

شناسنامه و استاندارد خدمت
تکنولوژی تعیین توالی نسل جدید (NGS)
(بازدانه تشخیص بیماری های ژنتیک)
(نسخه دوم)

تابستان ۱۴۰۵

کمیته مشاوران جهت تنظیم و تدوین:

دکتر حسین نجم آبادی (دانشگاه علوم توانبخشی و سلامت اجتماعی)

دکتر سعید رضا غفاری (متخصص ژنتیک پزشکی)

دکتر مسعود گرشاسبی (دانشگاه تربیت مدرس)

دکتر امین طباطبایی فر (دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، انجمن ژنتیک پزشکی)

دکتر مریم بهشتیان (اداره سرطان دفتر مدیریت بیماری های غیر واگیر)

دکتر عاطفه باقرصاد (اداره پیشگیری از بیماری های ژنتیک دفتر مدیریت بیماری های غیر واگیر)

دکتر نوش آفرین صفادل (آزمایشگاه مرجع سلامت)

دکتر پریسا داهیم (آزمایشگاه مرجع سلامت)

دکتر صغری انجرائی (آزمایشگاه مرجع سلامت)

دکتر فائزه عزیزی (آزمایشگاه مرجع سلامت)

دکتر خرم خورشید (دبیر هیات ممحنه رشته ژنتیک پزشکی)

با همکاری:

آزمایشگاه مرجع سلامت معاونت درمان

اداره ژنتیک دفتر مدیریت بیماری های واگیر معاونت بهداشت

تحت نظر :

دکتر سید سجاد رضوی عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و معاون درمان

تحت نظارت فنی:

گروه استانداردسازی و تدوین راهنماهای سلامت

دفتر ارزیابی فن آوری، استانداردسازی و تعرفه سلامت

الف) عنوان دقیق خدمت مورد بررسی (فارسی و لاتین) به همراه کد ملی:

تکنولوژی تعیین توالی نسل جدید Next Generation Sequencing- NGS (با دامنه تشخیص بیماری های ژنتیک)

کد ملی	شرح کد ملی	توضیحات
۸۱۰۳۰۰	بررسی ۱ تا ۲۰ ژن به صورت یک پانل توسط روش های NGS	این کد با سایر کدها قابل گزارش و محاسبه نمی باشد.
۸۱۰۳۰۲	بررسی ۲۱ تا ۵۰ ژن توسط روش های NGS	این کد با سایر کدها قابل گزارش و محاسبه نمی باشد.
۸۱۰۳۰۴	بررسی ۵۱ تا ۲۰۰ ژن توسط روش های NGS	این کد با سایر کدها قابل گزارش و محاسبه نمی باشد.
۸۱۰۳۰۶	بررسی بیش از ۲۰۰ ژن در یک پانل توسط روش های NGS (شامل اگزوم)	این کد با سایر کدها قابل گزارش و محاسبه نمی باشد.
۸۱۰۳۰۸	بررسی بیش از ۲۰۰ ژن در یک پانل توسط روش های NGS (شامل اگزوم)، نفر دوم (مقایسه ای)	این کد با سایر کدها قابل گزارش و محاسبه نمی باشد.
۸۱۰۳۱۰	بررسی بیش از ۲۰۰ ژن در یک پانل توسط روش های NGS (شامل اگزوم)، نفر سوم (مقایسه ای)	این کد با سایر کدها قابل گزارش و محاسبه نمی باشد.
۸۱۰۳۸۴	بررسی CNV به روش NGS با قدرت تفکیک و عمق بالا	-
۸۱۰۰۸۶	جهش شناخته شده قبلی در خانواده موسوم به Known familial mutation برای کلیه بیماری ها (زمانی که قبلا موتاسیون مسبب بیماری در سایر اعضا و نزدیکان یک خانواده شناسایی شده باشد).	این کد صرفا در صورت تعیین عامل بیماری در مرحله اول (PND1)، جهت بررسی و تعیین ناقل احتمالی بیماری های ژنتیکی در اعضای خانواده و خویشاوندان بر اساس شجره نامه و تشخیص متخصص/مشاوره ژنتیک، تحت پوشش سازمان های بیمه گر می باشد.

(ب) تعریف و تشریح خدمت مورد بررسی :

نسل جدید تعیین توالی (Next Generation Sequencing- NGS)، روشی برای بدست آوردن توالی هزاران و میلیون ها جفت باز DNA ژنومی برای یک فرد می باشد. در تکنیک نسل جدید تعیین توالی، DNA می تواند به یکی از سه روش زیر مورد بررسی قرار گیرد:

الف) تعیین توالی کل ژنوم (Whole Genome Sequencing)

ب) تعیین توالی کل اگزوم (Whole Exome Sequencing)

ج) تعیین توالی هدفمند (Targeted NGS Panel) که در این مستند به اختصار پانل NGS نامیده می شود.

تعیین توالی کل ژنوم:

در مواردی که جواب بررسی کل اگزوم منفی است و یا نیاز به بررسی دقیق تر Copy Number Variation (CNV) باشد، از تعیین توالی کل ژنوم استفاده میشود.

بررسی کل اگزوم:

اگزوم ها کمتر از ۲ درصد کل ژنوم را تشکیل می دهند، با این وجود اگزومها و مرز اگزوم- اینترون ۸۵٪ جهشهای پاتوژنیک انسان را در بر می گیرد. تعیین توالی اگزوم به منظور کمک به تشخیص و مدیریت بیماری، از جمله بررسی بیماری های ژنتیکی بسیار هتروژن، تعیین پیش آگهی و رویه های درمانی و یا محدودسازی تشخیص افتراقی انجام میشود. درخواست آزمایش می بایست پس از انجام مشورت بالینی سطح ۳ صورت گیرد.

مشورت بالینی سطح ۳: مشاوره تخصصی است که توسط متخصص ژنتیک پزشکی و متخصص یا فوق تخصص بالینی / پزشک مشاور ژنتیک تواما و در تعامل با یکدیگر انجام می شود. این در مواردی که تشخیص ژنتیک پیچیده می باشد کاربرد دارد.

تعیین توالی هدفمند – روش پانل NGS:

به تعیین توالی قسمتی از ژنوم به صورت هدفمند (Targeted) از جمله تعیین توالی اگزوم ژنهای مربوط به یک بیماری یا دسته ای از بیماریهای خاص با استفاده از تکنیک نسل جدید تعیین توالی اطلاق می شود.

فرایند های NGS مشتمل بر wet lab و dry lab شامل دو فرآیند تحلیلی عمده می شود:

۱. فرآیند wet lab از جمله مدیریت نمونه، آماده سازی کتابخانه NGS برای تولید توالی می باشد.

۲. فرایند بیوانفورماتیک dry lab شامل: نقشه برداری و alignment، فراخوانی واریانت ها (variant calling)

annotation، اولویت بندی (فیلتر) و نهایتا تفسیر واریانت ها که با کمک الگوریتم ها و نرم افزارها انجام می شود.

فرایندهای آزمایشگاهی wet lab و فرایندهای dry lab میتواند در یک آزمایشگاه و یا توسط دو آزمایشگاه شامل آزمایشگاه تولیدکننده داده (wet lab) و آزمایشگاه آنالیز داده (dry lab) انجام شود. مسئولیت بررسی و صحه گذاری های فرایندهای انجام شده در آزمایشگاه dry lab و نیز بررسی فرایندهای انجام شده در آزمایشگاه wet lab بر عهده مسئول فنی آزمایشگاه پذیرش کننده نمونه می باشد.

پایپلاین بیوانفورماتیک: شامل کلیه الگوریتم ها، نرم افزارها، scriptها، توالی رفرانس و database ها، چه به صورت تجاری و یا in-house و یا open source می باشد.

دامنه کاربرد:

شناسنامه تکنیک نسل جدید تعیین توالی برای آزمایشگاه های پزشکی با دامنه فعالیت ژنتیک پزشکی (در این سند به اختصار آزمایشگاه نامیده می شود)، که (مطابق با ماده ۳۸ آئین نامه تاسیس و مدیریت آزمایشگاه های پزشکی) بوده و مجوز پذیرش، انجام و یا ارجاع آزمایش های تشخیص ژنتیک را اخذ نموده اند، کاربرد دارد.

الزامات:

جهت اطمینان از اعتبار نتایج آزمایش های تشخیص ژنتیک لازم است این آزمایشگاه ها الزامات سیستم مدیریت کیفیت و ضوابط ابلاغی وزارت متبوع و آزمایشگاه مرجع سلامت را مستقر نمایند. دستورالعمل های مورد نیاز مربوط به مراحل جمع آوری و آماده سازی نمونه، صحه گذاری یا تصدیق روش ها، انجام مراحل مختلف انجام آزمایش و فرآیند پس از آزمایش باید مکتوب بوده و سوابق انجام کلیه فعالیت ها باید ثبت و نگه داری شود. این آزمایشگاه ها باید پذیرش بیمار یا نمونه را مطابق با آخرین کدهای تعیین شده برای آزمایشهای ژنتیک، مندرج در کتاب ارزش نسبی خدمات سلامت، انجام دهند.

مرحله پیش از انجام آزمایش

نمونه گیری، استخراج نمونه و آماده سازی نمونه (شامل تولید Capturing, library یا Enrichment) بایستی طبق شرایط استاندارد مطابق با پلت فرم هدف رعایت شود. نمونه ها می بایست برچسب دار، حاوی حداقل کد ملی مراجع، نام مراجع و تاریخ تولد بوده و سایر اطلاعات مربوط به مراجع قابل ردیابی باشد. آزمایشگاه که صرفاً پذیرش انجام داده و نمونه را برای انجام آزمایش به آزمایشگاه دیگری ارجاع می کنند، باید الزامات "دستورالعمل ارجاع نمونه های بالینی در آزمایشگاههای پزشکی" ابلاغی آزمایشگاه مرجع سلامت را رعایت کنند. ارجاع ممکن است شامل کل فرایندهای آزمایش NGS یا بخش هایی از این فرآیند باشد (به عنوان مثال فقط بخش wet lab یا بخش های بیوانفورماتیک). چنانچه ارجاع نمونه به آزمایشگاههای خارج از کشور مد نظر باشد، باید "ضوابط و مقررات ارسال نمونه های آزمایشگاهی به خارج از کشور" بطور کامل رعایت شده و مجوز قانونی برای این منظور از وزارت متبوع اخذ شده باشد.

مسئول فنی آزمایشگاه، مسئول انتخاب و ارزیابی عملکرد آزمایشگاه های ارجاع شونده می باشد. هنگام انتخاب یک آزمایشگاه ارجاع برای آزمایش NGS، مسئول فنی آزمایشگاه ارجاع دهنده باید اطمینان حاصل کند که کیفیت و اعتبار نتایج و زمان گردش کاری آزمایش ها در آزمایشگاه ارجاع، با توجه به نیازهای بالینی بیمار و پزشک معالج، قابل قبول است. سوابق مربوط به زمان و چگونگی انتقال نمونه ها و تبادل داده ها (از جمله فرمت های فایل) باید نگهداری شود.

مرحله انجام آزمایش NGS

پلت فرم مورد استفاده برای تعیین توالی قطعات (مدل دستگاه، کمپانی سازنده و ...)، روش تکثیر قطعات و تعیین توالی آنها باید مشخص باشد.

مراحل ایجاد و توسعه آزمایش (Test Development)، صحت گذاری آزمایش (Test Validation) و تضمین کیفیت (Quality Assurance) در آزمایشگاه wet lab باید انجام شود و مدارک و سوابق مربوط به آن موجود باشد.

دستورالعمل نحوه انجام فرایندهای آزمایش wet lab باید شامل موارد زیر باشد:

- توصیف نمونه ها (مثلا ژنهای موجود در پانل، اگزون، ژنوم یا دیگر مناطق هدف مانند اینترون ها یا سایتهای پروموتور)
- انواع نمونه های قابل قبول که انجام آزمایش بر روی آنها تایید شده است (مثلا خون، بزاق، نمونه های FFPE)
- توصیف حداقل الزامات نمونه برای انجام آزمایش
- روش ها و مواد مورد استفاده برای جداسازی اسیدهای نوکلئیک و تبدیل آنها به کتابخانه NGS (در صورت کاربرد)
- روش ها و مواد مورد استفاده برای غنی سازی مناطق هدف (Amplification-based assays و based Hybridization capture assays) (در صورت کاربرد)
- روشها و مواد مورد استفاده برای نشاندار نمودن مولکولی / بارکد گذاری نمونه های pool شده (در صورت کاربرد)
نحوه QC مربوط به pool به صورت خلاصه به شرح زیر است:
توزیع درصد خوانش ها (Reads) به ازای هر نمونه، بررسی درصد ریدهای اختصاص یافته به ازای هر نمونه بعد از سکوانسینگ و مقایسه آن با نسبت های مورد انتظار.
- کنترل های مورد استفاده طی فرآیند wet lab (به عنوان مثال، کنترل برای نشان دادن محدودیت های تشخیص یا کنترل دارای جهش های شناخته شده به عنوان مثال: استفاده از کنترل داخلی PhiX و کنترل منفی)
- پلتفرم تعیین توالی نسخه (version) مواد مورد استفاده در توالی یابی و مواد مصرفی (به عنوان مثال flow cells و تراشه ها)
- معیارهای پذیرش و عدم پذیرش نتایج حاصل از فرایند wet lab. معیارها باید بر اساس متریکس ها و پارامترهای کنترل کیفی باشد که در طول بهینه سازی تست و صحت گذاری تعیین شده و باید مشخص باشد چه زمانی فرایند wet lab شکست خورده و نباید پردازش بیشتر نمونه صورت گیرد. برخی از این معیار ها شامل موارد زیر است:
 - ۱) توزیع اندازه قطعات نوکلئیک اسید پس از قطعه سازی (fragmentation)
 - ۲) غلظت کتابخانه NGS، توزیع اندازه آن و بررسی عدم وجود آلودگی با دایمرهای اداپتورها
 - ۳) تراکم کلاستر در flow cell، درصد Cluster PF (درصد کلاسترهایی که فیلترها رو pass کردند)، درصد Phas/Prephas و درصدی از خوانش ها که به ژنوم PhiX با موفقیت تراز شده اند.

۴) امتیازهای کیفیت بازی قطعات خوانش شده

۵) درصد قطعات خوانش شده که با توجه به فیلترهای کیفیتی توالی قابل قبول هستند

۶) تعداد کلی قطعات خوانش شده تولیدی

۷) نرخ خطاها

متریکس ها و پارامترهای QC (Quality Control) جهت wet lab که برای پایش و ارزیابی عملکردهای آنالیزی بر اساس هر ران آنالیز و همچنین در پایش دوره ای (مثلا ماهانه، چهار ماهه) استفاده می شود، باید حداقل دارای موارد زیر باشد:

۱) توزیع اندازه قطعات برای ساخت کتابخانه NGS

۲) تراکم کلاسترها در دستگاه NGS

۳) کیفیت و نرخ خطا در برون داد توالی مرتبط با دستگاه NGS

متریکس ها و پارامترهای QC جهت فرایند dry lab، ممکن است شامل درصد خوانش هایی که به نواحی هدف، نقشه برداری (align) شده اند و تعداد و انواع واریانت های فراخوانی شده باشد.

مراحل آنالیز داده ها و کنترل کیفی آنها (Analysis of pipeline or workflow) شامل Quality Assessment Alignment, Variant Calling و Variant Annotation باید مشخص باشد.

پایپلاین های بیوانفورماتیک NGS از چندین جزء تشکیل شده است: بسته های نرم افزاری رایگان یا تجاری، script ها و دیتابیس هایی جهت مدیریت نحوه آنالیز و جوابدهی. با توجه به پیشرفت های این حیطه، آزمایشگاه های ژنتیک پزشکی بایستی یک روش اجرایی مشخص و مکتوب جهت پایش منظم، به روز رسانی ها، patch ها و ارتقاها را در پایپلاین داشته باشد. در صورت تغییر در این روش اجرایی، آزمایشگاه باید نشان دهد که کماکان به ویژگیهای عملکردی قابل قبولی دست می یابد. میزان صحت گذاری مجدد به میزان تغییرات وابسته است. در این روش اجرایی باید مشخص شود که در چه فواصلی پایش و به روز رسانی ها انجام می شوند.

نسخه (version) اختصاصی هر جزء و configuration های مرتبط آن (به عنوان مثال، command lines یا سایر موارد) از یک پایپلاین بیوانفورماتیک که جهت تولید داده NGS استفاده می شود، برای هر گزارش نمونه/ بیمار باید قابل ردیابی باشد. نیازی نیست که سوابق هر جزء پایپلاین در گزارش نمونه/ بیمار ذکر شود. در مقابل، اشاره به پایپلاین به صورت کلی، بر اساس نامگذاری اختصاصی آزمایشگاه (به عنوان مثال: NGS پایپلاین v1.01) و/یا وارد کردن log file (در صورتیکه به ازای هر آنالیز از یک dataset بیمار تولید می شود)، قابل قبول است. نامگذاری اختصاصی آزمایشگاه بایستی به ازای هر جزء منفرد از اجزا و configuration های پایپلاین منحصر به فرد باشد. هر گونه تغییر در نسخه های (version) متفاوت یک بسته نرم افزاری، script، یا دیتابیس های داخلی و خارجی و یا تغییر در configuration های هر نرم افزار به یک نامگذاری اختصاصی جدید احتیاج دارد. صحت گذاری باید کل مراحل بیوانفورماتیک از آغاز تا پایان را در بر گیرد. متریکس ها و پارامترهای کنترل

کیفیت باید تعیین شده باشد و جهت ارزیابی عملکرد پایلین در حین صحنه گذاری استفاده شود. انجام صحنه گذاری اولیه و صحنه گذاری های مجدد منوط به تایید کتبی مسئول فنی آزمایشگاه است و بسته به میزان تغییرات اعمال شده، ممکن است کل یا بخشی از مراحل فرآیند را در بر گیرد. برای مثال، هر گاه یک نرم افزار که قبلاً صحنه گذاری شده ارتقاء یابد، باید یک سری از نمونه های آزمایش شده قبلی مورد پردازش و آنالیز قرار گیرند و تمام متریکس های عملیاتی مرتبط مقایسه گردند. تغییرات الگوریتم های **alignment** و یا تغییر نرم افزارهای فراخوانی واریانت ها، مثال هایی از تغییرات عمده ای هستند که به صحنه گذاری مجدد نیاز دارند. آزمایشگاه باید نشان دهد که در صورت اعمال تغییرات در **wet lab**، متریکس های عملیاتی قابل قبول یا معادلی را به دست می آورد.

- متریکس ها و پارامترها در آزمایش های مختلف، متفاوت است و معمولاً و نه صرفاً، شامل موارد زیر می باشد:
- توصیف اهداف مورد آنالیز (به عنوان مثال، اگزوم ها، ژنها یا نواحی مورد هدف از قبیل ایترون ها یا جایگاههای پروموتور) و پایلین های استفاده شده جهت آنالیز به همراه الگوریتم ها، **script** های تست و **dataset** ها
- در صورت کاربرد، صحنه گذاری روشهای **pool** کردن نمونه ها جهت حصول اطمینان از حفظ مشخصات هویتی هر نمونه منفرد در حین آنالیز داده ها.
- تعیین نواحی هدف در شرایطی که نواحی هدف دارای همولوژی بالا یا سودوژن ها باشد. زیرا در این موارد، فراخوانی واریانتها ممکن است متاثر از سودوژن ها اشتباه شود. آزمایشگاه باید نحوه ممانعت از تداخل نواحی با همولوژی بالا را مستند نماید و یا مشخص کند چه تمهیداتی جهت تایید نتایج آزمایش به دست آمده در این نواحی اندیشیده است.
- تعیین ویژگیهای آزمایش بر حسب نوع واریانتی که توسط آزمایش تشخیص داده می شود (به عنوان مثال، **SNP** ها، **indel** ها، تغییرات تعداد کپی و سایر واریانت های ساختاری). برخی از این ویژگیها شامل حساسیت تست، دقت (تکرارپذیری) و درصد واریانت های **call** شده مثبت کاذب (که از تقسیم تعداد مثبت های واقعی بر مجموع تعداد مثبت های واقعی و مثبت کاذب قابل محاسبه است) می باشد. طی مراحل صحنه گذاری در راستای تعیین ویژگی های عملکردی آزمایش، باید نمونه هایی که مثال هایی از انواع مختلف واریانت های تشخیص داده شده را دارند مورد آزمایش قرار گیرند. باید توجه داشت که برای تکمیل صحنه گذاری می توان از **dataset** های سنتزی یا **in silico**، استفاده نمود اما باید توجه داشت که اینها نمی توانند جایگزین نمونه های واقعی شوند.
- تعیین نرخ تشخیص واریانت های بیماری زا با استفاده از فرایندهای بیوانفورماتیک و نرم افزارها در **dataset** های توالی اگزوم و ژنوم. از جمله راهکاری که جهت تعیین نرخ تشخیص وجود دارد، آنالیز نمونه هایی با اتیولوژی ژنتیکی شناخته شده (به عنوان مثال، نمونه های تشخیص داده شده قبلی با واریانت های شناخته شده اتوزوم مغلوب، غالب یا دارای جهش **de novo**) می باشد.

آزمایشگاه باید برنامه مدونی برای پایش، استقرار و ثبت ارتقاءهای (upgrades) مربوط به تجهیزات، شیمی تعیین توالی و مواد و کیت های مورد استفاده در تولید داده NGS داشته باشد.

در آزمایشگاه باید مدارک و سوابق زیر جهت ثبت فرایندهای بیوانفورماتیک (پایپلاین) به منظور آنالیز، تفسیر و گزارش دهی نتایج تست NGS وجود داشته باشد:

- تک تک application ها و دیتابیس های استفاده شده با نسخه (version) و command line مناسب و flags یا سایر ایتیم های configuration که برای راه اندازی و اجرای پایپلاین لازم است.
- سایر مراحل یا اسکریپت های به کار رفته جهت اتصال application های مجزا در یک پایپلاین
- سوابق آزمایش های انجام شده، نتایج اجرایی و کدهای مربوط به ابزارهای تدوین شده توسط خود آزمایشگاه
- برای application هایی که به توالی رفرانس جهت alignment توالی های خوانش شده احتیاج دارند، ثبت assembly توالی رفرانس، نسخه (version)، منبع و URL محل دانلود assembly مرجع و هرگونه تغییری که در فایل رفرانس اعمال شده، لازم است.
- توصیف اطلاعات و یا فایل های داده ورودی و خروجی در هر مرحله از فرایند
- معیارها و حدود آستانه اختصاصی تعریف شده جهت ورود داده های حاصل از مرحله فراخوانی واریانت ها به مراحل آنالیز، طبقه بندی و تفسیر واریانت (به عنوان مثال حداقل read coverage depth، امتیاز کیفیت واریانت یا نوکلئوتید، درصد allelic read)
- در صورت امکان، فرایندهای بیوانفورماتیکی و آستانه های مورد قبول جهت مرحله اولویت بندی و شناسایی واریانت ها/ژن های مسبب یا کاندید مشخص باشد. فرایندها معمولاً شامل فیلترینگ بر اساس فراوانی جمعیتی، پیش بینی اثر واریانت بر محصول ژن و یا عملکرد آن (به عنوان مثال استفاده از PolyPhen, SIFT)، همبستگی با فنوتیپ بیمار و شناسایی توالی هایی با همولوژی بالا یا سودوژن ها است، هر چند به این موارد محدود نمی شود. در مطالعات خانوادگی، پارامترهای دیگری از جمله shared genomic segments، نواحی IBD (Identical By Descent) الگوی وراثت و/یا آنالیز هم تفکیکی واریانت با بیماری نیز جزء مراحل آنالیز قرار می گیرد.

معیارهای پذیرش و عدم پذیرش نتایج به دست آمده از پایپلاین آنالیز داده: معیارها باید بر اساس متریکس ها و پارامترهای کنترل کیفی باشد که در طول بهینه سازی آزمایش تعیین شده و در مراحل صحه گذاری مورد استفاده قرار گرفته است.

لازم است به موارد ذیل توجه شود:

- ژنوم مرجع مورد استفاده توسط سیستم باید مشخص شود.

- باید Mean depth نواحی هدف در انجام اگزوم حداقل 50X باشد. حداقل ۹۰ درصد نواحی هدف بایستی عمق بالاتر از 10X داشته باشد. در پانلهای ژنی، بایستی حداقل ۹۸ درصد نواحی کدکننده ژنهای هدف depth بیشتر از 10X داشته باشد.
- آزمایشگاه باید امکانات سخت افزاری و نرم افزاری لازم را برای نگهداری فایل های بیماران در مراحل مختلف (نظیر فایل های FASTQ، VCF.BAM و Variant table Excel file) را داشته و فایل ها را به بیمار، پزشک و یا درخواست کننده ذیصلاح تحویل نماید.
- تعداد کل خوانش ها یا حجم داده تولید شده
- امتیازات کیفیت بازها و کیفیت نقشه برداری (quality scores)
- درصد خوانش هایی که قابل نقشه برداری هستند (percentage of reads mapping to the target)
- عمق پوشش نواحی هدف
- تعیین نواحی هدف که دارای عمق پوشش زیر حد آستانه تعیین شده باشند.
- تعداد و نوع واریانت ها نسبت به توالی رفرانس
- نسبت جهش های ترانزیشن به ترانس در اگزوم و ژنوم
- نسبت واریانت های هتروزیگوت به هموزیگوت
- درصد خوانش های duplicate شده (duplicate reads)
- Adapter content
- Overrepresented sequences
- Sequence Length
- معیارهای پذیرش و عدم پذیرش نتایج، باید شامل مواردی باشند که تعیین می کند چه زمانی یک فرایند بیوانفورماتیکی ناموفق بوده و پردازش داده باید متوقف شود و یا مجدد انجام پذیرد، به عنوان مثال:
- امتیازات کیفیت بازها و کیفیت نقشه برداری (quality scores)
- درصد خوانش هایی که قابل نقشه برداری هستند (percentage of reads mapping to the target)
- عمق پوشش نواحی هدف
- تعیین نواحی هدف که دارای عمق پوشش زیر حد آستانه تعیین شده باشند
- تعداد و نوع واریانت ها نسبت به توالی رفرانس
- نسبت جهش های ترانزیشن به ترانس در اگزوم و ژنوم
- نسبت واریانت های هتروزیگوت به هموزیگوت

آزمایشگاه باید شرایط لازم برای حفظ امنیت و محرمانگی اطلاعات را فراهم کند. در این راستا، آزمایشگاه باید اقدامات لازم جهت حصول اطمینان از محرمانه بودن، امنیت و یکپارچگی داده ها در حین ذخیره سازی داخلی و خارجی اطلاعات و انتقال داده های NGS را انجام دهد. آزمایشگاهها ممکن است برای آنالیز و ذخیره اطلاعات توالی NGS، داده هایشان را به آزمایشگاههای ارجاع یا شرکت های معتبر انتقال دهند. روشهایی برای حصول اطمینان از محرمانه بودن میتواند شامل استفاده از پروتکل های امن و رمزگذاری شده برای انتقال داده ها (مانند SFTP, HTTPS, FTPS) تأیید سیستم و هویت کاربر، ثبت فعالیت ها، محدودیت دسترسی و پشتیبان گیری صحیح اطلاعات باشد. در این فرایندها باید اطمینان حاصل شود که محرمانگی اطلاعات بیمار حفظ شده و مطابق با الزامات استاندارد مانند HIPAA (Health Insurance Portability and Accountability) باشد.

آزمایش تأییدی NGS

آزمایشگاه باید دارای یک روش اجرایی مکتوب برای نحوه تأیید انواع واریانت های گزارش شده باشد. آزمایشگاه باید به صورت مکتوب تعیین کند که چه زمانی آزمون های تأییدی واریانت های به دست آمده از آزمایش NGS باید انجام شود. در حالیکه تعیین توالی به روش Sanger معمولاً برای تأیید انواع واریانت ها استفاده می شود، روشهای دیگر (به عنوان مثال: allele-specific PCR, melting curve analysis, alternative NGS chemistries) نیز قابل قبول هستند. در مواردی که واریانت های کاندید منطبق با علائم بالینی در گزارش نهایی انعکاس می یابد، تأیید واریانت های کاندید (شامل واریانت های بیماری زا، احتمالاً بیماری زا و یا VUS با ظن بالینی قوی) با روش دوم مانند تعیین توالی Sanger براساس تأیید پزشک متخصص/فوق تخصص میبایست مدنظر قرار گیرد.

بدیهی است توصیه به PND باید برای واریانت هایی در نظر گرفته شود که در طبقه بندی بیماری زا و یا احتمالاً بیماری زا قرار گیرند. تفسیر بالینی نتایج تعیین توالی اگزوم کامل، مستلزم تعامل بالینی با متخصصان مرتبط می باشد. گزارش باید منطبق بر الزامات ارائه شده در آخرین ویرایش ضوابط کشوری باشد (در حال حاضر دستورالعمل منتشر شده از سوی ACMG مورد اتفاق نظر است). در آزمایشگاه انجام دهنده باید روش اجرایی مشخص جهت annotation و فیلتر واریانت ها از نظر عمق و زیگوسیتی، نحوه فیلتر واریانت ها برای فراوانی جمعیتی و شاخص های بیوانفورماتیک پیش بینی کننده پاتوژنیسیته (ارائه شده در آخرین ویرایش دستورالعمل منتشر شده از سوی ACMG. برای واریانت های جدید)، نحوه توارث (mode of inheritance) و نحوه فیلتر واریانت های بر حسب علائم بالینی اختصاصی وجود داشته باشد.

فرآیند پس از آزمایش

در گزارش نهایی توالی یابی کل اگزوم ها، بایستی تعداد ژن های هدف آنالیز (با توجه به علائم بالینی اختصاصی) ذکر شود. ویژگیهای عملکردی (پلت فرم، عمق و پوشش کلی آزمایش، عمق واریانت ها) بایستی در گزارش یا فایل های ضمیمه، ارائه شده باشد.

در گزارش ها اگر واریانتی به نفع بیماری یافت نشده است باید خلاصه‌ای از مناطق ژنی هدف که توسط آزمایش در بر گرفته نشده (و پوشش کمتری نسبت به بقیه دارد) مشخص شده باشد.

به دلیل اهمیت و کمک به تفسیر واریانت ها، همه واریانت ها (فایل ژنوتیپ، VCF) با رعایت بی نام بودن می بایست در سامانه ملی (در صورت راه اندازی این سامانه)، بارگذاری و ثبت شود.

لازم به ذکر است که در صورت رسیدن به واریانت های با اهمیت نامشخص (VUS)، ممکن است نیاز به بررسی آنها در فاز پژوهشی باشد که در آن صورت اخذ رضایت آگاهانه بیمار لازم خواهد بود.

آزمایشگاه لازم است بطور دوره ای گزارش های قبلی NGS را مورد ارزیابی قرار دهد. باید مشخص باشد که در چه شرایطی و با چه فواصل زمانی، ارزیابی مجدد انجام میگیرد. همچنین اشاره شود در صورتی که ارزیابی مجدد (بر اساس اطلاعات جدید بیمار، خانواده، جمعیت بومی، و جمعیت عمومی و ...) منجر به تغییر طبقه بندی واریانت گردد، چه اقداماتی انجام خواهد شد (به عنوان مثال، اطلاع رسانی به پزشک درخواست کننده آزمایش).

یافته های ثانویه: تعیین توالی ممکن است منجر به تولید یافته های ژنتیکی شود که با تظاهرات بالینی که هدف اصلی انجام آزمایش بیمار بوده است، نامرتبط باشد. در خط مشی آزمایشگاه باید مشخص شده باشد که چه یافته های ژنتیکی نامرتبطی و به چه دلایلی گزارش می شوند و به چه نحوی به پزشکان درخواست کننده و بیمار اطلاع رسانی میشود.

بر اساس آخرین ویرایش دستورالعمل منتشر شده از سوی ACMG علاوه بر ارائه نتایج "تشخیصی"، گزارش واریانت های بیماریزا و احتمالاً بیماریزای شناخته شده مربوط به ژنها و واریانت های بیماری های ژنتیکی که از لحاظ پزشکی قابل مداخله میباشند (و به یافته های ثانویه معروف است) ضروری می باشد.

اخذ رضایت بیمار پیش از ارائه یافته های ثانویه و مشاوره ژنتیک پس از آزمایش در صورت گزارش یافته های ثانویه / تصادفی ضروری می باشد.

تفسیر بالینی

در مواقعی که بیش از یک واریانت مهم منطبق بر علائم بیمار یافت می شود، بایستی مشورت بالینی با پزشک معالج جهت تکمیل اطلاعات بالینی و پاراکلینیکی بیمار انجام شود.

قبل از تفسیر نهایی، بایستی برای واریانت های بیماریزا یا احتمالاً بیماری زای منطبق با الگوی بیماری، روش دوم مانند تعیین توالی با روش Sanger مدنظر قرار گیرد. در تفسیر واریانت جدید، بایستی الزامات ارائه شده در آخرین ویرایش ضوابط کشوری رعایت شود (در حال حاضر دستورالعمل منتشر شده از سوی ACMG مورد اتفاق نظر است).

در تفسیر یافته های ثانویه که مرتبط با بیماری فرد یا خانواده نمی باشد باید بر مبنای آخرین ویرایش ضوابط کشوری اقدام نمود (در حال حاضر دستورالعمل منتشر شده از سوی ACMG مورد اتفاق نظر است)، اخذ رضایتنامه آگاهانه از بیمار در این خصوص، ضروری بوده و از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

تفسیر نتیجه NGS نیز باید توسط مشاور ژنتیک تخصصی در یک جلسه پس از آزمایش به خانواده اعلام گردد و خانواده از مراحل بعدی آزمایش، آگاه شود.

ذخیره سازی داده ها

حجم اطلاعات تولید شده از این آزمایش بزرگ است. داده های ذخیره شده باید حاوی همه فایل های لازم برای آنالیز مجدد بیماران از ابتدا تا انتها باشد. این فایل ها معمولاً شامل: ردیابی هویت نمونه ها، فایل ها و داده های متریکس کیفیت، گزارش متریکس کیفیت توالی یابی، فایل نقشه برداری، واریانت هایی که به صورت دستی بررسی شده اند و فایل های مرتبط با واریانت ها و تفسیر آنها باشد. آنالیز مجدد می تواند بر اساس خط مشی آزمایشگاه یا بنا به درخواست پزشک ارجاع دهنده یا بیمار انجام شود. در هر حال، آزمایشگاه دیگری میبایست بتواند با استفاده از این فایل ها به آنالیز مجدد از ابتدا تا انتها مبادرت کند. نمونه هایی از فایل های نگهداری شده ممکن است شامل FASTQ، BAM، VCF و مشتقات آن باشند.

حداقل مدت زمان نگهداری فایل هایی که باید در آزمایشگاه نگهداری شوند به صورت زیر است:

- توالی (FASTQ) (۲ سال) و انواع (VCF) (۵ سال) .
 - گزارش نهایی به مدت حداقل ۲۵ سال
 - آزمایشگاه هنگام ارائه نتایج موظف است یک نسخه از فایل شامل FASTQ، BAM، VCF مرتبط با مراجع را در اختیار وی قرار داده و بر لزوم نگهداری از آن تاکید نماید.
- تصمیم گیری در مورد مدت زمان نگهداری بقیه فایل های داده ها به عهده آزمایشگاه با در نظر گرفتن نیاز بیماران و پزشکان می باشد.

محدودیت های فنی آزمایش

محدودیت های فنی آزمایش باید به منظور سلب مسئولیت از آزمایشگاه، در گزارش نوشته شود، این نکات شامل موارد زیر است:

- تعیین توالی کل اگزوم بر اساس شیوه به دام اندازی اختصاصی و هدفمند کل اگزوم استوار است و مناطقی که به دام اندازی می شوند، مورد تجزیه و تحلیل قرار نمیگیرند. در شرایطی که از یک ژن واریانتی گزارش نشود لزوماً به این معنا نیست که هیچ گونه واریانت بیماریزا در آن ژن وجود ندارد.

- به طور معمول، تغییرات تک نوکلئوتیدی، و حذف/اضافه های کوچک (indels) معمولاً در محدوده ۸ تا ۱۰ نوکلئوتیدی را میتوان شناسایی نمود.

- ردیابی برخی از تغییرات ژنومی را نمی توان به نحو قابل اعتماد انجام داد، این موارد عبارتند از؛ تکرارهای سه گانه، بازآرایی ژنومی، حذف، تکرار و اضافه های بزرگ، تغییر در تعداد کپی (CNV)، واریانت های نواحی تنظیمی، RNA های غیر کدکننده، اثرات چند ژنی بیماری، ژن های نامشخص (unannotated)، تغییرات اپی ژنتیک/ تغییرات کروماتین، جهش های دخیل در توارث سه آلی، جهش های ژنوم میتوکندری.

- آزمایش قادر به پیش بینی زمان شروع بیماری یا شدت بیماری نیست.
- اگر یک واریانت شناسایی بشود، ممکن است به عنوان بیماری را تشخیص داده نشود چون هنوز درک کاملی از ژنوم وجود ندارد و نمیتوان با دقت ۱۰۰٪ اثر تمام واریانت ها را پیش بینی نمود.
- تفسیر نتایج بر درک فعلی ما از ژنوم انسان و سلامت و بیماری استوار است. آزمون ممکن است واریانت هایی را شناسایی کند که اهمیت بالینی آنها نامشخص (VUS) می باشد. البته باید تلاش شود تا این واریانت ها تا حد امکان محدود شوند.
- نتایج آزمون ممکن است مبهم بوده و آزمایش دیگر اعضای خانواده برای تفسیر نتایج بیمار ممکن است لازم باشد.
- توانایی برای شناسایی واریانت مسؤول بیماری کاملاً به اطلاعات بالینی و تاریخچه خانوادگی فراهم شده توسط بیمار و مشاور ژنتیک وابسته است

اطلاع رسانی در مورد امکان آنالیز مجدد داده ها در آینده در صورت تمایل مراجع صورت می گیرد.

(ت) موارد ضروری انجام مداخله تشخیصی (اندیکاسیون ها)

- انجام مشاوره ژنتیک قبل از انجام آزمایش قویاً توصیه می شود.
- پانل NGS بایستی در مواقعی بررسی شود که تشخیص های افتراقی محدود است. آزمایشگاه می بایست با تعامل با فرد درخواست کننده از وجود یا عدم وجود ژن خاص بیماری در پانل NGS درخواستی اطمینان حاصل کند.
- آزمایشگاه در تعامل با فرد درخواست کننده باید از رعایت اندیکاسیون های معمول، به شرح زیر، برای آزمایش تعیین توالی کل اگزون اطمینان حاصل کند:
- آن دسته از بیماران مشکوک به اختلال مندلی که با وجود انجام آزمایشهای ژنتیکی متناسب با دستورالعمل هر بیماری مقدماتی تشخیص مسجل نشده است.
- بیماران دارای یک لیست طولانی از تشخیص های افتراقی با توجه به پیچیدگی آزمایشات، استفاده از این آزمون برای محدود کردن تشخیصهای افتراقی صورت میگیرد.
- بیماریهای هتروژن از لحاظ ژنتیکی که پانل بهینه برای آن موجود نباشد.
- پس از تعامل با درخواست کننده آزمایش در مشورت بالینی سطح ۳، آزمایشگاه میتواند تعیین توالی اگزوم را به صورت تریو (شامل پدر، مادر و کودک مبتلا)، دیو (Pair or Duo) یا مونو انجام دهد.

ج (تواتر ارائه خدمت)

ج-۱) تعداد دفعات مورد نیاز

یکبار در طول زندگی هر فرد

با توجه به شرایط بالینی بیمار و صلاحدید پزشک، آزمایش دوباره تنها در صورت پوشش دهی بیشتر آزمایش، قابل انجام است.

ج-۲) فواصل انجام

کاربرد ندارد

د) افراد صاحب صلاحیت جهت تجویز (Order) خدمت مربوطه و استاندارد تجویز:

پزشک متخصص و فوق تخصص بالینی، پزشک مشاوره ژنتیک

ه) ارائه کننده اصلی صاحب صلاحیت جهت ارائه خدمت مربوطه:

دانش آموخته رشته دکتری تخصصی ژنتیک پزشکی

و) عنوان و سطح تخصص های مورد نیاز (استاندارد) برای سایر اعضای تیم ارائه کننده خدمت:

عنوان تخصص	تعداد مورد نیاز به طور استاندارد به ازای ارائه هر خدمت	میزان تحصیلات مورد نیاز	سابقه کار یا دوره آموزشی مصوب (سال)	نقش در فرایند ارائه خدمت
دکترای تخصصی ژنتیک پزشکی (مسئول فنی)	۱ نفر	دکترای تخصصی ژنتیک پزشکی		مسئولیت فنی و نظارت بر کل فرایند های پیش از آزمایش، آزمایش و پس از آزمایش و برقراری و حفظ سیستم مدیریت کیفیت
کارشناس فنی	۱ نفر	کارشناس ارشد و یا دکترای تخصصی ژنتیک		کارشناس فنی
کارشناس بیوانفورماتیک*	۱ نفر	کارشناسی ارشد/دکترای تخصصی بیوانفورماتیک		توسعه و صحنه گذاری پایپلاین

*کارشناس بیوانفورماتیک ترجیحا جهت توسعه و صحنه گذاری پایپلاین توصیه می شود

ز) استانداردهای فضای فیزیکی و مکان ارائه خدمت:

در آزمایشگاه ژنتیک می بایست گردش یک سویه کاری و جریان یکطرفه هوا باید به نحو مقتضی برقرار گردد. فضای استاندارد Pre-PCR (با فشار مثبت) برای استخراج نمونه ژنومی و ساخت کتابخانه و فضای استاندارد Post-PCR (با فشار منفی) برای تقویت کتابخانه، مراحل تکمیلی و انجام توالی یابی باید اختصاص داده شود. فضای مجزا برای سرور آنالیز لازم است در نظر گرفته شود.

ح) تجهیزات پزشکی سرمایه ای به ازای هر خدمت:

ردیف	عنوان تجهیز/دستگاه مورد استفاده	کاربرد در فرایند ارائه خدمت	تعداد خدمت قابل ارائه در واحد زمان	امکان استفاده همزمان برای سایر خدمات
۱	Next-Generation Sequencing Instrument	توالی یابی	۱ run در ۲۴ ساعت	خیر
۲	for Library Preparation	آماده سازی نمونه و تکثیر	۱ run در ۱۰ ساعت	خیر
۳	Centrifuge مدل ۵-۴	انجام مراحل حد واسط	۱ run در ۳ ساعت	خیر
۴	Qubit	تعیین غلظت DNA	محدودیت ندارد	دارد
۵	فریزر	نگهداری ملزومات و نمونه ها	۲۴ ساعت	بله
۶	یخچال	نگهداری ملزومات و نمونه ها	۲۴ ساعت	بله
۷	طیفی از سمپلرهای تک کاناله (۲ عدد)	انجام مراحل حد واسط	محدودیت ندارد	بله
۸	میکروسانتريوفیوز	انجام مراحل حد واسط	محدودیت ندارد	بله
۹	ورتكس	انجام مراحل حد واسط	محدودیت ندارد	بله
۱۰	Server	سرور پشتیبان برای نگهداری داده ها	۲۴ ساعت	خیر

ط) داروها، مواد و لوازم مصرفی پزشکی جهت ارائه هر خدمت:

ردیف	اقلام مصرفی مورد نیاز	تعداد مصرف
۱	Chips/Flow cell (dependent on the NGS platform)	به تعداد مورد نیاز
۲	DNA extraction kit	به تعداد مورد نیاز
۳	Pipette tip, 1000µl filter, sterile	به تعداد مورد نیاز
۴	Pipette tip, 100µl filter, sterile	به تعداد مورد نیاز
۵	Pipette tip, 10µl filter, sterile	به تعداد مورد نیاز
۶	Special DNA Tube , 1.5ml	به تعداد مورد نیاز
۷	Special DNA Tube , 0.5ml	به تعداد مورد نیاز
۸	Special DNA Tube , 0.2ml	به تعداد مورد نیاز
۹	آداپتور و بارکد	به تعداد مورد نیاز
۱۰	Instrument support services	به تعداد مورد نیاز
۱۱	Data analysis software	به تعداد مورد نیاز

ظ) اقدامات پاراکلینیکی، تصویربرداری و دارویی مورد نیاز جهت ارائه خدمت:

برحسب نوع خدمت با در نظر گرفتن استانداردهای حرفه ای و ضوابط کشوری و با توجه به درخواست متخصص / فوق تخصص

مربوطه به همراه مدارک و مستندات تکمیلی

آزمایشگاه باید از وجود موارد زیر همراه درخواست آزمایش اطمینان حاصل نماید:

- سابقه خانوادگی در قالب شجره نامه، ثبت و جمع آوری مدارک و مستندات شامل کلیه اقدامات کلینیکی و پاراکلینیکی
- سوابق پاراکلینیکی قبلی مرتبط، شامل تصویربرداری ها و آزمایشهای تخصصی، عکس و فیلم بیمار در صورت لزوم
- ارزیابی جامع فنوتیپ بیماری توسط پزشک (با در نظر گرفتن احتمال وجود سایر فنوتیپهای مرتبط بیماری)

ی) استانداردهای گزارش :

گزارش NGS ، باید توسط مسئول فنی ژنتیک پزشکی تفسیر کننده، امضاء شود.

استاندارد گزارش دهی آزمایش های NGS

گزارش اصلی شامل موارد زیر باشد :

- مشخصات بیمار
 - توصیف علائم و تاریخچه بالینی
 - توصیف مختصری از آزمایش: پلتفرم NGS مورد استفاده برای تعیین توالی، نوع آزمایش NGS (تعیین توالی کل اگزوم یا پانلی از ژن ها)، مسیر بیوانفورماتیک بهینه سازی شده.
 - خلاصه ای از یافته های اصلی: واریانت های شناخته شده مرتبط با فنوتیپ، واریانت های ناشناخته اما دارای شواهد کافی برای احتمال دخالت واریانت در ایجاد فنوتیپ مربوطه (بر اساس دانش ژنتیک و بیوانفورماتیک) و واریانت های پاتوژنیک و احتمالاً پاتوژنیک می بایست گزارش شود و طبقه بندی هر کدام بر مبنای آخرین ویرایش دستورالعمل منتشر شده از سوی ACMG به وضوح در گزارش ذکر گردد (یافته های ثانویه)
 - محدودیت های فنی آزمایش نیز باید در گزارش ذکر شود
- آنالیزها و گزارش بالینی می بایست بر واریانت های مربوط به ژنهای شناخته شده مرتبط با فنوتیپ بیماری معطوف شود. نامگذاری واریانتها به صورت استاندارد باشد:
- گزارش واریانت ها باید بر اساس نامگذاری HGVS (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>) بوده و شامل نام ژن بر اساس HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) ، شناسه توالی مرجع و نسخه (version) آن باشد (به عنوان مثال REFSeq Accession Number و/یا Ensembl Transcript/Protein ID و/یا CCDS ID) تا نقشه یابی واریانت بدون خطا امکانپذیر باشد.
- Assembly توالی ژنوم رفرانس و شماره نسخه (version) که در مرحله alignment و فراخوانی واریانت ها (variant calling) استفاده شده است، باید گزارش شود. موقعیت کروموزومی (یعنی genomic coordinate) واریانت، تغییرات پروتئین و cDNA باید گزارش شود.

ک) شواهد علمی در خصوص کنتراندیکاسیون های دقیق خدمت:

ندارد

ل) مدت زمان ارائه هر واحد خدمت:

زمان معمول پس از پذیرش و با شرط ارائه اطلاعات خواسته شده به مدت زمان :

حداکثر ۴ ماه برای تعیین توالی اگزوم

حداکثر ۲ تا ۳ ماه برای پانل NGS

در موارد اورژانس بسته به تعامل آزمایشگاه با مشاور ژنتیک درخواست کننده آزمایش مدت زمان جوابدهی میتواند کاهش یابد.

ف) موارد ضروری جهت آموزش به بیمار:

کسب رضایت آگاهانه (مبتنی بر مشاوره قبل از آزمون) آزمایشگاه های پزشکی با دامنه فعالیت ژنتیک پزشکی باید مواردی مانند مضرات، منافع، هزینه، زمان جوابدهی و محدودیت های آزمایش، احتمال وجود یافته های ثانویه را به اطلاع بیمار برساند و همچنین توضیح و تکمیل سند رضایت آگاهانه را انجام دهد. بایستی اطلاعات عملکردی (عمق و پوشش) آزمایش در اختیار فرد درخواست کننده باشد.

نتایج به دست آمده باید توسط پزشک مشاور ژنتیک یا پزشک متخصص برای افراد مشاوره جو توضیح داده شود.

منابع:

۱. استاندارد INSO-ISO-15189
۲. استاندارد آزمایشگاه های پزشکی، نسخه سال ۱۳۹۷ ابلاغی ۴۰۰/۵۳۶۶ مورخ ۱۳۹۷/۳/۹
۳. Bennett RL et al. Standardized human pedigree nomenclature: update and assessment of the recommendations of the National Society of Genetic Counselors. Genet Couns. 2008 Oct;17(5):424-33.
۴. Brownstein CA et al. An international effort towards developing standards for best practices in analysis, interpretation and reporting of clinical genome sequencing results in the CLARITY Challenge. Genome Biol. 2014;15(3).
۵. Clinical Tests Arch Pathol Lab Med. Association for Clinical Genetic Science ACGS) practice guidelines for Targeted Next Generation Sequencing Analysis and Interpretation.
۶. CLSI standard MM09-A2 Nucleic Acid Sequencing Methods in Diagnostic Laboratory
۷. European Society of Human Genetics. Eur J Hum Genet. 2013 Jun;21 Suppl1:S1-5.
۸. Green RC1, et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. Genet Med. 2013 Jul;15(7):565-74.
۹. Lubin IM, McGovern MM, Gibson Z, Gross SJ, Lyon E, Pagon RA, Pratt VM, et al. Clinical perspective about molecular genetic testing for heritable conditions and development of a clinician friendly laboratory report. J Mol Diagn. 2009 Mar;11(2):162-71.
۱۰. Rehm HL et al. Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG clinical laboratory standards for nextgeneration sequencing. Genet Med. 2013;15(9):733-47.
۱۱. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015 May;17(5):405-24.

Scheuner MT, Hilborne L, Browne J, Lubin IM, et al. A report template for genetic tests designed to improve communication between the clinician and the laboratory. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012 Jul;16(7):761-9. .12

van El CG, et al; ESHG Public and Professional Policy Committee. Whole-genome sequencing in health care: recommendations of the European Society of Human Genetics. *Eur J Hum Genet*. 2013 Jun;21(6):580-4. .13

Weiss, Van der Zwaag et al. Best practice guidelines for the use of next-generation sequencing applications in genome diagnostics: a national collaborative study of Dutch genome diagnostic laboratories. *Hum Mutat* 2013; 34:1313-21. .14

Yang, et al. *N Engl J Med*. 2013 Oct 17;369(16):1502-11, and GeneDx, Retterer et al., *Genet Med*. 2015 Dec 3). .15

College of American Pathologists (CAP) Molecular Pathology Checklist. 2015 .16
http://www.cap.org/web/home/lab/accreditation/accreditation-checklists?_afLoop=684110479155191#!%40%40%3F_afLoop%3D684110479155191%26_adf.ctrl-state%3D1b36gc8uxe_17

Kalia SS, Adelman K, Bale SJ, et al. 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*. 2017 Feb;19(2):249-255. .17

Miller DT, Lee K, Abul-Husn NS, Amendola LM, Brothers K, Chung WK, Gollob MH, Gordon AS, Harrison SM, Hershberger RE, Klein TE, Richards CS, Stewart DR, Martin CL; ACMG Secondary Findings Working Group. Electronic address: documents@acmg.net. ACMG SF v3.2 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med*. 2023 Aug;25(8):100866. doi: 10.1016/j.gim.2023.100866. Epub 2023 Jun 22. PMID: 37347242; PMCID: PMC10524344. .18