



## Artículo Original

## Guía de Procedimientos Operacionales y Recomendaciones en la Implementación de Secuenciación de Nueva Generación para Diagnóstico Clínico

## Standard Operational Procedures and Recommendations on Next Generation Sequencing for Clinical Diagnostics

Méndez-Ríos JD\*

\*Sección de Genética y Citogenética, Caja de Seguro Social, República de Panamá

**Palabras claves:**

genética molecular, secuenciación de nueva generación, enfermedades genéticas

**Keywords:**

molecular genetics, next generation sequencing, genetic diseases

*Correspondencia a:*  
Dr. Jorge Méndez

*Correo electrónico:*  
jdmendez01  
@hotmail.com

El autor ha declarado que no existen conflictos de intereses con la publicación del presente trabajo.

Se obtuvo el consentimiento informado de todo paciente participante. Los autores declaran autogestión como fuente de financiamiento.

**Resumen**

La tecnología diagnóstica conocida como NGS por sus siglas en inglés, o Secuenciación de nueva generación, es relativamente nueva, y se está implementando en algunos hospitales de Panamá. Esta tecnología ha demostrado ser una herramienta muy eficiente para la detección de alteraciones genómicas o exómicas, tanto para la clínica como para la investigación. Dada la complejidad de esta prueba, requiere una infraestructura y un número importante de recursos humanos capacitados para poder implementar esta prueba. El propósito de este documento es establecer un marco de referencia para los procedimientos administrativos en cuanto a la realización de las pruebas de secuenciación por metodología NGS. Además, que el mismo sirva de guía para el establecimiento adecuado de programas internos de control y evaluación de calidad de esta tecnología en nuestro país y la región.

**Summary**

The technology known as Next-Generation sequencing is relatively new, and it is been implemented in some Panamanian hospitals. It has demonstrated to be a very efficient tool to identify genomic and exomic variants in a clinical setting, as well for research purposes. Because of its complexity, it requires an important infrastructure and a significant number of trained health-care professionals to carry out this test. The purpose of this document is to establish a frame for the administrative and technical aspects for NGS in a clinical setting. Moreover, it will serve as a guide to establish quality control procedures that the technology requires in our country and the region.

**INTRODUCCIÓN**

La secuenciación de nueva generación o NGS por sus siglas en inglés, es una metodología altamente compleja, no solo por la capacidad de resolución para identificar cada nucleótido de un genoma, sino por la abrumadora cantidad de información que genera y la necesidad de tener múltiples recursos humanos idóneos para implementar dicha tecnología. Las utilidades en un ambiente diagnóstico es impresionante, e incluyen la determinación molecular asociadas a neoplasias (variantes somáticas), o la existencia de mutaciones asociadas a enfermedades hereditarias (variantes de células germinales) [1]. Dentro de este marco de diagnóstico clínico, esta misma metodología puede ser adaptada para la determinación de secuencias tanto de ADN como de ARN. La determinación de las secuencias de nucleótidos de ADN es conocido como secuenciación genómica, mientras que la determinación de las secuencias de ARN es conocida como transcriptómica. Por la relativa facilidad de implementación que el análisis de ADN tiene sobre los procedimientos de análisis de ARN, la determinación de alteraciones en el ADN ha avanzado mucho más en los últimos años y ha sido validada para uso clínico.

Esta revolucionaria metodología, también está siendo utilizada en oncología para la tipificación de tumores y malignidades, y para la selección del tratamiento más eficiente [2]. Esta especificidad en el manejo y determinación del tumor por métodos moleculares ha sido la base de lo que hoy se conoce como medicina personalizada.

Adicionalmente a la capacidad de utilizar esta tecnología enfocada para el diagnóstico molecular de enfermedades genéticas, también se puede utilizar para la identificación y tipificación de patógenos humanos o otros organismos [3]. Las secuencias genómica de estos patógenos obtenidas de secreciones o tejidos infectados no solo identifican al agente infeccioso, sino que proveen la información valiosa de su resistencia a antibióticos o antivirales para la selección más apropiada del tratamiento.

La secuenciación de ADN por NGS en humanos tiene muchas variantes o formas de ser implementada. Sus aplicaciones e implementación ha sido revisado en detalles en otras publicaciones (Figura 1) [4,5]. Entre las diversas formas de NGS más comunes en la clínica podemos mencionar: 1) la identificación de cambios exómicos (del inglés "whole exome sequencing" - WES), los cuales evalúa las regiones que codifican para una proteína; o 2) la detección de cambios en la secuencia de todo el genoma del paciente (del inglés "whole genome sequencing" - WGS). Cada una de estas variantes requiere un conocimiento particular de la genética molecular al momento de realizar la interpretación y detalles de la tecnología en sí.

El laboratorio que implementa NGS debe evaluar las necesidades y la demanda de este tipo de servicio para así escoger la técnica que más convenga. Previa implementación y selección de la técnica por NGS, se debe analizar bien el propósito por el cual requiere NGS, volumen de pacientes, los costos involucrados, el personal técnico y clínico a su disposición, para así determinar la factibilidad de la implementación de esta tecnología.

En Panamá, se ha iniciado el proceso de implementación de esta tecnología tan novedosa, y se requiere establecer los fundamentos legales, técnicos y clínicos para esta metodología diagnóstica. Hoy en día, los aspectos no están regulados, y su normativa es relativa al sitio de implementación en muchas ocasiones. Sin embargo, como cualquier otra tecnología diagnóstica, se debe establecer protocolos, controles de calidad, y marcos legales que vayan de la mano con estos avances tecnológicos tan innovadores, usando como modelo aquellos grupos y laboratorio con experiencia con esta metodología [6-8].

En esta guía, incluiremos a grandes rasgos, los aspectos más importantes al momento de implementar la prueba de secuenciación para uso clínico.

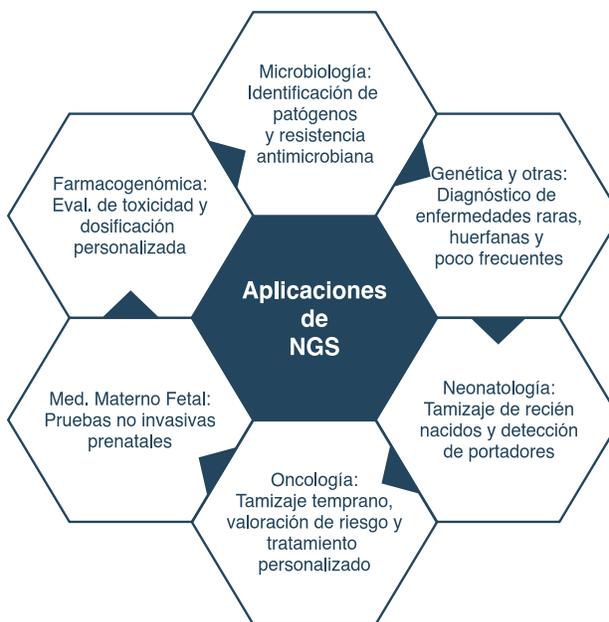
## 1. ASPECTOS INCLUIDOS

Este documento describe los siguientes aspectos: recursos humanos necesarios, emisión de la orden de secuenciación, recepción de documentos, evaluación previa secuenciación, toma y procesamiento de la muestra, corrida de secuenciación y manejo de los datos, análisis y control de calidad del proceso, y reporte.

## 2. FLUJOGRAMA Y RECURSO HUMANO INVOLUCRADO

Esta prueba requiere de un equipo que incluya aspectos administrativos, clínicos y técnicos. En cuanto a la parte

Figura 1. Aplicaciones clínicas de la tecnología de NGS.



Fuente: modificado de Turnbull C, et al, BMJ 2018;361:k1687

clínica y técnica, se requiere un entrenamiento y experiencia en genética molecular, genética molecular y bioinformática.

Entre los integrantes del equipo, podemos mencionar los siguientes roles:

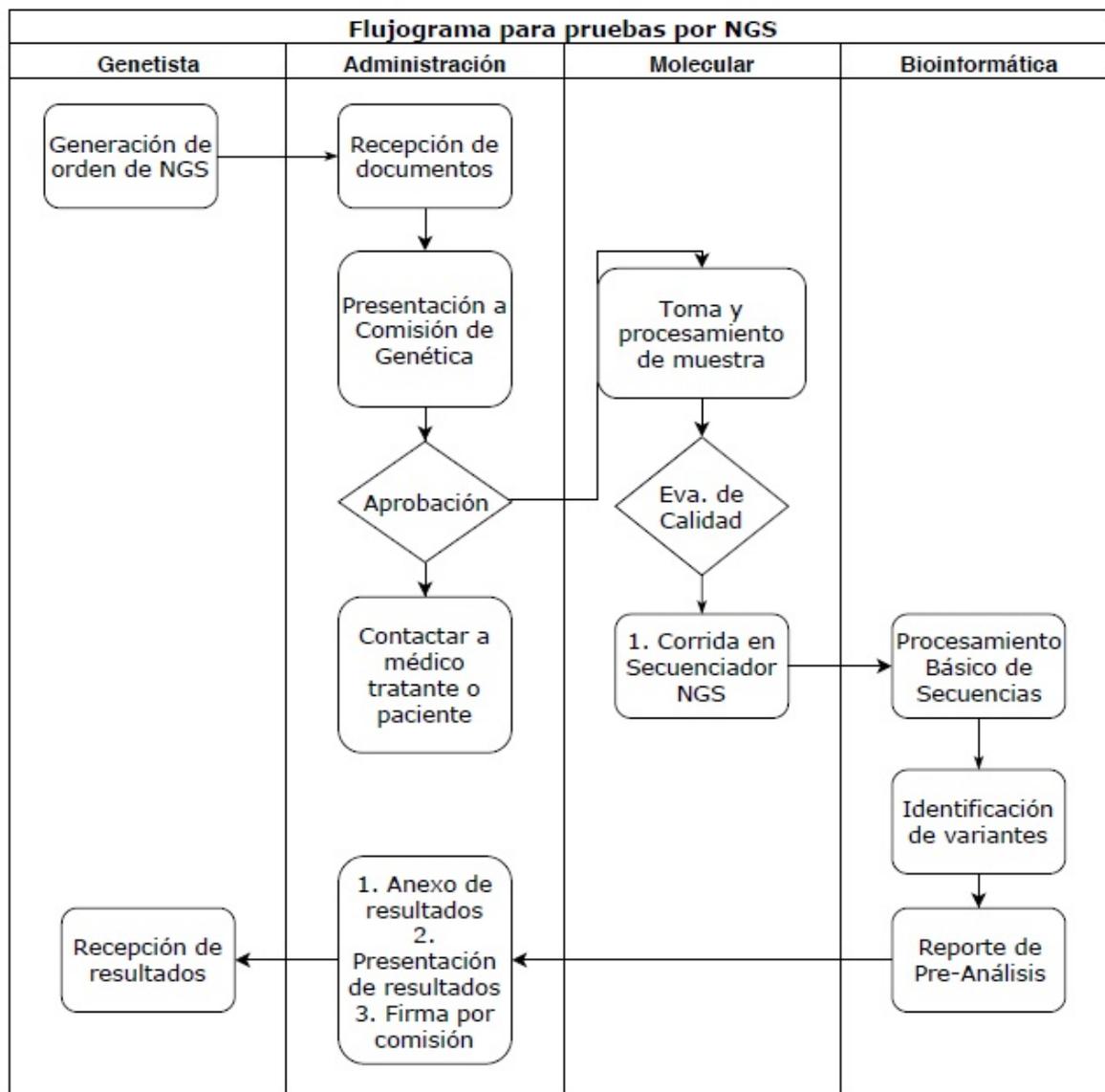
**Coordinador:** El coordinador es responsable del cumplimiento del flujograma de la prueba (Figura 2). Sus funciones son: a) Revisar orden de secuenciación y documentos adicionales, b) agrupar a los pacientes para la corrida, c) comunicación con el personal técnico para la realización de la prueba, d) Llevar el informe de muestras procesadas y resultados disponibles.

**Secretaria:** La secretaria tiene funciones administrativas como: a) la revisión y aceptación de documentos entregados por los pacientes requeridos para la prueba, b) contactar al paciente telefónicamente para solicitud de documentos, c) coordinar manejo de expedientes y formularios.

**Genetista:** El genetista es un médico especialista clínico o molecular que tiene como función: a) generar la orden de pruebas genéticas ordenadas al paciente, b) Servir de consultor a otras especialidades para la realización de esta prueba, c) Dar asesoría genética al paciente y familiares antes y después de la prueba, d) Interpretación de los hallazgos identificados en la prueba de NGS. El genetista con entrenamiento molecular y con la información clínica del paciente deberá aprobar el reporte final para cada paciente.

**Tecnólogo y/o Laboratorista:** Personal especialista en tecnología médica o laboratorista, a cargo de a) la obtención, manejo y procesamiento correcto de las mues-

Figura 2. Flujograma de trabajo para metodología NGS diagnóstica.



Fuente: Autor.

tras para las pruebas laboratoriales, b) responsable de la emisión de los resultados analíticos de las pruebas.

**Bioinformático:** Técnico especialista en análisis de resultados de secuenciación, y alineación de secuencias, quien tiene la responsabilidad de: a) reportar los parámetros bioinformáticos de calidad para cada corrida de NGS, b) manejo apropiado y confidencial de las secuencias resultantes, y c) responsable de la preservación de los registros digitales resultantes.

El flujograma (Figura 2) ayuda a establecer un orden de manejo de la información y de los procesos. La implementación inicia con la orden del genetista, ya sea en el consultorio o en la sala de hospitalización.

Esta orden debe estar acompañada con los detalles clínicos relevantes que permita valorar la necesidad de la prueba. Dado que hoy en día, esta metodología no es de

rutina, se debe establecer un proceso administrativo de evaluación o discusión de los casos que llegan al laboratorio.

Una vez aprobada la orden de secuenciación, se deberá coordinar con el equipo técnico, con entrenamiento en biología molecular, para la toma y procesamiento de la muestra. Esta parte de biología molecular contiene múltiples aspectos rigurosos de control de calidad que deben establecerse para cada muestra. Una vez extraído el DNA y procesado la muestra, culminando con lo que se conoce como generación de librerías de NGS, se procede a la secuenciación. Una vez iniciada la secuenciación, el proceso pasa a manos de un bioinformático, quien dará seguimiento al mismo proceso de secuenciación, y evaluará la calidad de los resultados de todas las muestras corridas. El proceso de secuenciación podrá tomar varios días dependiendo del equipo que tenga el laboratorio.

Una vez finalizada la secuenciación, los datos deben ser evaluados por el bioinformático desde el punto de vista de revisión de calidad, y emitir un certificado de pase o no de los resultados. De pasar las pruebas de calidad, los las secuencias serán analizadas por los genetistas clínicos o genetistas moleculares, quien darán la interpretación de los resultados, detallando así la relevancia clínica de los hallazgos encontrados, y emitiendo el informe final.

### 3. PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO

La orden de NGS es el documento o herramienta principal para capturar los datos demográficos, aspectos clínicos y resultados de pruebas de relevancia para la interpretación de la prueba. El documento debe ser llenado en su totalidad, y no debe ser aceptado incompleto. Esto tiene importancia al momento de la interpretación de los resultados en donde cada uno de los elementos encuestados tiene relevancia clínica. El proceso de secuenciación inicia con la generación de esta orden por parte del clínico.

#### 3.1 Generación de orden para NGS

Las órdenes de NGS (anexo formulario 1) deben contener información demográfica del paciente, que incluya: Nombre, identificación, sexo, teléfono, dirección. El sexo es determinante para el análisis por las diferencias cromosomales, y los programas computacionales de análisis requieren esta información para determinar si debe analizar el cromosoma Y.

La orden debe contener una historia clara y completa, junto con el pedigrí, antecedentes personales patológicos y heredo-familiares. Estos datos son necesario al momento de la interpretación de las variantes y evaluar la penetrancia del la enfermedad.

La orden también debe incluir información de estudios moleculares previos realizados en el paciente o en sus padres. Esto ayuda a determinar si la variante es de novo, y para la posterior implementación de los criterios ACMG al establecer variantes patológicas. Los resultados de estudios previos en el paciente o familiares también ayudan a justificar el procedimiento de diagnóstico por NGS.

El diagnóstico presuntivo debe estar claramente establecido en la Orden de Secuenciación, y evitar el uso de grupos sindrómicos muy abarcadores. Mientras más específico sea el diagnóstico, más específico será el reporte. De tener más de una sospecha diagnóstica, se debe incluir otros diagnósticos presuntivos para aumentar la sensibilidad del los resultados. En caso de que los hallazgos clínicos no coinciden con un diagnóstico específico, se recomienda utilizar términos más abarcadores (Ejemplo: "Retraso global del desarrollo")

El genetista que envía la orden de secuenciación debe conocer qué tipo de metodología de secuenciación o lista de genes están a disposición. Esto es importante para saber de antemano si el gen o los genes asociados a la enfer-

medad sospechada serán o no reportados. Algunos laboratorios trabajan con paneles (pequeñas lista de genes) y no con el exoma completo. Al no conocer que genes están disponibles en dicho laboratorio, se corre el riesgo de solicitar una prueba que no reportará el gen de interés. El genetista debe dar la consejería genética presecuenciación, que incluye el comunicarle al paciente en qué consiste la prueba, y detallar los aspectos legales, éticos y clínicos de este procedimiento. Durante la consejería pre-secuenciación, el genetista debe guiar al paciente para el entendimiento y firma del consentimiento informado. Es indispensable que el paciente tenga una claridad total de la prueba y de cada aspecto de privacidad, y detalles del reporte del análisis.

#### 3.2 Recepción de documentos

La secretaria juega un papel indispensable en la revisión de los documentos al momento de la entrega de la orden de secuenciación. Al ser entregado los documentos, se debe llevar un procedimiento previamente definido para darle curso a la orden entregada. El flujograma debe incluir estos aspectos:

Se anotará y consignará en registro la recepción de los documentos, incluyendo el nombre completo, identidad del paciente, examen solicitado, y fecha.

Se creará expediente rotulado con nombre e identificación del paciente. Este expediente será entregado al coordinador de la prueba para su ingreso a la lista de espera de pacientes a secuenciar.

El coordinador le asignará al expediente un número en secuencia para establecer el orden de ingreso a la lista.

La base de datos de los pacientes en espera para NGS debe contener al menos los siguientes campos: Número de registro, nombre, cédula, edad, diagnóstico presuntivo, fecha de entrega de documentos, fecha de emisión de la orden, médica que ordena la prueba.

#### 3.3 Verificación de documentos y evaluación de casos

Cuando la prueba se realiza en instituciones del estado, debe existir un proceso de validación o discusión para aquellos casos que no son rutinarios. Usualmente, esta evaluación se realiza por una comisión de especialistas en genética con la capacidad de establecer criterios para el uso de esta metodología. Estos criterios son importantes para asegurar que el paciente haya completado estudios previos como cariotipos o pruebas de micro arreglos antes de un estudio de NGS cuando se amerite. Cada institución deberá establecer que requisitos y pruebas deben estar presentes antes de proceder con el NGS.

Una vez aprobado o rechazado por los especialistas, se procederá a generar un acta con el listado de los pacientes aprobados, junto con las recomendaciones (anexo formulario 2).

#### 3.4 Generación de orden de toma de muestra para NGS

Un aspecto importante de la tecnología NGS es que las muestras son procesadas en grupo. Por esta razón, es

imperante que se coordine contactar a los pacientes en fechas próximas para así procesar las muestras al mismo tiempo si fuese posible. Para lograr esto, el coordinador de la prueba debe emitir un listado de los pacientes a ser secuenciados. Regularmente, los pacientes son escogidos en el orden que llegan las solicitudes de secuenciación; sin embargo, el orden de los pacientes podrá variar por razones clínicas y el estado de salud de alguno de los pacientes que requiera priorización. Una vez hecho el listado (anexo formulario 3), la secretaria contactará al paciente para coordinar con el tecnólogo o laboratorista el día y hora para la toma de la muestra. Importante indicar los horarios de toma de muestra. Se debe consignar los intentos de llamado al paciente en el mismo formulario en los casos que el paciente no responda.

### 3.5 Manejo y procesamiento de la muestra para NGS

Una vez tomada la muestra, ésta será guardada según protocolo interno de manejo de muestra. En este proceso, las muestras deben ser guardadas a una temperatura mínima dependiendo del tiempo que serán guardadas y de los insumos para la preservación de los mismos.

Una vez tomada todas las muestras para las secuenciación, se extraerá el ADN siguiendo el protocolo determinado para los reactivos que tenga el laboratorio. Cada set de reactivo para NGS contiene diversas recomendaciones para el procesamiento de las muestras y para la generación de las librerías de secuenciación. Se documentará cada paso de la preparación, y extracción del ácido nucleico con sus respectivos valores de concentración y calidad para cada paciente (anexo formulario 4).

Dado que los protocolos tienen dos o tres puntos de evaluación de calidad, la concentración del ácido nucleico debe ser registrado para cada muestra. A demás, para cada corrida, se debe detallar en la hoja de control de calidad el modelo de los equipos utilizados, número de lote de los reactivos, fecha de expiración de los reactivos, e identificación del protocolo utilizado.

La identificación de la muestra es indispensable por motivos de trazabilidad y confidencialidad, y esta identificación requiere ser consistente en cada paso del proceso. Dado que las muestras pasan por varios procesos de extracción, y luego son reportado por la maquina secuenciadora, se necesita ser consistente para identificar o rotular las muestras durante la extracción y durante el proceso de secuenciación y análisis.

Durante el proceso de creación de librerías, la metodología NGS le permite incluir unas secuencias específicas. Estas secuencias se conocen como códigos de barras o índices, y cada muestra tendrá una combinación única de esta secuencia. Durante el proceso de preparado de la librería, la hoja de registro de control de calidad para cada muestra debe tener la identificación de estas secuencias asociada a la muestra de cada paciente. Este control interno molecular también sirve como un control de calidad en caso de que ocurra algún error al momento de montar las máquinas en el secuenciador. Estos índices también

son necesarios para la trazabilidad de la muestra durante el proceso de análisis y manejo de datos bioinformáticos.

El secuenciador tiene la capacidad de determinar estos índices o códigos de barras como un mecanismo para confirmar la identidad de la muestra. La consistencia será evaluada como criterio de calidad y confiabilidad por organismos externos al implementarse controles de calidad externos y auditorías.

#### Nota:

El consentimiento informado gobierna los detalles e información a presentar en el reporte final. La selección de genes a reportar, hallazgos de variantes patológicas incidentales, y cualquier otro hallazgo será conversado y consensuado entre el paciente y su genetista a través de este consentimiento informado. Dependiendo de lo discutido con el paciente y la sospecha diagnóstica, el reporte podrá presentar únicamente las variantes asociadas con la sospecha diagnóstica.

### 3.6 Generación de datos bioinformáticos por NGS

Una vez generada las secuencias, se subirá la información a la plataforma computacional de control de calidad para la revisión inicial de los resultados. Se deberá revisar los parámetros de la corrida en general y de cada muestra, consignando los parámetros de calidad en el formulario correspondiente.

Esta función puede ser realizada por el bioinformático (anexo formulario 5). Además, se deberá guardar los datos generados en carpetas que identifiquen la corrida utilizando siglas de la prueba, año, y número de muestras (Ejemplo: NGS-2019-###), para así establecer una nomenclatura fácil de implementar.

Una vez se haya revisado la calidad de la corrida en general, se procederá a incorporar los resultados a la plataforma de análisis de variante seleccionada. En algunos casos, estas plataformas de calidad y análisis pueden realizar ambos proceso en un sólo paso.

En esta plataforma se genera los listados finales de variantes en base a los diagnósticos y genes pre-establecidos por el genetista. Una vez generado los reportes finales, se guardará los archivos "vcf" junto a los archivos "bam" correspondientes a la muestra [9].

### 3.7 Generación de reporte final

Una vez generado el análisis de variante para cada muestra, se deberá entregar al Coordinador de la prueba la evaluación de calidad del proceso molecular junto a la revisión de calidad bioinformática. Este documento servirá de certificado de calidad de los datos obtenidos antes de proceder con la revisión final de las variantes clínicas y su interpretación.

El reporte debe presentar claramente la identificación del paciente, la identificación de la muestra, y los parámetros de calidad de los resultados de esta muestra.

Los parámetros de calidad más comúnmente tanto molecular como bioinformático son: concentración del ADN (de la muestra y el preparado final), número total de secuencias, QC30, cobertura general, cobertura a 20X, y el %FP [10]. La documentación de calidad permitirá valorar la confiabilidad de los resultados, permitiendo al genetista realizar la revisión de las variantes a través de la plataforma seleccionada.

Una vez identificadas las variantes con relevancia clínica, el genetista deberá evaluar cada variante según la sospecha diagnóstica y genes específicos detallados en la orden de secuenciación. Cada variante deberá ser evaluada tomando en cuenta los criterios ACMG que ayudan a determinar la patogenicidad o benignidad de dicha variante [11-15].

Durante el proceso de estudio de las variantes, es importante utilizar referencias y bases de datos confirmadas como la base de datos OMIM, y artículos de investigación clínica donde demuestran la asociación de dicha variante a la enfermedad.

De esta forma, el reporte final deberá incluir:

- Parámetros de calidad molecular y bioinformática
- Listado de las variantes encontradas, clasificación, y localización en el genoma
- Referencias bibliográficas sustentando la asociación
- Recomendaciones ante los resultados
- Firma del tecnólogo y del genetista.

### Comentarios sobre el consentimiento informado

El consentimiento informado gobierna los detalles e información a presentar en el reporte final. La selección de genes a reportar, hallazgos de variantes patológicas incidentales, y cualquier otro hallazgo será conversado y consensuado entre el paciente y su genetista a través de este consentimiento informado. Dependiendo de lo discutido con el paciente y la sospecha diagnóstica, el reporte podrá presentar únicamente las variantes asociadas con la sospecha diagnóstica.

### 3.8 Discusión de los casos especiales en comité de genética

En casos especiales que se requiera considerar otras pruebas, se traerá los casos a comité de genética interno para su discusión. Se desarrollará una lista de criterios para establecer qué tipo de casos deben pasar por el comité de genética como requisito. Después de presentado el caso, se procederá a determinar el curso a seguir. El Formulario 2 (documento anexo) podrá ser utilizado como acta para registrar las decisiones del comité.

### 3.9 Contactar al paciente y consejo genético

Una vez generado el reporte final, se agrupará los resultados de cada paciente de la corrida NGS y se le informará al coordinador de la prueba para la distribución de los resultados a los genetistas. El genetista deberá comunicar los hallazgos de secuenciación al paciente, completando así la consejería pos-secuenciación.

### 3.10 Preservación y transferencia de datos

Las secuencias de los pacientes deberán de ser preservados y custodiados por un tiempo determinado por la institución. Ante la solicitud de un paciente de obtener los datos electrónicamente, el coordinador de la prueba entregará directamente al paciente o representante legal dicha información solicitada.

## DISCUSIÓN

La metodología diagnóstica por NGS es compleja, e involucra la interacción de múltiples profesionales de la salud. La colaboración armónica entre estos profesionales es necesaria para llevar a cabo el proceso de forma eficiente y con resultados de alta calidad, que garanticen la confiabilidad en los resultados.

El establecimiento de aspectos de control de calidad, consentimiento informado, metodología de trabajo, y preparación del recurso humano es indispensable previo inicio de la implementación de la prueba.

La evaluación de la cadena de frío y de fechas de expiración y lotes de reactivos también son importantes para garantizar buenos resultados. Estas prácticas de evaluación de calidad deben ser cotidianas para así asegurar que la inversión en una prueba tan costosa como la de NGS sea costo-eficiente para el laboratorio.

Los controles de calidad tanto laboratoriales como bioinformáticos son indispensables, y deben ser implementados con la mayor rigurosidad posible. Aunque la tecnología es nueva, ésta sufre de algunos defectos intrínsecos que un buen control de calidad puede solucionar.

Otros procedimientos de control de calidad incluyen la reproducibilidad de la prueba. Esto quiere decir que cada vez que se realiza la prueba en una determinada muestra, los resultados deben ser casi idénticos.

Esta reproducibilidad debe ser evaluada, en especial en los primeros intentos de establecer la metodología en el laboratorio. Los aspectos legales de la prueba son múltiples, y están enmarcados dentro del marco del consentimiento informado. Es indispensable que este documento esté completo, y sea entendible para el paciente. Esto debe ir acompañado por una consejería pre-secuenciación que añade al entendimiento de la prueba por parte del paciente.

## CONCLUSIÓN

La prueba de secuenciación por NGS debe considerarse multidisciplinaria, dado que participa el clínico, tecnólogos o laboratoristas, administrativos, genetistas moleculares y bioinformáticos. Dada que la implementación es laboriosa y compleja, hemos preparado este docu-

mento como guía para facilitar futuras implementaciones y que se pueda utilizar como un marco de referencia, beneficiando así a los laboratorios diagnósticos y de investigación del país y de la región.

Esperamos que en poco tiempo esta tecnología sea implementada en los principales hospitales y clínicas de la región, con los estándares y protocolos necesarios para su uso en el diagnóstico de enfermedades genéticas.

## REFERENCIAS

- [1] Kishnani, P.S., et al., Diagnosis and management of glycogen storage disease type I: a practice guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med*, 2014. 16(11): p. e1.
- [2] Li, J., et al., An NGS Workflow Blueprint for DNA Sequencing Data and Its Application in Individualized Molecular Oncology. *Cancer Inform*, 2015. 14(Suppl 5): p. 87-107.
- [3] Mendez-Ríos JD, et. al, Genome sequence of erythromelalgia-related poxvirus identifies it as an ectromelia virus strain, Mendez-Ríos JD, et. al, *Plos One*, April 27, 2012 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034604>
- [4] Turnbull C, et. al, The 100 000 Genomes Project: bringing whole genome sequencing to the NHS, *BMJ* 2018;361:k1687 doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.k1687>
- [5] South, S.T., et al., ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. *Genet Med*, 2013. 15(11): p. 901-9.
- [6] Mikhail, F.M., et al., Section E6.1-6.4 of the ACMG technical standards and guidelines: chromosome studies of neoplastic blood and bone marrow-acquired chromosomal abnormalities. *Genet Med*, 2016. 18(6): p. 635-42.
- [7] Schaefer, G.B., Response to ACMG Practice Guidelines and ACMG Standards and Guidelines, *Genetics in Medicine*, July 2010, volume 12, number 7, pages 446-463 and 464-470. *Genet Med*, 2010. 12(11): p. 748-9.
- [8] Kleinberger, J., et al., An openly available online tool for implementing the ACMG/AMP standards and guidelines for the interpretation of sequence variants. *Genet Med*, 2016. 18(11): p. 1165.
- [9] TW, H.B. and T. Girke, systemPipeR: NGS workflow and report generation environment. *BMC Bioinformatics*, 2016. 17: p. 388.
- [10] Li, M.M., et al., Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*, 2017. 19(1): p. 4-23.
- [11] Tavtigian, S.V., et al., Modeling the ACMG/AMP variant classification guidelines as a Bayesian classification framework. *Genet Med*, 2018. 20(9): p. 1054-1060.
- [12] Kulseth, M.A., Variant classification according to the ACMG Guidelines NSHG Website, 2017.
- [13] Daniels, S., Variant interpretation using the ACMG - AMP guidelines. ACGS Website, 2017.
- [14] Sian Ellard, e.a., ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification 2018. ACGS Guidelines.
- [15] Richards, S., et al., 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. 17(5): p. 405-24.