet werden.

Das IH-IVD ist für die Verarbeitung von humaner genomischer DNA sowie von aus diesen Proben abgeleiteten DNA-Sequenzierungsdaten bestimmt. Die Anwendung erfolgt im Rahmen eines überwiegend manuellen Assays. Das IH-IVD ist vorgesehen zur Anwendung bei Personen jeden Alters und Geschlechts mit klinischem Verdacht auf genetisch bedingte Erkrankungen oder genetische Veränderungen, insbesondere auf potenzielle Keimbahnvarianten in Exonen und dient der Bereitstellung diagnostisch relevanter Informationen über:

- Prädispositionen für Erkrankungen,
- angeborene körperliche oder geistige Beeinträchtigungen,
- physiologische oder pathologische Zustände,
- die Unterstützung therapeutischer Entscheidungen sowie
- die Vorhersage des Ansprechens auf eine Behandlung im indikationsbezogenen Kontext.

Die vorgesehene Funktion des IH-IVD ist die diagnostische Unterstützung. Die Ergebnisse sind nicht als alleinige Grundlage für klinische Entscheidungen vorgesehen, sondern müssen im Zusammenhang mit weiteren klinischen, laboratoriumsmedizinischen Untersuchungen und im Zuge einer genetischen Beratung interpretiert werden. Somatische Genvarianten, sowie große Strukturvarianten und Kopienzahlvarianten (CNV, engl. copy number variant) sind nicht Gegenstand der Untersuchung und werden mit dem IH-IVD nicht erfasst.

Das IH-IVD ist nicht für Point-of-Care-Anwendungen bestimmt.

Die Zweckbestimmung gilt ausschließlich innerhalb der im Rahmen der Leistungsbewertung validierten Anwendungsbedingungen und Leistungsparameter.

Die Anwendung des IH-IVD ist ausschließlich durch geschultes Fachpersonal (z. B. wissenschaftliches-, medizinisch-technisches und ärztliches Personal) vorgesehen und erfolgt innerhalb einer in der Europäischen Union ansässigen Gesundheitseinrichtung im Rahmen einer In-house-IVD-Anwendung gemäß Artikel 5 Absatz 5 der Verordnung (EU) 2017/746.

Vor der Untersuchung

1. Entnahme, Transport und Versand der Proben

- Alle Proben und Formulare sind zur **eindeutigen Patientenidentifizierung** vollständig und gut lesbar zu beschriften.
- **Blutproben:** Bitte senden Sie **mindestens 2 ml EDTA-Blut**.
- **Isolierte DNA** kann ebenfalls eingesendet werden (**mind. 30 µl und mind. 20 ng/µl**).
- Eine späte Blutentnahme am Abend ist möglich; Lagerung von Blutproben bis zum nächsten Tag bei **1–37 °C**, geschützt vor direkter Sonneneinstrahlung.
- Versand ist an **jedem Wochentag** möglich. Zur Vorbeugung von Komplikationen ist der Hinweis „Biologische Probe der Kategorie B UN3373 Freigestellte medizinische Probe (menschlich)“ auf dem Päckchen zu vermerken.
- **Hinweis: Unbeschriftete Proben** können nicht verwendet werden und werden bei fehlgeschlagener Kontaktaufnahme mit der einsendenden Ärztin/dem einsendenden Arzt **entsorgt**.

2. Störfaktoren

Die Art der Probengewinnung, der Probentransport (z. B. Postweg) sowie die Probenlagerung spielen für die Gewinnung von DNA üblicherweise nur eine untergeordnete Rolle und stellen daher im Normalfall keine Störfaktoren dar. Die Präsenz möglicher Störfaktoren wird beim Probeneingang soweit möglich geprüft und im Analyse- und Bewertungsprozess berücksichtigt.

3. Verpflichtung zur genetischen Beratung

Die genetische Beratung vor und nach der Untersuchung liegt in der Verantwortung der **einsendenden Stelle**. Gemäß **Gendiagnostikgesetz (GenDG)** obliegt es der/dem verantwortlichen Ärztin/Arzt, die Patientinnen/Patienten aufzuklären, die schriftliche Einwilligung einzuholen und diese im diagnostischen und psychosozialen Prozess zu begleiten.

4. Anforderungen an die Einverständniserklärung

Vor der genetischen Untersuchung muss eine **schriftliche Einverständniserklärung** der Patientin/des Patienten vorliegen, die den Vorgaben des **GenDG** entspricht. In unserem Einsendeschein ist eine entsprechende Vorlage zur Einverständniserklärung enthalten, welche gemeinsam mit der Patientin/dem Patienten auszufüllen ist. Die ausgefüllte Einverständniserklärung (Original oder Kopie) muss uns vorliegen, damit wir mit der Analyse beginnen können. Bei Fehlen der Einverständniserklärung erfolgt eine Kontaktaufnahme mit der einsendenden Stelle. Die Bearbeitung pausiert bis zum Eingang der vollständigen Unterlagen.

5. Angabe von HPO-Terms auf dem Einsendeschein

Auf dem Einsendeschein sollten die klinischen Auffälligkeiten der Patientin/des Patienten möglichst präzise anhand der **Human Phenotype Ontology (HPO)** angegeben werden.

Die HPO ist ein international standardisiertes und kontrolliertes Vokabular, mit dem krankheitsrelevante Merkmale eindeutig und einheitlich beschrieben werden können. Jeder Begriff (HPO-Term) ist durch eine eindeutige ID und eine klar definierte medizinische Beschreibung gekennzeichnet. Die Angabe dieser Begriffe ermöglicht es, die erhobenen klinischen Informationen gezielt mit genetischen Daten zu verknüpfen und diese mithilfe bioinformatischer Software effizient auszuwerten.

Werden **keine HPO-Terms** angegeben, muss das Labor diese auf Grundlage der übermittelten Indikation und weiteren medizinischen Angaben schätzen. Dies kann die bioinformatische Analyse erschweren, den Filterprozess weniger zielgerichtet machen und damit die diagnostische Aussagekraft beeinflussen.

Eine vollständige Übersicht aller HPO-Begriffe, Suchfunktionen sowie weiterführende Informationen finden Sie unter: <https://hpo.jax.org/>

Die genetische Untersuchung

1. Umfang der Laborarbeiten

Das Labor führt die molekulargenetische Analyse gemäß den geltenden Richtlinien der ISO 15189 durch. Die Verarbeitung umfasst DNA-Extraktion (sofern nicht isolierte DNA eingesendet wird), Sequenzierung, bioinformatische Auswertung und Erstellung eines schriftlichen Befundberichts. Der Untersuchungsworkflow einschließlich Library-Präparation, Sequenzierung, bioinformatischer Prozessierung, Variantenfilterung und Befundung ist als In-house-IVD gemäß Artikel 5 Absatz 5 der Verordnung (EU) 2017/746 (IVDR) validiert und zertifiziert.

2. Sequenzierung und Datenauswertung

Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgt mittels Hochdurchsatzsequenzierung auf dem Illumina NextSeq 2000, wobei kurze Paired-End-Reads generiert werden. Unabhängig vom angeforderten Untersuchungsumfang wird aus technischen Gründen stets das gesamte Exom sequenziert. Die anschließende bioinformatische Auswertung und Befundung beschränkt sich jedoch ausschließlich auf die im Einsendeschein angeforderten Panelgene. Eine Auswertung und Befundung des gesamten Exoms erfolgt nicht.

Bioinformatische Prozessierung

Die Konvertierung der Rohdaten vom BCL- in das FASTQ-Format sowie das Demultiplexing erfolgen mit DRAGEN, Version 4.2.7. Das Alignment der Sequenzreads gegen das humane Referenzgenom hg38 sowie die Variantendetektion werden mit der DRAGEN-Pipeline (Version 3.6) durchgeführt.

Variantenfilterung und -bewertung

Im validierten Untersuchungsumfang werden Einzelnukleotidvarianten (SNVs) sowie kleine Insertionen und Deletionen (InDels) bis 20 bp detektiert, bewertet und interpretiert. Die detektierten Varianten werden nach der bioinformatischen Prozessierung auf die im Einsendeschein angeforderten Panelgene und die jeweilige Untersuchungsindikation gefiltert. Für die Variantenfilterung sowie als Unterstützung bei der Annotation und Klassifizierung nach den Kriterien des American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) wird die Software Emedgene (Version 39) sowie die darin enthaltenen Ressourcen (gnomAD, Ensembl Variant Effect Predictor (VEP), dbNSFP, Emedgene® DB, SnpSift, SnpEff, ExAC, GWAS GRC, HGMD, ClinVar, Breast Cancer Information Core (BIC), BRCA Exchange, The Greater Middle East (GME), Amish Coriell and Mennonite, dbSNP, GERP, 1000 Genomes, Online Mendelian Inheritance in Man® (OMIM), Clinical Genomic Database (CGD), Orphanet, Emedgene® Gene-Disease Knowledge Graph) eingesetzt.

Die ACMG-Klassifizierung und die abschließende fachliche Bewertung und Interpretation der Varianten werden immer durch qualifiziertes, fachkundiges Personal vorgenommen. Die Software Emedgene dient dabei lediglich als unterstützendes Hilfsmittel für die strukturierte Variantenfilterung und Annotation. Die Befundung berücksichtigt die Untersuchungsindikation, die verfügbaren Referenz- und Datenbankinformationen sowie die festgelegten fachlichen Bewertungskriterien.

3. Limitationen der Untersuchung

Die Auswertbarkeit der Untersuchung ist von der Qualität und Quantität des eingesendeten Untersuchungsmaterials abhängig. Unzureichendes oder qualitativ beeinträchtigtes Material kann zu einer verminderten Sequenzqualität, einer unvollständigen Abdeckung oder nicht auswertbaren Zielregionen führen. Die Auswertung und Befundung erfolgt entsprechend dem Untersuchungsauftrag ausschließlich für die im Einsendeschein angeforderten Panelgene.

Aufgrund der technischen Limitationen der Methode können genetische Veränderungen vorliegen, die mit dem eingesetzten Verfahren nicht erfasst werden können. Ein unauffälliger Befund schließt daher das Vorliegen einer genetischen Veränderung nicht aus und ist stets im klinischen Gesamtkontext zu bewerten.

Im Rahmen der Validierung wurde bestätigt, dass unter den festgelegten Untersuchungsbedingungen mindestens 95 % der untersuchten exonischen Zielregionen eine Sequenzabdeckung von mindestens 20X erreichen. Dieses Qualitätskriterium wird bei jeder Untersuchung angestrebt. Aufgrund der unterschiedlichen

und teilweise komplexen Beschaffenheit einzelner genomischer Regionen kann die Abdeckung in bestimmten Bereichen geringer ausfallen. Im Rahmen der Validierung wurden bestimmte Regionen wiederholt mit einer Abdeckung von weniger als 20X beobachtet (für detaillierte Angaben [hier klicken](#)). Unabhängig davon werden im Befund stets sämtliche Regionen der angeforderten Gene angegeben, die in der jeweiligen Analyse unzureichend abgedeckt waren.

Mit der angebotenen Methode können folgende Varianten erfasst werden:

- Einzelnukleotidvarianten (SNVs)
- kleine Insertionen bis 20 bp
- kleine Deletionen bis 20 bp
- kleine Insertionen und Deletionen (InDels) bis 20 bp

Die folgenden Varianten und Variantenklassen können mit dem eingesetzten Verfahren **nicht** erfasst werden:

- strukturelle Varianten (SV), beispielsweise große Deletionen und Duplikationen
- Kopienzahlvarianten (CNVs)
- balancierte Translokationen
- mitochondriale Varianten (MT)
- Repeat-Expansionen (REs)
- Varianten in homologen Sequenzbereichen
- Mosaik
- somatische Varianten

Die Untersuchung ist auf den Nachweis und die Bewertung von **Keimbahnvarianten** ausgerichtet. Eine Aussage zur Detektion somatischer Varianten ist nicht Bestandteil der Untersuchung.

Die Detektion kleiner Insertionen und Deletionen kann in wiederholungsreichen genomischen Regionen eingeschränkt sein. Diese sogenannten „Difficult Regions“ werden bei der Auswertung berücksichtigt und können zu einer eingeschränkten Beurteilbarkeit von InDels führen. Die für die untersuchten Panelgene relevanten Difficult Regions sind in der [Übersichtstabelle](#) aufgeführt.

Die Klassifizierung der nachgewiesenen Varianten erfolgt auf Grundlage des zum Zeitpunkt der Befunderstellung verfügbaren wissenschaftlichen Kenntnisstands, der zu diesem Zeitpunkt verfügbaren relevanten Datenbankeinträge sowie der jeweils aktuellen ACMG/AMP-Bewertungskriterien. Da sich der wissenschaftliche Kenntnisstand, Datenbankinhalte und Bewertungskriterien weiterentwickeln können, ist eine spätere abweichende Bewertung einer Variante nicht auszuschließen.

4. Restrisiken

Trotz sorgfältiger Durchführung, Validierung des Workflows und umfassender Qualitätskontrollen können genetische Veränderungen mit der eingesetzten Methode unerkannt bleiben.

Restrisiken ergeben sich aus präanalytischen, analytischen und postanalytischen Einflussfaktoren sowie aus methodischen Limitationen, biologischer Variabilität und statistischen Unsicherheiten, wodurch auch falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden können. Darüber hinaus hängt die Interpretation der Ergebnisse von der Verfügbarkeit, Aktualität und Qualität zugrundeliegender Referenzdatenbanken sowie vom aktuellen Stand wissenschaftlicher Erkenntnisse ab, was die Aussagekraft einzelner Befunde einschränken kann.

Ein unauffälliger Befund schließt daher eine genetische Ursache nicht sicher aus und ist stets im klinischen Gesamtkontext zu bewerten.

Nach der genetischen Analyse

1. Verfügbarkeit der Ergebnisse

Die schriftlichen Ergebnisse stehen in der Regel **innerhalb von ca. 4-12 Wochen** nach Probeneingang zur Verfügung. In Einzelfällen kann sich die Bearbeitungszeit verlängern, beispielsweise bei komplexen Befunden oder notwendigen Wiederholungen.

2. Befundübermittlung

- Vom Labor erfolgt **keine mündliche Auskunft** zum Befund.
- Befunde werden mittels verschlüsselter E-Mail ausschließlich an die/den verantwortliche/n Ärztin/Arzt übermittelt.
- Die E-Mail-Adressen müssen klar lesbar auf dem Einsendeschein angegeben werden. Im Falle von nicht lesbaren E-Mail-Adressen wird der Postweg gewählt.
- Sämtliche Ergebnisse sind dem schriftlichen Befundbericht zu entnehmen.

3. Befund

Die Nomenklatur der gefundenen Varianten erfolgt nach den Empfehlungen der Human Genome Variation Society (HGVS). Zusätzlich wird die jeweilige chromosomale Position der Varianten basierend auf dem humanen Referenzgenom hg38 angegeben. Die Klassifizierung und Einordnung der detektierten Varianten erfolgt durch qualifiziertes Fachpersonal unter Zuhilfenahme der Software Emedgene (Version 39). Die Bewertung orientiert sich an den aktuell etablierten Richtlinien von ACMG (Richards et al. 2015; PMID: 25741868), AMP sowie an den verfügbaren Informationen aus ClinVar. In die Bewertung einbezogen werden Sequenzvarianten (SNVs und kleine Indels ≤ 20 bp) mit einer Populationsfrequenz unter 5 %, sofern sie sich innerhalb der kodierenden Regionen der angeforderten Gene oder in deren angrenzenden, intronischen Bereichen (± 20 Basenpaare) befinden. Die Häufigkeiten der Varianten werden mithilfe öffentlich zugänglicher Referenzdatenbanken (z. B. gnomAD) sowie einer internen Vergleichsdatenbank ermittelt. Bei der Beurteilung werden die zum Zeitpunkt der Analyse vorliegenden klinischen Informationen berücksichtigt. In den Befund aufgenommen werden alle Varianten, die als pathogen, wahrscheinlich pathogen oder Variante unklarer Signifikanz für das entsprechende Krankheitsbild eingestuft wurden.

Der genetische Befund stellt eine diagnostische Hilfestellung dar und ist nicht als alleinige Grundlage für eine gesicherte Diagnose geeignet. Die Interpretation der Ergebnisse sollte stets im klinischen Kontext erfolgen und mit den klinischen Symptomen, der Anamnese sowie gegebenenfalls weiteren diagnostischen Kriterien und Untersuchungen kombiniert werden, um eine belastbare diagnostische Bewertung zu ermöglichen. Bei gesicherter Diagnose einer genetischen Erkrankung ist eine genetische Beratung anzubieten.

4. Fehlanwendungen

Die nachfolgend aufgeführten Fehlanwendungen des IH-IVDs beziehen sich auf Fragestellungen außerhalb der Zweckbestimmung und sind daher zu unterlassen:

- Verwendung des genetischen Untersuchungsergebnisses als alleinige Grundlage für eine klinische Diagnose oder therapeutische Entscheidung ohne Einbeziehung der klinischen Symptomatik, der Anamnese sowie weiterer relevanter diagnostischer Informationen.
- Fehlinterpretation der Untersuchungsergebnisse durch Personen ohne entsprechende fachliche Qualifikation oder genetische Expertise.
- Anwendung der Untersuchung außerhalb der vorgesehenen Zweckbestimmung, insbesondere außerhalb der definierten Indikationen oder klinischen Fragestellungen.
- Fehlanahmen hinsichtlich der diagnostischen Sensitivität, Spezifität, Vollständigkeit oder des Detektionsspektrums des eingesetzten analytischen Systems, einschließlich methodisch oder technisch bedingter Limitationen.

5. Verfügbarkeit von Beratungsdienstleistungen

Für ärztliche Rückfragen zur Interpretation von Befunden steht unser Team während der Betriebszeiten per Mail zur Verfügung. Eine genetische Beratung der Patientinnen und Patienten erfolgt jedoch ausschließlich durch den verantwortlichen Arzt / die verantwortliche Ärztin.

6. Meldung schwerwiegender Vorkommnisse

Der einsendende Arzt / die einsende Ärztin ist verpflichtet, jedes schwerwiegende Vorkommnis im Zusammenhang mit der Anwendung dieses IH-IVD uns als Hersteller sowie der zuständigen nationalen Behörde gemäß den geltenden regulatorischen Anforderungen zu melden. Meldungen sind per Mail an den Hersteller zu richten.

7. Beschwerdeverfahren

Bei einer nicht zufriedenstellenden Abwicklung oder Durchführung der Analyse können einsendende Ärzte / Ärztinnen sich schriftlich unter molekulare-diagnostik@blutspende.de an die Laborleitung wenden. Alle Beschwerden werden gemäß unseres QM-Systems dokumentiert und bearbeitet.