

Automatisierte Abläufe für NGS-Tests und die Berichterstellung der NGS-Ergebnisse in einem kommerziellen Molekularpathologie-Labor: der Fall Genoptix



Übersicht

Diese Fallstudie zeigt, ...

- ...wie die Molekulargenetik-Abteilung des Genoptix Medical Laboratory automatisierte Pipeline-Abläufe zur Bewertung von somatischen Varianten implementiert hat,
- ...wie der Aufbau einer Varianten-Wissensdatenbank und die Integration dieser Datenbank in den Routinearbeitsablauf die für die Variantenbewertung benötigte Zeit erheblich verkürzen können,
- ...wie ein rückverfolgbarer und reproduzierbarer Arbeitsablauf die Skalierung des Probendurchsatzes unterstützt.

Autoren:

Matthew J. McGinniss¹, PhD FACMG,
Executive Director, Molekulargenetik

Shareef A. Nahas¹, PhD FACMG,
Associate Director, Molekulargenetik

Dianne Keen-Kim¹ PhD FACMG,
Executive Director, Zytogenetik

Peter Bui¹, PhD FACMG,
Associate Director, Zytogenetik

Steven W. Van Vooren², PhD,
Product Marketing Manager

1. Molecular Genetics Genoptix Medical Laboratory
Genoptix, Inc. (a Novartis company)
Carlsbad, CA, USA
2. Agilent Technologies
Lexington, MA, USA

**früher Cartagena Bench Lab*

Einführung

Im molekularpathologischen Umfeld wird die Hochdurchsatz-Sequenzierung (Next Generation Sequencing, NGS) mithilfe von umfangreichen Tumorprofilen immer häufiger eingesetzt. Die Umsetzung dieser Technologie bringt Herausforderungen in den Bereichen der Datenverwaltung und klinischen Interpretation mit sich: Die NGS-Analyse ergibt eine große Menge an Variantendaten, für deren Analyse, Interpretation und Speicherung in einer Datenbank Bioinformatik-Tools benötigt werden. Die Berichterstattung von in der Praxis verwendbaren Ergebnissen auf Grundlage der NGS-Daten muss klinisch robust sein (d. h. informiert, rückverfolgbar und reproduzierbar), ganz besonders im Zusammenhang mit hohen Durchsätzen. Darüber hinaus sind im Bereich der Krebsdiagnostik kurze Bearbeitungszeiten für die Patientenversorgung entscheidend.

Bei der Entwicklung eines automatisierten Systems zur Unterstützung der Variantenbewertung, -klassifikation und -befundung müssen die vom American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) etablierten Standards für die Interpretation von Sequenzvarianten (Richards et al. 2015) und die Standards für die Klassifikation und Berichterstellung von Suszeptibilitätsgenen für Krebserkrankungen (Plon et al. 2008) berücksichtigt werden.

Diese Fallstudie illustriert, ...

- ...den Ansatz von Genoptix zur Analyse von somatischen Genmutationen im Rahmen von Routinetests mit Blick auf die vertikale Integration der VCF-Daten, Standardisierung der Filterung, Arbeiten mit vorkonfigurierten Profilen und automatisierte Berichte.
- ...die Validierung des Ansatzes einschließlich der Zahlenbelege.
- ...Beispielfälle zur Diskussion von Arbeitsablauf und Validierung.

Zusammenfassende Schlussfolgerung

Mit Alissa Interpret konnten die Routineabläufe zur Bewertung und Befundung von Varianten automatisiert werden. Auf diese Weise wurden drei wichtige Kriterien für die Skalierung zu höheren Probendurchsätzen erfüllt: (1) Das Labor liefert unabhängig vom Bediener immer die gleiche Antwort, (2) die Effizienz konnte durch Automation skaliert werden und (3) unsere Wissensdatenbank über Varianten ist nun zugänglich und in Form eines leistungsfähigen internen Expertensystems in unsere Arbeitsabläufe integriert.

„Die Zeit, die wir für die Variantenbewertung in myeloischen Fällen brauchen, konnte von 12 Minuten pro Patient auf unter 5 Minuten reduziert werden!“ Matthew J. McGinniss PhD FACMG, Executive Director Molecular Genetics, Genoptix, Inc.



Agilent Technologies

In dieser Fallstudie illustrieren wir die Entwicklung, Validierung und Implementierung der Alissa Interpret Plattform für die routinemäßigen klinischen Diagnostikabläufe. Auf diese Weise unterstützen wir die Bewertung und Laborberichterstellung mit Blick auf somatische Varianten und Genomänderungen. Es war außerdem möglich, die ACMG-Leitlinien mit unseren eigenen spezifischen Vorschriften und Empfehlungen zu kombinieren, die wir hier bei Genoptix entwickelt und im Rahmen der internen Standardarbeitsanweisungen etabliert haben. Eine automatisierte Plattform kann zwar die professionelle Einschätzung durch Laborgenetiker nicht ersetzen, für eine effiziente Skalierung ist eine Automation der Kriterien, die ein Labor für die Variantenbewertung festlegt, jedoch unumgänglich.

Ansatz

Wir entwickelten unser eigenes, internes Schema für die Variantenklassifikation, um die von den Sequenzierungsgeräten gelieferten Rohdaten über Varianten und Genomänderungen zu filtern und den Durchsatz und die Beständigkeit des Bewertungsprozesses zu verbessern. Schrittweise haben wir unseren Ansatz zur Variantenfilterung und -klassifikation auf die Alissa Interpret Plattform übertragen.

Außerdem haben wir eine interne Datenbank mit Varianten und anderen kuratierten Informationen aufgebaut. Diese Inhalte wurden mithilfe von Filtrationsbäumen und Datenbankprüfungen sowohl in das Bewertungsprotokoll als auch in die Arbeitsabläufe der Variantenprüfung und -befundung integriert.

Illustration des Klassifikationsschemas

In **Abbildung 1a** ist das Beispiel eines soliden Tumors dargestellt. Mit unserem eigenen Klassifikationsschema wurden 244 Rohvarianten zu 7 Varianten und 4 strukturellen Varianten reduziert. Diese wurden dann von einem Molekulargenetiker geprüft und klassifiziert (**Abbildungen 1a und 1b**).

Dieses Klassifikationsschema erlaubt die Filterung von Varianten aufgrund ihrer Populationsfrequenz, Annotationen in:

- COSMIC (Forbes et al. 2008)
- dbSNP
- ClinVar

Beispielsweise wird jede Variante mit einer Populationsfrequenz von $>2\%$ automatisch als gutartiger Polymorphismus herausgefiltert.

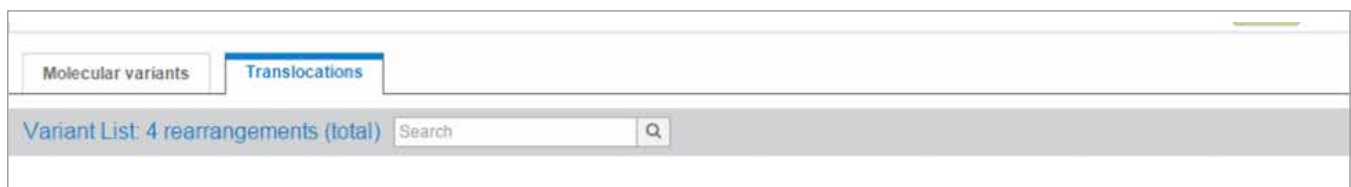


Abbildung 1b: Translokationen wurden getrennt visualisiert. In der VCF-Eingabedatei wurden vier genomische Änderungen identifiziert und in der Registerkarte **Translocation** (Translokation) angezeigt.

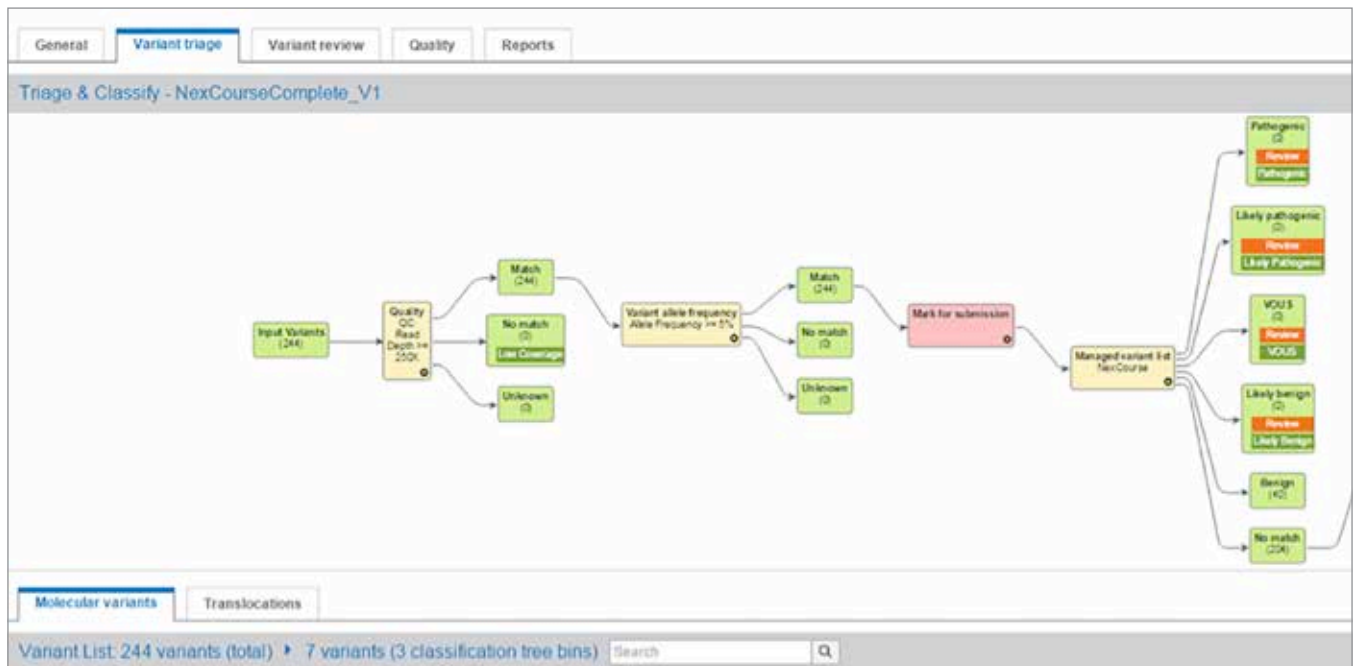


Abbildung 1a: Beispiel eines Klassifikationsbaums. Dieser Baum zeigt unser validiertes und gespeichertes Filterschema. Die Varianten in der VCF-Eingabedatei werden mit allgemeinen Populationsdatenbanken verglichen und auf Grundlage der spezifischen Frequenz des zweithäufigsten Allels in einer Population (Minor Allele Frequency, MAF) gemäß ACMG/Genoptix-Leitlinien als gutartig gekennzeichnet. Auf diese Weise wurden die 244 Varianten in der VCF-Sequenzierdatei auf 7 Varianten begrenzt, die für die Prüfung durch einen klinischen Molekulargenetiker markiert wurden.

Variantenfiltration nach Zahlen

In **Tabelle 1** werden die verschiedenen Profile und typische Zahlen dargestellt. Angegeben sind die Zahl der Gene, typische Anzahl der Rohvarianten und die typische Anzahl der zu berichtenden Varianten (jeweils Ober- und Untergrenze) je Einzelprobe. Im Durchschnitt sind 4 bis 11 % der Varianten berichtbar.

Profil	Anzahl der Gene	Typische Anzahl der Rohvarianten	Typische Anzahl der berichtbaren Varianten
MDS-Profil	5	40-50	0-6
Melanomprofil	15	10-12	1-3
AML-Profil	21	15-20	1-5
Lungenprofil	25	50-100	2-5
Myeloisches Profil	41	50-90	0-3
Lymphoides Profil	75	120-140	0-10
NexCourse Solid	110	240-?	2-24
NexCourse Complete	173	300-540	4-24+

Tabelle 1: Typische Anzahl von berichtbaren Varianten aus unterschiedlichen berichtbaren Profilen.

Automatisierte Abläufe für NGS-Tests und die Berichterstellung der NGS-Ergebnisse

Klassifikation	Anzahl der Varianten
benign (gutartig)	30 324
likely benign (wahrscheinlich gutartig)	139
VOUS (Bedeutung unklar)	1713
likely pathogenic (wahrscheinlich pathogen)	94
pathogenic (pathogen)	2370
insgesamt	34 640

Tabelle 2: MVL-Liste für das NexCourse Pan-Cancer Profil. (Quelle: NGS-MVL, Alissa Interpret, 161 Gene, 21. Sept. 2015)

Zur Messung des Wachstums und der Wachstumsrate der internen Varianten-Wissensdatenbank haben wir nach der Einführung des Tests die Zahl der hinzugefügten Datensätze zur Datenbank über 17 Wochen beobachtet. Wie in **Abb. 4** dargestellt, wurde im Zeitverlauf ein lineares Wachstum beobachtet. Dies ist ein Hinweis darauf, wie wichtig es ist, eine Variantendatenbank systematisch zu erweitern und ihre Inhalte bei der Variantenbewertung neuer Proben in einer automatisierten Weise anzuwenden.

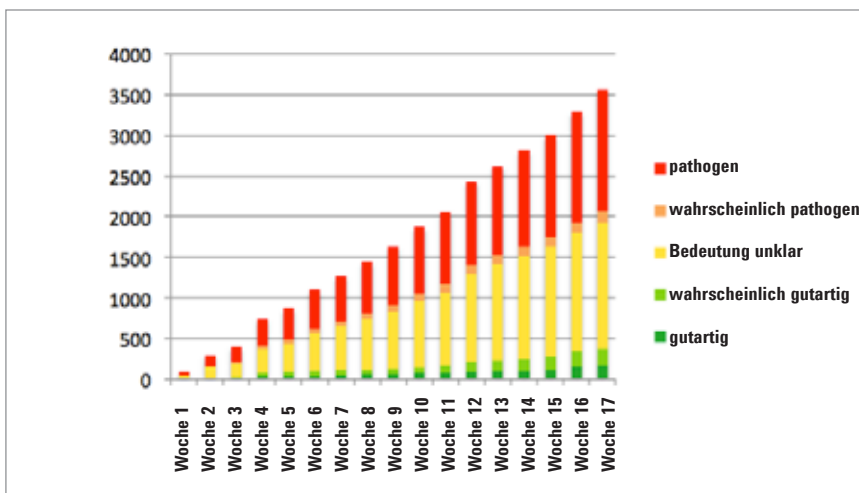


Abbildung 4: Lineares Wachstum der internen Variantendatenbank im Zeitverlauf, eingeteilt in Wochen und gemäß der Variantenart farblich gekennzeichnet.

Arbeitsablauf-Umgebung: IT-Integration

Die Alissa Interpret Plattform ist vollständig in unsere IT-Systeme integriert, um die Kundenberichterstattung automatisch zu aktualisieren und weiter auszubauen. Alissa Interpret wird von zugelassenen klinischen Molekulargenetikern angewendet, die verschiedene Benutzerrollen übernehmen z. B. die Rolle klinischer Benutzer, Kurator oder Administrator. Das Alissa Interpret System unterstützt eine organisationsweite SSO(Single Sign-On)-Anmeldung und weitere Funktionen für die Sicherheit und Zugriffskontrolle. Wir haben außerdem eine Partnerschaft mit CollabRx. Dabei handelt sich um ein weiteres Drittunternehmen, das Software-Lösungen anbietet. Insbesondere geht es um die Unterstützung bei der Annotation von Genen, die an soliden Tumoren beteiligt sind, mit Blick auf Therapien oder klinischen Prüfungen, die mit der gegebenen Variante assoziiert sind. CollabRx hat ein Maßnahmen-Framework veröffentlicht (Vidwans *et al.* 2014), und dieses Expertensystem wird bei der Fällung von Therapieentscheidungen vom einsendenden Arzt als Informationsquelle verwendet.

Abschließende Bemerkungen

Bei der Einrichtung unserer Routineabläufe zur Variantenbewertung und -befundung haben sich drei Elemente als entscheidend wichtig erwiesen.

- 1) Das Labor liefert unabhängig vom Bediener immer die gleiche Antwort. Um dieses Ziel zu erreichen, ist eine Standardisierung unumgänglich. Genoptix hat eine Klassifikationsstrategie, einen gut definierten Prozess und eine systematische Methode definiert, getestet und validiert. Es kann außerdem die Bewertung nach Person registrieren. Die Alissa Interpret Software-Plattform stellt die Tools und Verfahren bereit, die ein Labor zur Umsetzung dieser Elemente benötigt.
- 2) Wir haben die Effizienz durch Automation gesteigert. Der Maßstab hat keinen Einfluss auf die Bearbeitungszeit, und die Standardisierung hat hohe Probendurchsätze ermöglicht, ohne dass wir unser Personal erweitern mussten. Damit konnten bedeutende Kosten vermieden werden.
- 3) Bei der Umstellung auf NGS ist die Variantenbewertung das größte Problem. Wir haben nicht nur eine Varianten-Wissensdatenbank aufgebaut, sondern diese auch zugänglich gemacht und in die Arbeitsabläufe integriert. Diese Erkenntnisse und dieses interne Wissen – der bisherige Verlauf ist bei Start eines Tests bereits geladen – machen dies zu einem leistungsfähigen Expertensystem.

Publikationen

1. Richards S et al. 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17(5): 405-424.
2. Plon S et al. 2008. Sequence variant classification and reporting: Recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat* 29(11):1282-1291.
3. Forbes SA et al. 2008. The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). *Curr Protoc Hum Genet*. Available in PMC 2009 July 06.
4. Vidwans SJ et al. 2014. A framework for genomic biomarker actionability and its use in clinical decision making. *Oncoscience* 1(10): 614-623.

Automatisierte Abläufe für NGS-Tests und die Berichterstellung der NGS-Ergebnisse

Erklärung des Verwendungszwecks

Alissa Interpret Software ist zur Speicherung, visuellen Darstellung und Annotation von Varianten bei Verwendung von öffentlichen, kommerziellen und internen Kundendatenquellen vorgesehen. Mit dieser Software können Endnutzer Pipelines einrichten, die eine automatische Sichtung und Klassifizierung von genetischen Varianten erlauben. Sie stellt Funktionen zur Erstellung von Variantenbeurteilungen und zur Erstellung von vorläufigen Variantenanalyseberichten zur Verfügung. Dank der Integrationsfunktionen können Varianten- und Berichtsdaten automatisch mit externen Software-Systemen verglichen werden.

Alissa Interpret Software richtet sich an geschulte Laborfachkräfte, klinische Genetiker und Molekularpathologen und dient als unterstützende Software-Plattform in der Entscheidungsfindung. Bei dieser geht es um die Analyse und Interpretation von in Humanproben festgestellten genetischen Varianten im Zusammenhang mit den für eine Probe aufgezeichneten klinischen Daten.

Zuverlässige Antworten. Gemeinsam.

MEHR INFOS:

www.agilent.com/lifesciences/alissa

E-Mail an cad.info@agilent.com

PR7000-0690

© Agilent Technologies, Inc. 2017 Gedruckt in den USA.

Veröffentlichung des Originaldokuments: 1. November 2015

Überarbeitung: 30. Juni 2017

5991-8529DEE

In den USA ist Alissa Interpret als ein „Class I Exempt Medical Device“, in Europa als „CE-IVD“ und in Kanada und Australien als „I IVD Device“ eingestuft.



Agilent Technologies