

Masterarbeit

Die Rolle von NGS in der neonatologischen
Intensivmedizin -
Teststrategien, Limitationen,
Neugeborenen-Screening

eingereicht von
Angelika Grübler

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science
(MSc)
an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am
Diagnostik & Forschungs- (D&F) Institut für Humangenetik

unter der Anleitung von Betreuer
ao.Univ.-Prof. Mag. DDr. Erwin Petek

Graz, 16.08.2022

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 16.08.2022

Angelika Grüber e.h.

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich für die Betreuung dieser Arbeit durch Univ.-Prof.Dr.Petek bedanken. Trotz Themenwechsel und einem sehr engen Zeitplan war es mir durch die Unterstützung von Prof. Petek möglich diese Arbeit zu verfassen. Für die Betreuung und auch für die Unterstützung, kompetente Lehre und stetige Begeisterung für das Fach der Humangenetik während des gesamten Lehrgangs möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Ohne die Unterstützung meiner Familie, meinen Eltern, Geschwistern und Tanten, wäre es mir nicht möglich gewesen in den letzten zwei Jahren berufsbegleitend zu studieren. Danke, dass ihr immer für mich da seid und stets ein offenes Ohr für jegliche Probleme habt.

Mein besonderer Dank gilt allerdings meinem Freund und Partner in allen Lebenslagen. Er hat mich in meinem Wunsch diesen Master zu absolvieren und mein Interesse an der Genetik zu vertiefen von Anfang an bestärkt, auch wenn es viel unserer doch raren Freizeit kostete. Er war in den letzten beiden Jahren in allen Höhen und Tiefen für mich da und hat mich immer unterstützt und motiviert, egal wie schwierig es auch war. Ich danke Dir von Herzen! Ohne dich, Bernd, hätte ich es nie geschafft!

Zusammenfassung

Genetische Erkrankungen, welche sich bereits in der frühen Neonatalperiode klinisch präsentieren machen einen signifikanten Anteil neonataler Morbidität und Mortalität aus. Kongenitale Anomalien manifestieren sich oft bereits pränatal, doch manche präsentieren sich erst postnatal in den ersten Lebensstunden und -tagen. Sie reichen von milde bis hin zu schweren Fehlbildungen und internistischen Krankheitsbildern, welche intensivmedizinisch behandelt werden müssen. Eine frühe Diagnosestellung ist wegweisend für korrekte therapeutische als auch frühzeitige präventive Maßnahmen, nur so kann das Outcome der betroffenen Kinder deutlich verbessert werden.

In der Vergangenheit wurde oftmals aus Kostengründen, der langen Dauer zwischen Probenentnahme und Befundübermittlung sowie dem fraglichen Nutzen einer genetisch bestätigten Diagnose auf genetische Testungen in der Neonatologie verzichtet. Heute weiß man, dass genetische Tests in vielen Fällen die Ursache für neonatale Missbildungen oder Krankheiten herausfinden können. Vor allem da sich in den letzten Jahrzehnten die Dauer bis zur Befundübermittlung der genetischen Testungen wesentlich verkürzt hat und die Kosten für eine Diagnostik wesentlich reduziert werden konnten.

Next-Generation-Sequencing wird sogar von vielen Experten als Diagnostik der ersten Wahl bei Verdacht auf (mono-)genetische Erkrankungen in der neonatologischen Intensivmedizin empfohlen. Durch eine frühzeitige Diagnosestellung kann die Morbidität als auch Mortalität von Neugeborenen und Säuglingen reduziert werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es einen Überblick über die aktuelle Datenlage zur genetischen Diagnostik, insbesondere mittels Next-Generation-Sequencing, in der neonatologischen Intensivmedizin sowie dessen Indikationen, Herausforderungen und Limitationen zu erbringen. Weiters wird eine Pipeline zur Empfehlung der klinischen Vorgehensweise zur genetischen Diagnostik in der Neonatologie beschrieben.

Ein Teil dieser Arbeit berichtet zudem über den zukünftigen Einsatz und die Limitationen von NGS im Neugeborenen-Screening.

Abstract

Genetic disorders that present clinically in the early neonatal period account for a significant proportion of neonatal morbidity and mortality. Congenital anomalies often manifest themselves prenatally but some only present postnatally in the first few hours and days of life. They range from mild to severe malformations and diseases that need to be treated in intensive care. An early diagnosis is groundbreaking for correct therapeutic as well as initial preventive measures, only in this way it is possible to improve the outcome of the affected children significantly.

In the past, genetic testing in the neonatal intensive care unit was often rejected for reasons of cost, the long time between taking a sample and reporting the results and the questionable benefit of a genetically confirmed diagnosis. Today we know that genetic tests can in many cases find the cause of neonatal malformations or diseases. Especially since the time it takes for the results of genetic tests to be transmitted has been significantly reduced in the last few centuries and the costs for diagnostics have also been significantly reduced.

Next-generation sequencing is even recommended by many experts as the first line for diagnostics in cases of suspected (mono)genetic diseases in neonatal intensive care medicine. Early diagnosis can reduce both neonatal and infant morbidity and mortality.

The aim of this work is to provide an overview of the data on genetic diagnostics, in particular on the use of next-generation sequencing in neonatal intensive care medicine as well as their indications, challenges and limitations. Furthermore, a pipeline for genetic diagnostics in the neonatal intensive care unit is described.

Part of this work also reports on the future use and limitations of NGS in newborn screening.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	II
ZUSAMMENFASSUNG	III
ABSTRACT	IV
INHALTSVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
2 INDIKATIONEN	3
3 INZIDENZ.....	4
4 TECHNOLOGIEN	5
4.1 ZYTOGENETIK.....	6
4.2 SANGER-SEQUENZIERUNG	7
4.3 NGS- NEXT GENERATION SEQUENCING	7
4.3.1 GEN-PANELS	8
4.3.2 WES (WHOLE-EXOME-SEQUENCING)	8
4.3.3 RAPID- WES UND RAPID- WGS	9
4.3.4 WGS (WHOLE-GENOME-SEQUENCING)	9
4.4 TRIO- GENOMIC SEQUENCING	10
5 GENETISCHE TESTSTRATEGIEN IN DER NEONATOLOGISCHEN INTENSIVMEDIZIN.....	12
5.1 DATENLAGE	13
5.1.1 WHOLE-EXOME-SEQUENCING	13
5.1.2 WHOLE-GENOME-SEQUENCING	16
5.1.3 VERGLEICHSTUDIEN	19
5.1.4 NGS-PANEL-DIAGNOSTIK.....	21
5.2 CONCLUSIO	25
6 TEST-ALGORITHMUS.....	27
7 AUSWIRKUNGEN AUF DEN KLINISCHEN OUTCOME.....	30
8 LIMITATIONEN DES EINSATZES VON NGS IN DER NEONATOLOGIE.....	31
9 DIE GENETISCHE BERATUNG.....	34
10 GENOMISCHE SEQUENZIERUNG ALLER NEUGEBORENEEN- A WAY TO GO?.....	38
10.1 DAS NEUGEBORENEEN-SCREENING IN ÖSTERREICH	38
10.2 DIE ZUKUNFT DES NEUGEBORENEEN-SCREENINGS – ANALYSE RELEVANTER FRAGEN FÜR DEN EINSATZ VON GENOMSEQUENZIERUNG IM SCREENING PROGRAMM.....	39
10.3 HERAUSFORDERUNGEN	41
LITERATURVERZEICHNIS.....	45

Abkürzungsverzeichnis

CGH	Comparative genomic hybridization
CNV	Copy Number Variation
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA	Deoxyribonucleic acid
HPO	The Human Phenotype Ontology
INDEL	Small insertions and deletions
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
NICU	Neonatal Intensive Care Unit
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Polymerase chain reaction
PICU	Paediatric Intensive Care Unit
SNV/SNP	Single Nukleotid Variante/Polymorphismus
WES	Whole-Exome-Sequencing
WGS	Whole-Genome-Sequencing

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Genomic testing strategies and clinical heterogeneity (11)	11
Abbildung 2 NGS in pädiatrischen Populationen (2)	22
Abbildung 3 NGS in pädiatrischen Populationen II (2)	23
Abbildung 4 NGS in pädiatrischen Populationen III	24
Abbildung 5 Test-Algorithmus: Empfehlung zur genetischen Testung in der Neonatologie	29

1 Einleitung

Bereits seit den 1960er Jahren sind genetische Testungen im Gesundheitssystem im Einsatz. Zu Beginn noch in Form reiner Chromosomenanalysen durch das Mikroskop, haben sich die Technologien heute bis hin zur Sequenzierung eines gesamten Genoms entwickelt. Diese ist durch die stetig sinkenden Kosten und verkürzte Dauer im medizinischen Alltag immer präsenter. (1) (2)

Genetische Erkrankungen, welche sich bereits in der frühen Neonatalperiode klinisch präsentieren, machen einen signifikanten Anteil neonataler Krankheitsbilder und neonataler Mortalität aus. In den USA werden kongenitale Anomalien als häufigste Ursache für neonatale Morbidität und Mortalität beschrieben. Diese manifestieren sich oft bereits pränatal und werden durch Ultraschalluntersuchungen detektiert, doch manche präsentieren sich erst postnatal in den ersten Lebensstunden und -tagen. Sie reichen von milden bis hin zu schweren Fehlbildungen und internistischen Krankheitsbildern, welche intensivmedizinisch behandelt werden müssen. (3) (4)

Doch nicht nur kongenitale strukturelle Anomalien bedürfen meist einer neonatologisch-intensivmedizinischen Behandlung, auch schwere systemische Erkrankungen eines oder mehrerer Organsysteme sind Ursache für die notwendige Behandlung von Neugeborenen. Sie haben einen wesentlichen Einfluss auf die Morbidität als auch Mortalität der Kinder. Eine korrekte und frühzeitige Diagnosestellung stellt sich meist als schwierig dar, da das Krankheitsbild klinisch noch nicht vollständig ausgeprägt sein kann oder aufgrund der Unreife beziehungsweise der Frühgeburtlichkeit ein eindeutiger klinischer Hinweis auf ein Syndrom oder eine Erkrankung fehlen kann. (5) (2)

Eine frühe Diagnosestellung ist jedoch wegweisend, sowohl für korrekte therapeutische als auch präventive Maßnahmen. Zusätzlich kann eine frühzeitige Diagnose über die Präzisionsmedizin das Outcome der betroffenen Kinder deutlich verbessern.

Wurde in der Vergangenheit aus Kostengründen, der langen Dauer zwischen Probenentnahme und Befundübermittlung sowie dem fraglichen Nutzen einer genetisch bestätigten Diagnose auf genetische Testungen in der Neonatologie

oftmals verzichtet, weiß man heute entsprechend der aktuellen Datenlage, dass genetische Tests in vielen Fällen die Ursache für neonatale Missbildungen oder Krankheiten herausfinden können. Vor allem da sich in den letzten Jahrzehnten die Dauer bis zur Befundübermittlung der genetischen Testungen wesentlich verkürzt hat. Doch nicht nur durch die Verminderung der Dauer und Kosten genetischer Tests, auch durch die technologischen Erneuerungen nehmen genetische Testungen einen immer wichtigeren Stellenwert in der Klinik ein. (2)

Das Next-Generation-Sequencing, genauer bezeichnet das Whole-Genome-Sequencing beziehungsweise das Whole-Exome-Sequencing, wird inzwischen sogar von vielen Experten als Diagnostik der Wahl bei Verdacht auf (mono-)genetische Erkrankungen in der neonatologischen Intensivmedizin empfohlen. Doch wie oft eine solche Diagnostik auch zum Auffinden einer kausalen Variante beiträgt, wird laut der Datenlage sehr variabel angegeben. Insbesondere da der Nachweis einer Variante, auch wenn als pathogen oder wahrscheinlich pathogen beschrieben, nicht zwangsläufig kausal ist. Der kausale Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp bleibt oftmals hypothetisch und ist abhängig von entsprechenden Nachweisen in der Literatur. (6)

Doch stellen sich bei der inzwischen weitreichenden genetischen Diagnostik mittels WGS auch ethische Fragestellungen, wie man beispielsweise mit dem Nachweis einer Variante unklarer Signifikanz umgehen sollte. Weiters muss bedacht werden, dass bei weitreichenden genetischen Tests ein Nachweis genetischer Erkrankungen mit Erkrankungsbeginn im späteren Leben der Kinder gefunden werden könnten. Ebenso kann eine mögliche Anlageträgerschaft verschiedener Erbkrankheiten beim betroffenen Kind nachweisbar sein, welche das weitere Leben des Kindes dauerhaft beeinflussen würde. (6)

Obwohl durch das Neugeborenen-Screening in Österreich bereits seit den Sechzigerjahren alle Neugeborene auf zum Großteil seltene angeborene Erkrankungen nach der Geburt getestet werden, sind doch viele Krankheitsbilder und krankheitsverursachende genetische Veränderungen durch diese Testung noch nicht abgedeckt. Daher steht der Nutzen der neuen Technologien wie einer vollständigen Genomsequenzierung als neue Form des Neugeborenen-Screenings zur Diskussion. (7)

2 Indikationen

Eine stationäre Aufnahme an einer neonatologischen Intensivstation hat zahlreiche Indikationen. Der Großteil stellt nicht wie oftmals vermutet eine Frühgeburtlichkeit dar, in vielen Fällen zeigen die Neugeborenen eine perinatale Erkrankung unklarer Ätiologie oder eine oder mehrere strukturelle Fehlbildungen, welche einen Aufenthalt an einer Intensivstation bedürfen. Rund sechs Prozent aller Geburten zeigen eine genetische Grunderkrankung oder angeborene Fehlbildungen. (8) (9)

Insbesondere monogenetische Erkrankungen, welche durch Veränderungen beziehungsweise Varianten in einzelnen Genen verursacht werden, stellen in der Neonatalperiode einen großen Anteil und Impact an genetisch bedingten Auffälligkeiten dar. Obwohl die meisten monogenetischen Erkrankungen selten sind, ist das Auftreten einer solchen jedoch häufig, da inzwischen bereits über 3000 monogenetische Erkrankungen bekannt sind. Monogenetische Erkrankungen können durch NGS besonders effektiv nachgewiesen werden. (10)

Seltene Erkrankungen sind definiert als Erkrankungen, welche weniger als eine Person von 2000 betreffen. Diese sind jedoch laut der Datenlage in der neonatologischen als auch pädiatrischen Intensivmedizin häufig, betreffen sie doch rund sechs Prozent der Bevölkerung. Seltene Erkrankungen sind in 80 Prozent der Fälle einer genetischen Ursache zuzuschreiben und präsentieren sich in einem Großteil der Fälle bereits im Kindesalter und sind für einen signifikanten Anteil der neonatologischen und pädiatrischen Intensivaufenthalte ursächlich. Seltene Erkrankungen sind in 35 Prozent die Ursache für die Mortalität im ersten Lebensjahr. (11)

Die besondere Herausforderung der genetischen Diagnostik in der Neonatologie stellt der klinisch meist noch nicht voll ausgeprägte Phänotyp dar, der es ÄrztInnen oftmals erschwert eine korrekte Verdachtsdiagnose zu stellen. Hinzu kommt die Frühgeburtlichkeit mancher Kinder als auch die genetische Heterogenität. Selbst wenn eine genetische Ursache für das klinische Zustandsbild vermutet wird, ist durch die intrinsische Heterogenität das Auffinden einer kausalen Mutation beziehungsweise passender Kandidatengene erschwert. (8)

In vorliegenden Daten zu genetischer Diagnostik in der Neonatologie wurden vor allem Neugeborene mit strukturellen Anomalien, wie zum Beispiel angeborener

Herzfehler, Neuralrohrdefekte oder Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, einer genetischen Untersuchung unterzogen. Doch nicht nur strukturelle Malformationen auch internistische Auffälligkeiten können KlinikerInnen an eine genetische Ursache denken lassen. Metabolische Auffälligkeiten können hierbei vor allem greifend werden, wie beispielsweise eine Laktatazidose oder erhöhte Ammoniak Werte im Blut. Weiters könnte bei neurologischen Auffälligkeiten wie Krampfanfällen, muskulärer Hypotonien oder Malformationen eine genetische Grunderkrankung ursächlich sein. Zusätzlich sollte insbesondere bei Versagen eines oder sogar mehrerer Organsysteme ohne klinische Erklärung im Neugeborenenalter an eine genetische Ursache gedacht werden. (2) (6) (8)

Bereits seit vielen Jahrzehnten zählen die Karyotypisierung und Microarray-Untersuchungen zur genetischen Basisdiagnostik, auch im Bereich der Neonatologie haben sich diese bereits etabliert. Neuere, weitreichendere Technologien, wie beispielsweise ein Whole-Genome-Sequencing und ein Whole-Exome-Sequencing, stehen nun immer mehr im Mittelpunkt der genetischen Diagnostik und kommen dank stetig wachsendem Forschungsstand nun auch im Bereich der neonatologischen Intensivmedizin zum Einsatz. Denn eine frühzeitige Diagnosestellung kann das Outcome der Kinder signifikant verbessern.

Ob NGS dazu einen adäquaten Beitrag leisten kann, um mit einer korrekten, anderweitig nicht stellbaren Diagnose zu einer Adaption der Therapie und somit zu einem verbesserten Outcome führen kann, wird kontrovers diskutiert. (2) (12)

3 Inzidenz

„Weltweit sterben jedes Jahr schätzungsweise 295.000 Neugeborene vor Erreichen der 4. Lebenswoche an angeborenen Anomalien und damit verbundenen Komplikationen.“ (13)

Diese durch die WHO im Jahr 2010 beobachtete Anzahl kongenitaler Anomalien, welche sich in einem veränderten Genotyp, Phänotyp oder in beidem äußern können, kann sowohl durch Teratogene, Infektionen, sozioökonomisch als auch genetisch bedingt sein. Jedoch scheint der Anteil an genetisch bedingten Anomalien bis dato unklar zu sein. Zum Teil bleiben viele angeborene Anomalien auch

idiopathisch. Die Folgen dieser angeborenen Anomalien können von leicht bis schwerwiegend reichen und sind eine Gruppe sehr heterogener klinischer Erkrankungsbilder. (13)

Genetische Erkrankungen machen einen hohen Anteil an neonataler Morbidität und Mortalität aus. Daten aus Europa belegen eine Prävalenz angeborener Malformationen von fast drei Prozent, wovon rund 15 Prozent einer genetischen Ursache zuzuschreiben waren. (4)

Eine Studie aus den USA zwischen den Jahren 2011 und 2017 zeigt eine Inzidenz von 22 Prozent an genetischen Erkrankungen, welche für die Mortalität von Neugeborenen und Säuglingen im ersten Lebensjahr verantwortlich waren. (14)

Das Baby-Seq Projekt konnte eine Inzidenz von genetischen Grunderkrankungen mittels Whole-Exome-Sequencing scheinbar gesunder Säuglinge in mehr als neun Prozent der Fälle nachweisen. (15)

4 Technologien

Für viele Jahrzehnte war die Zytogenetik der diagnostische Schritt der Wahl, insbesondere bei angeborenen Fehlbildungen. Durch die rasche Weiterentwicklung genetischer Testungen ist es im Jahr 2022 an der Stanford Universität möglich geworden ein Genom eines Patienten in unglaublichen fünf Stunden und zwei Minuten zu sequenzieren wie Gorzynski et al. publizierten. Dies führte sogar zu einem Eintrag in das Guinness-Buch der Rekorde. Anders als beim klassischen NGS, wobei kurze DNA-Fragmente sequenziert werden, wurden hierbei durch Long-Read Sequenzierung längere DNA-Abschnitte, aus Zehntausenden Basenpaaren, bewahrt und sequenziert. Durch die von Pacific Biosciences und Oxford Nanopore vertriebene Sequenzieretechnologie können bis mehrere hundert Kilo-Basenpaare an Reads sequenziert werden. Dadurch können diese anschließend leichter zusammengesetzt werden. Klarer Vorteil ist hierbei die Abdeckung von Guanin/Cytosin-reichen Regionen und die komplette Sequenzierung von gewünschten Zielregionen. (16)

4.1 Zytogenetik

Für viele Jahrzehnte war die Zytogenetik die Standarduntersuchung der Wahl bei klinischen Hinweisen auf genetische Erkrankungen. Die Chromosomenanalyse war und ist nach wie vor ein wichtiger Bestandteil der genetischen Diagnostik und stellt oftmals den ersten diagnostischen Schritt dar. Sie zeigt vor allem strukturelle und numerische Chromosomenabberationen sowie Aneuploidien auf. (17)

Zu Beginn durch Färbemethoden dargestellte Chromosomen im Karyogramm, hat sich die zytogenetische Diagnostik in den letzten Jahrzehnten durch Steigerung des Auflösungsvermögens jedoch deutlich verbessert. Dies gelang vor allem durch die Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung und in Folge durch die Comparative genomic hybridization. Insbesondere strukturelle Chromosomenabberationen wie Mikrodeletionen konnten so nun einfacher identifiziert werden. (18)

Durch die FISH-Diagnostik konnte molekularzytogenetisch die farbige Darstellung ausgewählter Abschnitte eines beziehungsweise mehrerer Chromosomen in der Metaphase erfolgen. Damit ist sie eine sehr sensitive und vor allem wenig zeitintensive diagnostische Methode und kann sowohl strukturelle als auch numerische Chromosomenabberationen detektieren. (18)

Insbesondere die Array-CGH nimmt nach wie vor einen großen Stellenwert in der Diagnostik beispielsweise von Dysmorphiesyndromen oder bei globaler Entwicklungsverzögerung ein. Hierbei wird die Intensität zweier mit Fluoreszenzfarbstoffen markierter Desoxyribonukleinsäure-Fragmente miteinander verglichen. Bei der Array-CGH erfolgt die Hybridisierung einer PatientInnen-DNA und einer Kontroll-DNA auf einem sogenannten Microarray. Durch diese Methode können Kopienzahlveränderungen mit einer Größe von 50 bis 100.000 Basenpaaren leicht nachgewiesen werden, welche aufgrund ihrer Größe in der konventionellen Zytogenetik nicht darstellbar wären. Seit vielen Jahren ist diese die Diagnostik der Wahl für PatientInnen mit multiplen kongenitalen Anomalien und Dysmorphien, globaler Entwicklungsretardierung und Intelligenzminderung. (2)

Nachteil dieser schnellen und vergleichsweise kostengünstigeren Untersuchungsmethode ist, dass hierbei kleine Einzelnukleotid-Polymorphismen, kleine Deletionen und Insertionen sowie kleinere Kopienzahlvarianten nicht detektiert werden können. (19)

4.2 Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung, auch Kettenabbruchsynthese genannt, gilt nach wie vor als Goldstandard in der DNA-Sequenzierung.

Heute noch als Rückgrat der Gendiagnostik ist die Sanger-Sequenzierung, welche auf einer Enzymreaktion basiert, nach wie vor im Einsatz. Dem in Folge einer DNA-Denaturierung vorliegende DNA-Einzelstrang wird ein Primer angelagert und durch die DNA-Polymerase wird der Doppelstrang komplementär synthetisiert. Es werden nun vier grundsätzlich idente Sequenzieransätze gebildet, wobei jeweils eine der vier Basen als Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) hinzugefügt wird. Die ddNTP's enthalten keine 3'-Hydroxylgruppe. Da aus diesem Grund keine Verknüpfung an das nächste anzulagernde Nukleotid erfolgen kann, kommt es zum Kettenabbruch. So entstehen in Folge viele DNA-Stränge unterschiedlicher Länge mit jeweils demselben ddNTP am Ende. Durch die nachfolgende Gel-Elektrophorese werden die vorliegenden Fragmente der Länge nach aufgeteilt. Meist sind die Primer radioaktiv markiert, um die Sichtbarkeit herzustellen. (17) (18)

4.3 NGS- Next Generation Sequencing

Unter NGS versteht man das sogenannte Next-Generation-Sequencing, eine Gruppe von neuen diagnostischen Technologien in der genetischen Testung. Im Gegensatz zur Sanger Sequenzierung, welche auf der Analyse einzelner Fragmente nacheinander beruht, erfolgt beim NGS die Parallelsequenzierung kurzer DNA-Fragmente. Anschließend können die Reads durch moderne Computersoftware in Sequenzen umgeschrieben werden. So konnten große Gene beziehungsweise ganze Gen-Panels in wesentlich kürzerer Zeit sequenziert werden. (1)

Durch die Einführung dieser Methoden konnte die Anzahl der sequenzierten DNA-Abschnitte massiv erhöht werden. NGS ermöglichte nicht nur eine klonale Sequenzierung, sondern auch durch parallele Sequenzierung einen wesentlichen Fortschritt in Dauer und Sensitivität der Diagnostik. Zudem ist durch diese Methoden die Sequenzierung sowohl des gesamten Genoms einer PatientIn als auch von

Genabschnitten, wie beispielsweise Exons, möglich. Diese Untersuchung ist jedoch meist nach wie vor mit einem hohen Kosten- und Zeitaufwand verbunden. (2) (17)

4.3.1 Gen-Panels

Gen-Panels sind eine Art der genetischen Testung, bei welcher auf eine genauestens zuvor festgelegte Gruppe an Genen getestet wird, welche mit der klinische Verdachtsdiagnose assoziiert sind. Diese können wenige einzelne oder auch viele hunderte Gene umfassen und werden durch die Recherche für das Krankheitsbild relevanter Gene aus Datenbanken und der Literatur erstellt. Diese werden in Folge in ein laborbasiertes Genkit eingeschlossen. Diese bilden die Grundlage eines virtuellen Genpanels, welche für die Daten aus WGS oder WES herangezogen werden können. (11) (18)

Diese seit vielen Jahren im Einsatz stehende genetische Diagnostik ist durch das geringere Datenvolumen und durch die Vermeidung von Nebenbefunden gekennzeichnet. Sie stellt die derzeit sicherste Methode der NGS Diagnostik dar. Zusätzlich sind Gen-Panels im Vergleich zu einer gesamten Genomsequenzierung mit wesentlich niedrigeren Kosten und vermindertem Aufwand verbunden. Natürlich müssen auch Gen-Panels einer regelmäßigen Evaluierung unterzogen werden, da stetig neue krankheitsverursachende Gene und Varianten identifiziert werden. Limitiert wird diese diagnostische Methode insbesondere durch die fehlenden Loci, welche durch das klinische Zustandsbild zunächst nicht in Betracht gezogen werden. (18)

4.3.2 WES (Whole-Exome-Sequencing)

Das Whole-Exome-Sequencing ist eine inzwischen weit verbreitete und vielgenutzte Methode des NGS, insbesondere durch die inzwischen doch überschaubaren Kosten und durch vorgefertigte Anreicherungs-Kits. Beim Whole-Exome-Sequencing wird das Exom einer ProbandIn, also sämtliche protein-kodierende Abschnitte von Genen, sequenziert, wenn auch nicht hundert Prozent des Exoms abgedeckt werden kann. Obwohl es nur einen Bruchteil des

menschlichen Genoms einnimmt, liegt hier die Mehrzahl krankheitsverursachender Veränderungen. Daten belegen, dass das Exom etwa ein Prozent der DNA ausmacht und Veränderungen dabei für über 90 Prozent der genetischen Erkrankungen ursächlich sind. Durch WES lässt sich jedoch ein signifikanter Anteil genetischer Ursachen für Krankheitsbilder nicht nachweisen, wie beispielsweise einige strukturelle Varianten und Kopienzahlvarianten (CNV's), Translokationen oder Veränderungen im mitochondrialen Genom. Ebenso kann entsprechend die nicht-kodierende Region des Genoms, das Intron, nicht dargestellt werden. Inzwischen ist es möglich ein WES in weniger als 3 Tagen abzuschließen. (2) (17) (18)

4.3.3 Rapid- WES und Rapid- WGS

In den letzten Jahren konnten sowohl das WGS als auch das WES weiterentwickelt werden, insbesondere in Hinblick auf die bis dato doch lange Dauer zwischen Probenentnahme und Diagnoseübermittlung. Das sogenannte Rapid-WGS und Rapid-WES soll diese Dauer auf wenige Tage bis sogar Stunden verkürzen. Bei Rapid-WES werden zwei Prozent des Genoms, so gut wie alle bekannten Exons, und Rapid-WGS circa 90 Prozent des Genoms untersucht. Daten belegen, dass insbesondere bei kritisch kranken Neugeborenen mit Verdacht auf eine genetische Ursache des Krankheitsbildes diese Art der genetischen Diagnostik aufgrund der verkürzten Dauer von Vorteil ist. (20)

4.3.4 WGS (Whole-Genome-Sequencing)

Durch das Whole-Genome-Sequencing ist es als Teil des NGS gelungen das gesamte menschliche Genom zu entschlüsseln. Hierbei werden alle Nukleotidsequenzen von sämtlichen Chromosomen des Menschen sequenziert und in Folge durch verschiedene Informatiksysteme analysiert. Vorteil dieser Methode ist der unglaublich hohe Datensatz in verhältnismäßig kurzer Zeit.

Nachteile sind die hohen Kosten, die lange Dauer der Sequenzierung als auch das Auftreten vieler Varianten unklarer Signifikanz. Obwohl Berichte und Daten zeigen, dass WGS durchaus in wenigen Stunden durchgeführt werden kann, ist in der

Praxis doch die Zeit zwischen Untersuchungseinleitung und Diagnoseübermittlung weitaus länger. (2) (17)

4.4 Trio- genomic Sequencing

Kongenitale Erkrankungen sind oftmals durch de-novo Mutationen verursacht. Ohne das Next-Generation-Sequencing war es früher meist kaum oder nicht möglich bei nicht eindeutigen klinischen Erkrankungsbildern die ursächliche Variante festzustellen. (1)

Zur weiteren Interpretation durch NGS gefundener Varianten ist es möglich die Kindseltern miteinzubeziehen. Hierbei werden auch die Eltern auf die gefundene Variante untersucht, um so ein Vererbungsmuster erkennen zu können oder auf die Segregation schließen zu können. Diese Form der Analyse wird als Trio-Analyse bezeichnet und hilft die Pathogenität von Varianten zu verstehen. Dennoch muss bedacht werden, dass auch hierbei meist nicht nur eine abweichende Variante gefunden wird, sondern meist multiple. Es ist somit eine weitere Aufgabe das passende Kandidatengen zu identifizieren. (1)

Um de-novo Varianten identifizieren zu können ist die Trio-Sequenzierung die Methode der Wahl, da die gefundene Variante des Kindes bei den nicht betroffenen Eltern fehlt und somit den Verdacht auf eine de-novo Variante und dessen Pathogenität unterstützt. (10)

Die Trio-Analyse kann auch für die Diagnose von rezessiven Erkrankungen herangezogen werden, wobei Eltern Träger einer Erkrankung sind und das Kind in Folge homozygoter Erkrankter wäre. (1)

Vorliegende Daten zeigen, dass eine signifikant höhere Rate an Diagnosen mit Trio-Analyse im Vergleich zu einer Single- Analyse, wo nur die genetischen Daten der PatientIn erhoben werden, gefunden werden konnten. Dem gegenüber stehen die damit verbundenen höheren Kosten. (21)

Die RAPIDOMICS Studie aus Kanada zeigte in einer Trio-basierten Analyse von 25 Kindern an der Neonatologie mit Verdacht auf eine genetische Ursache ihrer klinischen Auffälligkeiten, dass 60 Prozent der Kinder durch *Rapid- Trio- ES* innerhalb einer Woche eine Diagnose erhielten. (8)



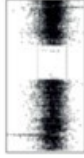
a	Light microscope	G-banded karyotype	Microarray	Whole-exome sequence	Whole-genome sequence
Appearance				CGGATGATTACCCGTT G.....GCTC TAGCTAGCTATA....	CGGATGATTACCCGTT GATATAGCTCTCGCTC GCTCTAGCTAGCTATA GGCTATGGGTGGGGGC
Resolution	Entire chromosome	5–10 Mb	50–100 kb	1 bp	1 bp
Number of loci probed	N/A	~500	~0.05–2 million	~50 million	3 billion
Variants detected	Aneuploidy, polyploidy	Variants >5 Mb	Copy number variants	Coding regions	Majority of variants
Variants per person	0 or 1	0 or 1	10–100s	~20,000	4–5 million
Diagnostic yield	Low	—————→			High
Incidental findings	Low	—————→			High

Abbildung 1 Genomic testing strategies and clinical heterogeneity (11)

Abb.1: “Genome-wide assays used in clinical genetics have developed from traditional methods for visualizing chromosomes using a light microscope to assaying copy number variation across the genome and to sequencing the entire genome. As the resolution of the test increases, the number of detectable variants also increases. Although this increase in the number of variants leads to an increase in diagnostic yield across a range of conditions, it also substantially increases the likelihood of detecting incidental findings and variants of uncertain clinical significance.” (11)

5 Genetische Teststrategien in der neonatologischen Intensivmedizin

Einige Studien sehen das NGS mit seinen Technologien als empfohlene diagnostische Testung erster Wahl bei Neugeborenen mit Verdacht auf eine monogenetische Erkrankung. (2) (8) (19)

Vorteile einer genetischen Diagnostik können im Langzeit Management der Kinder liegen, da dadurch erkrankungsspezifische Therapien, Medikamente oder sogar Diäten eingeleitet beziehungsweise adaptiert werden können. Eine entsprechende spezialisierte Abteilung und ärztliche sowie pflegerische Betreuung kann eingeleitet werden, um so den Kindern die bestmögliche Betreuung zukommen zu lassen. Im Gegensatz dazu kann eine genetisch bestätigte Diagnose auch zur Beendigung einer (intensiv-) medizinischen Behandlung führen oder unnötige Untersuchungen und Therapien vermeiden und zur früheren Einleitung einer palliativen Situation führen. Da genetische Erkrankungen eine der Hauptursachen für neonatale Mortalität darstellen, ist die frühzeitige Diagnose für das Outcome und die weiteren therapeutischen Maßnahmen essenziell und dauert bis dato meist noch zu lange. (2) (9)

Die besondere Herausforderung in der neonatologischen Intensivmedizin ist es zunächst eine Verdachtsdiagnose stellen zu können. Viele monogenetische Erkrankungen zeigen in der frühen Lebensperiode keine der bekannten Hauptsymptome. Zusätzlich sind die Gründe für eine neonatologische intensivmedizinische Betreuung oft multifaktoriell und selten rein durch kongenitale Anomalien bedingt. Vorliegende Daten sehen vor allem bei neurologischen Symptomen wie Krampfanfällen, neuromuskulären oder metabolischen Auffälligkeiten einen Nutzen in der genetischen Diagnostik. (6) (22)

Doch muss man hinterfragen, wie oft es dabei tatsächlich zum Nachweis einer bekannt pathogenen Variante kommt und nicht zu teils multiplen Varianten mit unklarer Signifikanz. Zusätzlich stellt sich die Frage, sollte eine bekannt pathogene Variante nachgewiesen werden können, inwieweit ist diese ursächlich für die klinischen Auffälligkeiten beziehungsweise die Erkrankung des Kindes?

5.1 Datenlage

5.1.1 Whole-Exome-Sequencing

Whole-Exome-Sequencing wurde bereits zu Beginn des zweiten Jahrzehnts in der Pädiatrie und insbesondere der Neonatologie klinisch etabliert. Durch die rasche Diagnostik und die rasche Sequenzierung zahlreicher Gene hat sich das WES durchgesetzt. Inzwischen gibt es daher zahlreiche klinische Studien zum Einsatz des Whole-Exome-Sequencing in der neonatologischen Intensivmedizin. (2) (23)

In einer frühen prospektiven Arbeit aus dem Jahr 2015 von Stark et al. konnte eine diagnostische Rate von über 57 Prozent für Kinder mit Verdacht auf monogenetische Erkrankung im Alter von null bis zwei Jahren, welche klinisch multiple kongenitale Anomalien und Dysmorphien zeigten, erzielt werden. Single Whole-Exome-Sequencing wurde hierbei durchgeführt und führte in Folge in 32,6 Prozent zu einer Änderung im klinischen Management der Kinder. (24)

Ähnlich konnte 2017 retrospektiv von 66 Kindern der Neonatologie mit klinischem Verdacht auf eine monogenetische Erkrankung durch Exom-Sequenzierung in 25 PatientInnen eine relevante Diagnose gestellt werden. Dies entspricht einer diagnostischen Rate von 37,9 Prozent, mit einer medianen Diagnostikdauer von acht Tagen. (25)

Wie Meng et al. in einer 5-Jahres-Periode ab 2011 zeigten, wurden 278 Kinder in den ersten 100 Lebenstagen in einem Krankenhaus in Texas in eine Studie zur Diagnostik mittels Exom-Sequenzierung nach Evaluation durch eine GenetikerIn eingeschlossen. Es erfolgte zunächst die Single-Exom Analyse, in Folge, sobald diese zugänglich war, die Trio-Exom-Sequenzierung und schließlich auch die Rapid-Exom-Sequenzierung. Insgesamt konnte in 102 Kindern eine kausale pathogene oder wahrscheinlich pathogene Variante entsprechend dem klinischen Phänotyp aufgezeigt werden. Dies entspricht einer diagnostischen Rate von über 36 Prozent, wobei die Trio-Exomanalyse in Bezug auf Dauer, diagnostischer Rate und Einfluss auf das klinische Management der Single-Analyse signifikant überlegen war. Insgesamt wurde das klinische Management in 52 Prozent der eingeschlossenen Fälle adaptiert. (26)

Auch in Taiwan konnte mittels Standard Whole-Exome-Sequencing an einer pädiatrischen Intensivstation eine diagnostische Rate von über 52 Prozent erzielt werden. Die eingeschlossenen ProbandInnen zeigten klinisch den Verdacht auf eine genetische Grunderkrankung und es wurden in der Diagnostik rund 50.000 bis 100.000 Varianten gefunden. (27)

Mittels Ultra-Rapid-Trio-WES konnten Wang et al. im Jahr 2020 eine diagnostische Rate von fast 70 Prozent erzielen. Die Testung erfolgte innerhalb von nur 24 Stunden und konnte in 23 der 33 eingeschlossenen ProbandInnen der NICU und PICU mit Verdacht auf eine genetische Erkrankung eine Diagnose erbringen. (28)

Eine prospektive Studie aus Australien aus dem Jahr 2020 analysierte einhundert kritisch kranke Kinder aus zwölf verschiedenen australischen neonatologischen sowie pädiatrischen Intensivstationen mit klinischem Verdacht auf eine monogenetische Erkrankung. Die Diagnostik erfolgte mittels Trio-Ultra-Rapid-Exom-Sequencing. Die mediane Zeit von Probengewinnung bis zur Übermittlung der Ergebnisse waren nur drei Tage. Die Diagnostik mittels Whole-Exome-Sequencing wurde durch Ansätze erweitert, wie beispielsweise mitochondriale Genomsequenzierung, zusätzliche Phänotypisierung und Nutzung von internationalen Datenbanken für neue Assoziationen zwischen dem sequenzierten Genotyp und dem klinischen Phänotyp. Es konnte hierbei eine diagnostische Rate von 51 Prozent erzielt werden. In 76 Prozent aller PatientInnen mit molekularer Diagnose und auch in elf Prozent aller eingeschlossenen ProbandInnen ohne Diagnosebefund führte die genetische Diagnostik zu einer Veränderung im klinischen Management. (29)

Im Rahmen des Rapid-Inpatient-Genomic-Testing (RIGHT) Programms aus Großbritannien wurde eine Studie etabliert, welche Rapid-Whole-Exome-Sequencing an kritisch kranken Kindern anwendete, die klinisch den Verdacht auf eine monogenetische Erkrankung zeigten. Eingeschlossen wurden Kinder, welche nach Ansicht einer GenetikerIn geeignet waren und einen Verdacht auf monogenetische Erkrankung hatten und vermutlich klinisch von einer raschen genetischen Diagnose profitieren würden. Von den eingeschlossenen 46 kritisch kranken Kindern erhielten 20, entsprechend 43 Prozent, eine molekulare Diagnose. In 52 Prozent der Kinder hatte die Diagnostik eine Änderung des klinischen Managements zur Folge. (30)

Die RAPIDOMICS-Studie aus Kanada zeigte mittels Trio-basiertem Exome-Sequencing, mit restriktiv auf rein OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) bekannten krankheitsverursachenden eingeschlossenen Genen, nach Validierung mittels Sanger-Sequenzierung, eine diagnostische Rate von 60 Prozent. Eingeschlossene PatientInnen zeigten klinische Auffälligkeiten wie Krampfanfälle unklarer Ursache, multiple Malformationen, metabolische oder neurologische Symptome mit Verdacht auf eine genetische Ätiologie. PatientInnen mit Verdacht auf eine Chromosomenabberation wurden nur nach Vorliegen einer negativen Array-Untersuchung eingeschlossen. Die vorläufigen Befunde konnten dank Rapid-ES innerhalb von einer Woche übermittelt werden, was einen deutlichen Vorteil gegenüber Standard-ES mit einer durchschnittlichen Dauer von über 50 Tagen zeigte. (8)

Das Baby-Seq Projekt aus Boston beschreibt eine prospektive Studie mit 159 Neugeborenen, wobei sowohl gesunde als auch kranke Neugeborene der neonatologischen Intensivstation in zwei Gruppen unterteilt und so entweder eine Standard-Diagnostik sowie das standardisierte Neugeborenen-Screening unterzogen wurden oder eine Genomsequenzierung erhielten. In der Datenanalyse erkrankter Neugeborener der neonatologischen Intensivstation, welche jedoch nicht vorab auf den Verdacht einer genetischen Erkrankung selektiert wurden, konnte dennoch mittels Whole-Exome-Sequencing kein Nachweis einer Erkrankung beziehungsweise einer kausalen Variante für die jeweilige Indikation erfolgen, was sich durch die Randomisierung und Single-Analyse erklären ließe. Zusätzlich wäre hierbei die Diagnostik von de-novo Mutationen nicht möglich gewesen und es wurden rein Phänotyp-assoziierte Gen-Panels in die Diagnostik inkludiert. Durch WES ließ sich jedoch in rund 10 Prozent der Fälle ein Risiko für die Entwicklung eines Krankheitsbildes im Kindesalter und in rund vier Prozent der Fälle ein Risiko für die Entwicklung eines Krankheitsbildes im Erwachsenenalter nachweisen. Ein positiver Trägerstatus für rezessive Erkrankungen konnte jedoch in über 80 Prozent der hierbei einbezogenen Fälle nachgewiesen werden. (15)

Chinesische Daten aus Hongkong aus dem Jahr 2020 zeigten, wie Rapid-Whole-Exome-Sequencing in der Diagnostik pädiatrischer IntensivpatientInnen eingesetzt werden kann. Rund 102 Familien mit Kindern welche vermutlich eine monogenetische Grunderkrankung hatten wurden in die Trio-basierte Analyse

miteinbezogen. Es konnte eine diagnostische Rate von 31 Prozent erreicht werden, die mediane Dauer von Probengewinnung bis Befundübermittlung lag bei elf Tagen. Klinischen Impact hatte die Diagnostik in 88 Prozent aller ProbandInnen. (31)

Eine große chinesische Studie aus dem Jahr 2021 mit einer Kohorte von über 2300 Neugeborenen mit kraniofazialen Deformitäten, Anomalien des ZNS, kardiovaskulären, intestinalen, skelettalen und urogenitalen Malformationen, Infektionen, hämatologischen Auffälligkeiten sowie mit Hinweisen auf metabolische Erkrankungen, zeigte eine Diagnoserate mittels Exom-Sequenzierung von über 2700 Genen, welche für eine monogenetische Erkrankung ursächlich sind, von über zwölf Prozent. In diesen zwölf Prozent erbrachte NGS eine bekannt pathogene oder vermutlich pathogene Variante zur Darstellung, welche als ursächlich für das klinische Zustandsbild der Kinder bezeichnet wurde. Rund 190 der 284 Neugeborenen, welchen mittels NGS eine Diagnose gestellt werden konnte, zeigten Single-Nukleotid-Polymorphismen beziehungsweise kleinen Insertionen oder Deletionen (Indels). Dreiundneunzig der eingeschlossenen PatientInnen zeigten eine Aneuploidie oder Kopienzahlvariante, kausal für den Phänotyp. Ein Neugeborenes zeigte sowohl eine pathogene strukturelle als auch Kopienzahlvariante. Sie beschreiben daraus resultierend einen Benefit der pädiatrischen Versorgung und Pflege beziehungsweise Adaption der Therapie in fast 50 Prozent der Fälle. (22)

5.1.2 Whole-Genome-Sequencing

Whole-Genome-Sequencing ist wie bereits beschrieben eine aufkommende Methode zur frühzeitigen Diagnose kritisch kranker Kinder der neonatologischen und pädiatrischen Intensivstation. Die diagnostische Rate wird hierbei sehr variabel angegeben. In den USA konnte beispielsweise durch Rapid-WGS mit gezielter phänotypassoziierter Analyse eine diagnostische Rate von 45 Prozent (17 von 38 kritisch kranken Kindern) erzielt werden. (32)

Clark et al. haben, trotz einer sehr kleinen Studienpopulation von sieben akut kranken Kindern, im Jahr 2019 eine diagnostische Rate durch Trio-Genomsequenzierung mit automatisierter Phänotypisierung und Interpretation, von

43 Prozent nachgewiesen, eine Adaption des klinischen Managements erfolgte bei allen diagnostizierten und bei 43 Prozent aller getesteten Kindern. Der Median der Dauer von Probengewinnung bis zur Diagnoseübermittlung belief sich auf nur zwanzig Stunden. (33)

Auch in Großbritannien konnte im Jahr 2018 mittels Trio-WGS in 24 kritisch kranken Kindern der pädiatrischen Intensivstation (medianes Alter 15,86 Monate), welche den Verdacht einer zugrundeliegenden monogenetischen Erkrankung erbrachten, eine diagnostische Rate kausaler Varianten von 42 Prozent erzielt werden. (34)

Willig et al. berichten von 35 intensivpflichtigen ProbandInnen, welche aufgrund einer durch eine NeonatologIn gestellten Verdacht auf eine genetische Erkrankung, sowohl mit standardisierten genetischen Testverfahren als auch mit Trio-Rapid-Whole-Genome-Sequencing getestet wurden. Bei dieser Methode wurden beinahe alle Gene bekannter monogenetischer Erkrankungen innerhalb von rund 50 Stunden mit Rapid-WGS getestet. Rund 20 dieser 35 getesteten Säuglinge erhielten dadurch eine Diagnose, welche mittels Sanger Sequenzierung bestätigt wurde. Dies entspricht einer Diagnostikrate von 57 Prozent der eingeschlossenen PatientInnen. Achtzehn der eingeschlossenen PatientInnen davon konnten mit Standardtestungen nicht identifiziert werden, neun erhielten eine Diagnose, welche vorab klinisch nicht im Verdacht stand. Die Ergebnisse berichten von einer signifikant höheren Diagnostikrate mittels Rapid-Whole-Genome-Sequencing im Vergleich zu den Standardverfahren. (35)

Wang et al. haben im Jahr 2020 auf eine optimierte Trio-Genomsequenzierung zurückgegriffen und die Sequenziertiefe für die ProbandInnen bei 40–50 × und für ihre Eltern 8–10 × gelegt, um vor allem die Dauer der Diagnostik zu minimieren. Eingeschlossen wurden 130 Kinder der neonatologischen und pädiatrischen Intensivstation mit Verdacht auf zugrundeliegender genetischer Erkrankung. Bei 62 von den 130 ProbandInnen konnte eine pathogene Variante nachgewiesen werden und das bei einer diagnostischen Dauer von Probenentnahme bis zur Befundübermittlung von im Durchschnitt nur 94 Stunden. Die diagnostische Rate entsprach hierbei über 47 Prozent. (36)

Daten aus Großbritannien aus dem Jahr 2019 zeigten, dass Neugeborene und kritisch kranke Kinder einer neonatologischen und pädiatrischen Intensivstation mittels Trio-Whole-Genome-Sequencing als First-Line Diagnostik einen klinischen

Benefit erfahren. In der Studie wurden 106 Neugeborene, beziehungsweise insgesamt 195 ProbandInnen, und in 90 Prozent der Fälle auch deren Eltern, eingeschlossen, bei welchen klinisch der dringliche Verdacht auf eine monogenetische Erkrankung besteht. Eingeschlossene ProbandInnen zeigten kongenitale Anomalien, neurologische und metabolische Auffälligkeiten unklarer Genese, IUGR, nekrotisierende Enterokolitis mit Notwendigkeit zur chirurgischen Intervention sowie weitere kritische klinische Zustandsbilder unklarer Genese mit Verdacht auf genetische Ursache. Insgesamt konnte eine diagnostische Rate mittels WGS von 21 Prozent erreicht werden, an der neonatologischen Intensivstation lag die Rate bei 13 Prozent, an der pädiatrischen Intensivstation bei 25 Prozent. Durch den Genotyp gesteuerten Ansatz konnten mittels WGS pathogene Varianten identifiziert werden, welche vermutlich mit einem Phänotyp gesteuerten nicht erkannt worden wären. Die Diagnostik war somit mit dem bekannten Genotyp und der in Folge phänotypassozierten Varianteninterpretation deutlich erleichtert. (12)

Bereits im Jahr 2018 konnten Farnae et al. nachweisen, dass von 42 eingeschlossenen akut erkrankten Kindern der neonatologischen als auch pädiatrischen Intensivstation (teils kongenitale Anomalien, teils multi-systemische Symptome), nur rund zehn Prozent mit Standardtestverfahren wie Micro-Array Untersuchungen, diagnostiziert wurden. Im Vergleich dazu konnten 18 der 43 Kinder, entsprechend 43 Prozent, mittels Rapid- WGS eine Diagnose erhalten. Das entspricht einer signifikant höheren diagnostischen Rate. In Folge führte die Rapid- WGS Diagnostik in 31 Prozent der eingeschlossenen PatientInnen zu einer Adaption der klinischen Behandlung. Im Median dauerte die Diagnostik dennoch 23 Tage, insbesondere da vor der Diagnoseübermittlung Bestätigungstestungen durchgeführt wurden. (9)

Dem Gegenüberstehend konnten Van Diemen et al. aus den Niederlanden nur in etwa 30 Prozent der eingeschlossenen Fälle eine kausale Mutation durch Single-Whole-Genome-Sequencing nachweisen, welche anschließend mittels Sanger Sequenzierung bestätigt wurden. Die Einschlusskriterien für die Kinder von neonatologischen und pädiatrischen Intensivstationen wurden hierbei strenger gestellt. Kinder mit klinischem Verdacht auf eine bekannte genetische Erkrankung wurden direkt der gezielten genetischen Analyse unterzogen ohne Einschluss in

das WGS. Insgesamt konnten hier also nur sieben von 23 in der Studie eingeschlossener Kinder eine kausale Veränderung gefunden werden, jedoch wäre bei sechs von diesen Kindern keine genetische Diagnostik anhand der Klinik herangezogen worden. Die mediane Dauer von Probenentnahme bis zur Diagnoseübermittlung waren hierbei nur 12 Tage, ein klarer Vorteil des WGS. (37)

5.1.3 Vergleichsstudien

„Die NSIGHT2 war eine prospektive, randomisierte, kontrollierte, verblindete Studie (RCT) mit akut kranken Säuglingen, hauptsächlich von der NICU, PICU und CVICU am Rady Children's Hospital, San Diego (RCHSD), um die Wirksamkeit und Ergebnisse zwischen rWGS und rWES mit Single- als auch Trio- Analyse zu vergleichen. Experten wählten aus der elektronischen Gesundheitsakte einige klinische Merkmale aus, die für die Krankheit jedes Kindes repräsentativ sind, und ordneten sie mit VAAST genetischen Erkrankungen zu“ (20)

In der NSIGHT1- Studie, welche an einer neonatologischen und pädiatrischen Intensivstation durchgeführt wurde, konnte der signifikante Unterschied zwischen genetischen Standardtestungen und Trio-Rapid-Whole-Genome-Sequencing aufgezeigt werden. Eingeschlossen wurden hierbei 65 Kinder mit schwerer Erkrankung unbekannter Ätiologie zwischen 2014 und 2016. Die StudienteilnehmerInnen wurden teils-verblindet und randomisiert. Zweiunddreißig der ProbandInnen erhielten Rapid-Trio-WGS, 33 ProbandInnen genetische Standardtestungen wie Micro-Array, NGS Paneldiagnostik, Whole-Exome-Sequencing oder Methylierungs-spezifische PCR. (38)

Zehn von 32 Fällen, entsprechend 31 Prozent, konnten mittels Rapid-Trio-WGS eine Diagnose erhalten. Am Tag 10 erfolgte die Entblindung der Kinder für die Randomisierung, für sieben der 33 Kinder der Kontrollgruppe, welche Standardtestungen erhielten, forderten Kliniker die cross-over Diagnostik zu Rapid-Trio-WGS. In der Intention-to-treat Analyse zeigte sich, dass innerhalb von 28 Tagen 31 Prozent der Kinder, welche mittels Standardtestung und Rapid-WGS eine Diagnose erhielten, der Gruppe mit genetischer Standardtestung ohne WGS signifikant überlegen war. In der Gruppe mit Standardtestung konnte lediglich eine diagnostische Rate von drei Prozent erreicht werden (eines von 33 Kindern). (38)

Die Conclusio der Studie zeigte, dass Trio-Rapid-WGS plus genetische Standardtests eine signifikant höhere diagnostische Rate zeigten als bei Kindern welche nur Standardtests erhielten. Die Dauer bis zur Diagnose zeigte sich ebenso deutlich kürzer. (38)

Eine folgende Kohortenstudie aus San Diego, USA, von Kingsmore et al. zeigte im Jahr 2019, dass in 19 Prozent der Fälle von Kindern mit Erkrankungen unklarer Ätiologie NGS zu einer Diagnosefindung führte. Von 189 eingeschlossenen akut kranken Kindern, mit einem strengen Zeitfenster von maximal 96 Stunden seit Aufnahme beziehungsweise Auftretens der klinischen Symptome, erhielten 95 Rapid-WES und 94 Rapid-WGS. Ergebnisse erbrachten eine diagnostische Rate von 19 Prozent für Rapid-WGS (18 von 94) sowie eine diagnostische Rate von 20 Prozent (19 von 95) für Rapid-WES, welche sich somit nicht signifikant unterschieden. Die Dauer beider Untersuchungen bis zur Befundübermittlung unterschied sich im Median nicht signifikant. Insgesamt erbrachte die Studie eine Inzidenz genetischer Erkrankungen von 24 Prozent und war somit höher als einige andere Studien zuvor. Mittels Rapid-WGS konnten in Summe jedoch mehr als doppelt so viele Nukleotidvarianten, welche als pathogen und wahrscheinlich pathogen eingestuft werden, nachgewiesen werden. Aus vorliegender Datenlage heraus zeigte jedoch die Trio-Sequenzierung keinen signifikanten diagnostischen Vorteil im Vergleich zur Single-Analyse. Insgesamt wurde hierbei das klinische Management bei 28 Prozent der Kinder adaptiert. (20)

Daten aus China aus dem Jahr 2019 belegen bei einer Studienpopulation von 202 eine diagnostische Rate von über 36 Prozent mit Trio-Rapid-Genome-Sequencing. Sie verglichen dazu das Single-Exome-Sequencing, welches im Vergleich nur in knapp 20 Prozent der Fälle zu einer Diagnose führte. Eingeschlossen wurden hierbei Kinder der neonatologischen als auch pädiatrischen Intensivstation mit einem Altersspektrum von Neugeborenen bis zu 13-Monate alten Kindern mit angeborenen Malformationen sowie Fehlbildungen des Herz-Kreislauf-Systems und des Zentralnervensystems sowie schweren metabolischen Erkrankungen, Infektionen und Immundefekten. Interessanterweise zeigte sich das Trio-Genome-Sequencing nicht nur in der diagnostischen Rate im Vorteil, auch zeitlich war die Trio-Analyse mit im Median 7 Tagen der Single-Analyse (im Median 20 Tage) klar überlegen. (39)

5.1.4 NGS-Panel-Diagnostik

Vorliegende Daten aus Kanada von Daoud et al. aus dem Jahr 2014 erbrachten mit Trio-Next-Generation-Sequencing für 8 der 20 eingeschlossenen Neugeborenen eine Diagnose, dies entspricht einer Diagnoserate von 40 Prozent. In vorliegenden Daten wurden ausschließlich Neugeborene mit komplexem klinischen Zustandsbild ohne bekannte Ätiologie nach Einschätzung einer GenetikerIn eingeschlossen. Kinder mit Verdacht auf Chromosomenabberationen wurden ausgeschlossen. Daoud et al. haben, anders als die meisten NGS Studien, die Sequenzierung auf ein Gen-Panel mit 4813 Genen, welche assoziiert waren zu den jeweiligen Phänotypen und als krankheitsrelevant eingestuft wurden, beschränkt. In zwei dieser acht durch NGS diagnostizierten Kinder kam es in Folge zu einer Adaption der Therapien. In allen diagnostizierten Fällen half die korrekte Diagnosestellung in Hinblick auf die Prognose und ermöglichte eine korrekte Beratung über das Rezidivrisiko bei möglichen nachfolgenden Schwangerschaften. (40)

Dementsprechend sieht die Datenlage den Nutzen einer NGS Diagnostik für kritisch kranke Neonaten sehr kontrovers, die Zahlen wie oft NGS zu einer kausalen Diagnose kommt, variieren. Insbesondere durch die Komplexität der Interpretation der vorliegenden Daten nach NGS Diagnostik bedingt, ist die Diagnosefindung durch NGS erschwert. Normalerweise ist man davon abhängig, dass die gefundenen Varianten bereits durch andere Studien als pathogen klassifiziert wurden oder zumindest von PatientInnen mit ähnlichen Symptomen berichtet wurde, was oftmals nicht der Fall ist und die Interpretation deutlich erschwert. Doch auch Varianten welche als bekannt oder bekannt pathogen gelten, sich klinisch jedoch (noch) nicht manifestiert haben, müssen berücksichtigt werden. (6)

Table 1 Studies of exome and whole genome sequencing in pediatric inpatient populations						
Publication (First Author, Ref#), Year	Study Population ^a	Study Type	Test ^b	Turnaround Time	Diagnostic Rate	Change in Management ^c
Studies with all patients located in NICU						
Clark et al, ¹⁴ 2019	n = 7, neonates; NICU	Prospective	GS (trio)	20 h (median)	43%	100% of diagnosed (43% of tested)
Elliot et al, ²² 2019	n = 25, neonates; NICU	Prospective	ES (trio)	7 d (mean)	60%	83% of diagnosed (60% of tested)
Freed et al, ²³ 2020	n = 46, neonates; NICU	Prospective	ES (trio)	9 d (mean)	43%	95% of diagnosed (52% of tested)
Studies with patients in mixed ICU settings						
Willig et al, ²⁴ 2015	n = 35, infants; NICU or PICU	Retrospective	GS	23 d (median)	57%	65% of diagnosed (37% of tested)
van Diemen et al, ²⁵ 2017	n = 23, infants; NICU or PICU	Prospective	GS	12 d (median)	30%	71% of diagnosed (22% of tested)
Meng et al, ²⁶ 2017	n = 63, infants; any ICU	Retrospective	ES	13 d (median)	37%	52% of diagnosed (19% of tested)
Petrikin et al, ²⁷ 2018	n = 32, infants; NICU or PICU	RCT	GS	14 d (median)	31%	48% of diagnosed (15% of tested)
Mestek-Boukhibar et al, ²⁸ 2018	n = 24, infants; PICU	Prospective	GS (trio)	8.5 d (median)	42%	100% of diagnosed (24% of tested)
French et al, ²⁹ 2019	n = 195, pediatric; NICU or PICU	Prospective	GS (trio)	4.5 wk (median)	21%	65% of diagnosed (13% of tested)
Sanford et al, ³⁰ 2019	n = 33, pediatric; PICU	Retrospective	GS	13 d (mean)	45%	24% of diagnosed (12% of tested)
Wu et al, ³¹ 2019	n = 40, pediatric; PICU	Prospective	ES	6 d (mean)	52%	81% of diagnosed (25% of tested)

(continued on next page)

Abbildung 2 NGS in pädiatrischen Populationen (2)

Table 1 (continued)						
Publication (First Author, Ref#), Year	Study Population ^a	Study Type	Test ^b	Turnaround Time	Diagnostic Rate	Change in Management ^c
Wang et al, ³² 2020	n = 33, infants; NICU or PICU	Prospective	ES	24 h (median)	69%	43% of diagnosed (23% of tested)
Wang et al, ³³ 2020	n = 130, pediatric; NICU or PICU	Prospective	GS (trio)	3.8 d (median)	48%	48% of diagnosed (23% of tested)
Chung et al, ³⁴ 2020	n = 102, pediatric; NICU or PICU	Prospective	ES	11 d (median)	31%	88% of diagnosed (27% of tested)
Wu et al, ³⁵ 2021	n = 202, pediatric; PICU	Prospective	GS (trio)	7 d (median)	36%	21% of diagnosed ("immediate" changes only; 8% of tested)
Sweeney et al, ³⁶ 2021	n = 24, infants; NICU or CICU	Retrospective	GS	5–10 d	43%	45% of diagnosed (20% of tested)
Studies with patients in ICU or inpatient setting						
Farnaes et al, ³⁷ 2018	n = 42, infants; any ICU or inpatient ward	Retrospective	GS	23 d (median)	43%	72% of diagnosed (31% of tested)
Lunke et al, ³⁸ 2020	n = 108, neonates; NICU, PICU or inpatient ward	Prospective	ES	3 d (range 2–7)	51%	76% with and 11% without diagnosis (44% of all tested)

Abbreviation: PICU, pediatric intensive care unit.

^a Inclusion criteria and patient populations not uniform across studies. In general, "neonate is less than 2 months of age, "infant" less than 12 months, and "pediatric" less than 10 years. Most patient populations had a wide variety of organ system involvement. Amount of prior genetic workup also variable.

^b If not noted, sequencing was either proband-only or a mix of proband-only, trio, and other familial approaches.

^c Excluding cases where only change was genetic counseling, familial risk assessment, outpatient referral, or long-term management change. Not including impact of negative cases or variants of uncertain significance, except where specified.

Abbildung 3 NGS in pädiatrischen Populationen II (2)

Table 2
Studies of exome and whole genome sequencing in pediatric inpatient populations

Publication (First Author, Ref#), Year	Study Population	Study Type	Test	Turnaround Time	Diagnostic Rate	Change in Management
Yang et al. ²¹ , 2022	n = 2303 neonates; NICU	Prospective	ES	unknown	12,30%	46,8% of SNV/Indel diagnoses
Kingsmore et al. ¹⁹ , 2019	n = 95 NICU, PICU, CVICU	Prospective	rWES (trio; solo)	11,2 d (median)	20%	unknown
Kingsmore et al. ¹⁹ , 2019	n = 94 NICU, PICU, CVICU	Prospective	rWGS (trio; solo)	11,0 (median)	19%	unknown
Ceyhan-Birsoy et al. ¹⁵ , 2019	n = 159 nursery (healthy), NICU	Prospective	WES (single)	unknown	9,4% (childhood-onset disease)	100% of diagnosed
Ceyhan-Birsoy et al. ¹⁵ , 2019	n = 85 nursery (healthy), NICU	Prospective	WES (single)	unknown	3,5% (adult- onset disease)	100% of diagnosed
Ceyhan-Birsoy et al. ¹⁵ , 2019	n = 29 NICU	Prospective	WES (single)	unknown	0%	unknown
Ceyhan-Birsoy et al. ¹⁵ , 2019	n = 159 nursery (healthy), NICU	Prospective	WES (single)	unknown	88% (Carrier status for recessive diseases)	unknown
Daoud et al. ³⁸ , 2016	n = 20	Prospective	NGS-Panel (trio)	15,2 wk (median)	40%	unknown
Stark et al. ²² , 2016	n = 80	Prospective	WES (single)	134 d (median)	57,50%	32,6% of diagnosed
Powis et al. ²³ , 2018	n = 66	Retrospective	ES (trio; single)	8 d (median)	37,90%	unknown

Abbildung 4 NGS in pädiatrischen Populationen III

5.2 Conclusio

Die Daten aus den letzten Jahren zum Einsatz von NGS Technologien in der pädiatrischen und neonatologischen Intensivmedizin haben stetig zugenommen. Die diagnostische Rate mittels NGS Technologien variiert insbesondere da die Einschlusskriterien sehr unterschiedlich gefasst wurden. Sollte klinisch bei den ProbandInnen der eindeutige Hinweis auf eine monogenetische Erkrankung bestehen, ergab sich entsprechend automatisch in den Ergebnissen der Studien eine höhere Positivrate. (22)

Trotz inzwischen zahlreich vorliegender Studien zum Einsatz von sowohl Whole-Exome-Sequencing als auch Whole-Genome-Sequencing mit und ohne Gen-Panel lässt sich pauschal kein Vorzug einer der beiden Techniken feststellen.

In den Daten aus dem letzten Jahrzehnt zur genetischen Diagnostik in der pädiatrischen und neonatologischen Intensivmedizin konnte sowohl das Whole-Exome-Sequencing als auch das Whole-Genome-Sequencing in einem Großteil der Fälle eine ähnliche diagnostische Rate von meist 30 bis 50 Prozent erreichen.

Vergleichsstudien konnten nachweisen, dass klinisch WES und WGS gleichgestellt werden können, jedoch zeigten sich die Next-Generation-Sequencing Technologien den alleinigen genetischen Standardtestungen signifikant überlegen. (20) (38)

In erster Linie muss stets die Frage der Interpretation der Ergebnisse und deren Nutzen in Bezug auf die weitere Behandlung und Betreuung des Kindes beachtet werden. Im Einsatz von NGS in der Neonatologie sollte man vorab stets überlegen, ob eine Chance besteht durch eine Diagnose einen klinischen Vorteil für das weitere beziehungsweise das (Über-)Leben des Kindes und dessen Familie generiert werden kann. Die Datenlage zur NGS Diagnostik in der Neonatologie beschreibt einen sehr variablen Benefit in Bezug auf den Outcome und die daraus resultierenden Kosten.

Die weitreichende Aufklärung der Kindseltern in dieser besonders schwierigen Situation an der neonatologischen Intensivstation stellt eine besondere Herausforderung dar. Es muss bereits vorab determiniert werden, welche Befunde den Kindseltern mitgeteilt werden und welche nicht.

Zusätzlich sind potenzielle Risiken einer diagnostischen Genomsequenzierung nicht außer Acht zu lassen. In vielen Fällen wird NGS in Betracht gezogen, wenn keine eindeutige klinische Verdachtsdiagnose gestellt werden kann. Jedoch ergibt sich daraus in vielen Fällen leider keine therapeutische Konsequenz oder gar Heilung. Dennoch kann eine Diagnosestellung durch NGS in der neonatologischen Intensivmedizin eine Unterstützung beim Therapierückzug und Einleiten einer palliativen Pflege sein. Zusätzlich kann durch eine definierte Diagnosestellung die Verarbeitung der oft schwerwiegenden Situationen und Zukunftsaussichten der Kindseltern bezüglich weiterer Fertilitätsentscheidungen erleichtert werden. (6)

Generell spielt die genetische Testung in der Neonatologie eine große Rolle, da genetische Erkrankungen in der Neonatalperiode einen großen Anteil an Morbidität und Mortalität haben. Durch die rasche Weiterentwicklung der Technologien sowie Reduktion an Dauer und Kosten wird diese mehr und mehr im klinischen Alltag präsent. Gerade an der Neonatologie, wo eine akut progressive Erkrankung eine rasche Diagnostik erfordert, wird NGS in den Mittelpunkt rücken. Laut aktueller Datenlage lässt sich pauschal eine diagnostische Rate von durchschnittlich 40 Prozent erwarten. Eine Änderung im klinischen Management ergibt sich laut der Datenlage in ebenso über 40 Prozent der diagnostizierten Fälle. Viele Studien beschreiben, wenn auch klinisch fraglich, einen Kostennutzen durch den verkürzten Spitalsaufenthalt nach frühzeitig erhaltener genetischer Diagnose. Die Evidenz zeigt deutlich, dass der Einsatz von NGS in der neonatologischen Intensivmedizin von großem Nutzen ist. Wichtigster Anteil liegt jedoch nach wie vor an einer fachkompetenten genetischen Phänotyp-Analyse und Interpretation gefundener Varianten. (2)

6 Test-Algorithmus

Der Aufbau einer idealen Pipeline für eine genetische Diagnostik mittels Next-Generation-Sequencing Technologien für die neonatologische Intensivmedizin soll eine frühzeitige Diagnosestellung ermöglichen, den Outcome der Kinder verbessern und somit die Weichen für weitere therapeutische Maßnahmen setzen, hohe Langzeitkosten für das Gesundheitssystem vermeiden, die Prävalenz genetischer Erkrankungen aufzeigen und somit die Genotyp-Phänotyp Korrelationen in der Neonatologie besser zu verstehen. (12)

In erster Linie sollte zunächst immer, sofern möglich, bei Verdacht auf das Vorliegen einer genetischen Grunderkrankung eine GenetikerIn beziehungsweise ein in Humangenetik ausgebildeter Mediziner oder Medizinerin hinzugezogen werden, um die beste Teststrategie etablieren zu können.

Bei klinischem Verdacht auf eine monogenetische Erkrankung, multiplen Malformationen oder unklarer kritischer Erkrankung sollte nach detaillierter klinischer Anamnese, Erhebung der Familienanamnese und Untersuchung eine Kategorisierung nach HPO-Terms erfolgen. Diese zielen mittels standardisiertem Wortindex darauf ab phänotypische Auffälligkeiten bei Erkrankungen beschreiben zu können.

Zunächst muss grundsätzlich abhängig vom klinischen Setting entschieden werden. Viele periphere Kliniken haben vor Ort keine Möglichkeit für Karyotypisierung oder gar Array-Untersuchungen. Wichtigstes Kriterium für den Entscheid der weiteren genetischen Diagnostik stellt das klinische Zustandsbild des Kindes dar. Zeigt das Kind klinisch ein sehr schweres Erkrankungsbild, wobei es gilt, möglichst rasch eine Diagnose zu stellen, ist es ratsam eine Testung mit rascher Befundübermittlung zu wählen. Zeigt sich klinisch ein stabiles Zustandsbild des Kindes und befindet sich dieses in einem peripheren Krankenhaus ohne genetisch ausgebildete Spezialisten, empfiehlt die Datenlage eine genetische Vorstellung an einer Abteilung für Humangenetik. (2)

Haben sich pränatal in den Ultraschalluntersuchungen während der Schwangerschaft bereits fetale Anomalien gezeigt und wurde bis zur Geburt aus verschiedenen Gründen keine Abklärung durchgeführt, sollte postnatal in erster Linie eine Karyotypisierung oder Array-Untersuchung durchgeführt werden. Bei

klinischem Verdacht auf eine Mikrodeletion und Mikroduplikation kommen sowohl die Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung als auch eine MLPA-Analyse in Frage. Die MLPA Analyse, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, kann durch Multiplex PCR Dosisunterschiede von Genen beziehungsweise von Genabschnitten messen. Sie kommt insbesondere zum Nachweis von Kopienzahlvarianten zum Einsatz.

Sollte ein klinisch nicht spezifischer Verdacht auf eine Chromosomenabberation vorliegen, kann bei klinischen Fragestellungen wie globaler Entwicklungsretardierung oder Dysmorphiezeichen eine molekulare Karyotypisierung erfolgen. (19)

Stellt sich klinisch kein eindeutiger Hinweis auf Aneuploidien oder bekannte strukturelle chromosomale Defekte, sollte, nach eingehendem klinischem Work-Up durch eine GenetikerIn oder in Genetik ausgebildete PädiaterIn, laut aktueller Datenlage aus Kosten- und Zeitgründen eher auf ein Whole-Exome-Sequencing zurückgegriffen werden als auf ein Whole-Genome-Sequencing. Zusätzlich hat WES sich durch neueste Technologien dem Stand des WGS angenähert. Sollte jedoch ein Whole-Exome-Sequencing ohne Detektion von Kopienzahlvarianten nur zur Verfügung stehen, sollte laut Literatur auf ein Whole-Genome-Sequencing zurückgegriffen werden. Dies auch insbesondere, wenn durch Exom-Sequenzierung oder durch eine Panelanalyse keine Ursache gefunden werden konnte. (2)

Ob in der neonatologischen Intensivmedizin bei Verdacht auf zugrundeliegende genetische Erkrankung in erster Linie auf ein Whole-Exome-Sequencing oder direkt auf ein Whole-Genome-Sequencing zurückgegriffen wird, sollte abhängig vom klinischen Zustandsbild des Kindes, den Eigenschaften der jeweiligen Testung im zuständigen Labor sowie abhängig von eventuell vorangegangenen genetischen Testungen im interdisziplinären Setting erfolgen.

Der Datenlage zufolge wäre bei akut kritisch krankem Kind in klinisch schlechtem Zustandsbild und drohender Mortalität ein Trio-WGS unter Einbezug der Eltern zu erwägen. In Fällen mit negativem Ergebnis aus WGS Untersuchungen oder dem reinen Auffinden von Varianten mit unklarer Signifikanz sollte eine klinische Reevaluierung sowie die Testung naher Angehöriger, sofern noch nicht durchgeführt, erfolgen. (19)

Generell wäre aktuell dennoch die Empfehlung in erster Linie eine Whole-Exome-Sequencing Diagnostik durchzuführen, da die WES Technologien sich verbessert haben und in den meisten Zentren nach wie vor kostengünstiger sind als ein Whole-Genome-Sequencing. Dies sollte jedoch immer abhängig von klinischem Zustandsbild und der genetischen Fragestellung erfolgen.

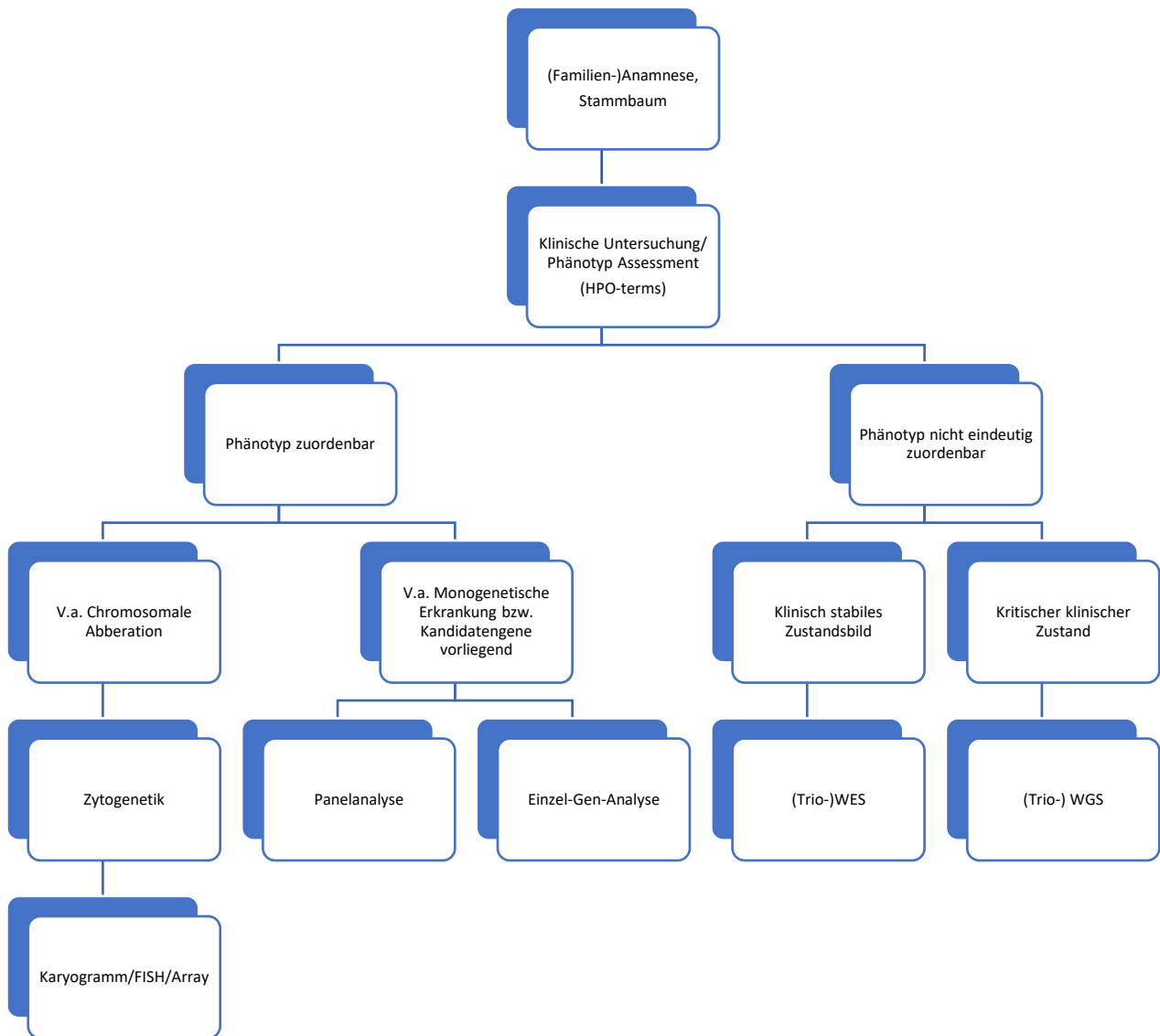


Abbildung 5 Test-Algorithmus: Empfehlung zur genetischen Testung in der Neonatologie

7 Auswirkungen auf den klinischen Outcome

Eine genaue genetische Diagnose hat einen relevanten Anteil am Outcome der betroffenen Kinder und Familien. Nicht nur allein durch die mögliche klinische Prognosestellung, auch durch maßgeschneiderte Therapien und adäquate Nachbetreuung, kann die richtige Diagnosestellung einen wesentlichen Faktor erfüllen. (19)

Eine genetische Diagnose kann auch im Setting der neonatologischen Intensivmedizin durch die Adaption von Therapie, Medikation oder Diät sowie durch die Einleitung weiterer diagnostischer Schritte und die Vermeidung unnötiger weiterer diagnostischer Testungen, einen unmittelbaren Einfluss haben. (2)

In den meisten vorliegenden klinischen Studien wurden Neugeborene mit Verdacht auf das Vorliegen einer genetischen Grunderkrankung eingeschlossen. Diese wurden durch GenetikerInnen oder interdisziplinär mit NeonatologInnen, PädiaterInnen und GenetikerInnen bestimmt. In vielen Fällen führte dies zwar zu hohen diagnostischen Raten aber in Folge potenziell auch zu verzögerter Diagnostik nicht genetisch bedingter Grunderkrankungen, welche sich klinisch jedoch überlappend zeigten. (41)

Wie Dimmock et al. in einer klinischen Umfrage nach der NSIGHT-Studie bezüglich des klinischen Nutzens der erbrachten Diagnostik erhoben, war laut Klinikern die Genomsequenzierung in 77 Prozent aller beteiligten Kinder von klinischem Nutzen. Hierbei wurden insbesondere Änderungen im klinischen Management sowie Auswirkungen auf den Outcome und die familiäre Situation der Kinder erfragt. (41)

Wie die Rapidomics Studie bereits aufzeigen konnte, hatte die korrekte und vor allem rasche Diagnosestellung durch (Rapid-)ES sowie Panel-Diagnostik und Mikroarray Untersuchung in mehr als 80 Prozent der Fälle einen Einfluss auf die weitere medizinische Versorgung der Neonaten. (8)

Die Daten von Daoud et al. erbrachten mit Trio-Next-Generation-Sequencing eine Diagnoserate von 40 Prozent. Bei 25 Prozent der diagnostizierten Kinder kam es in Folge zu einer Adaption der Therapie. In allen diagnostizierten Fällen half die korrekte Diagnosestellung in Hinblick auf die Prognose und weitere Betreuung der Kinder. (40)

Klinischen Impact auf die weitere Versorgung der Kinder konnte in 65 Prozent aller diagnostizierten Fälle aufgezeigt werden und in Folge zu Einleitung eines palliativen Settings, einer Änderung in medikamentöse, operative oder diätetische Maßnahmen und sogar zu der Einleitung einer spezialisierten ärztlichen Betreuung führen. (10)

Eine frühzeitige Diagnosestellung durch NGS in der neonatologischen Intensivmedizin kann, neben der Möglichkeit einer adäquaten Therapie, Medikation, Diät und Pflege, auch eine Unterstützung beim Therapierückzug und Einleiten einer palliativen Pflege sein. Oftmals wird diese Entscheidung durch die definitive Diagnose sowohl den behandelnden Ärzten als auch den Kindseltern erleichtert. NGS führt jedoch in vielen Fällen zu einer Diagnose mit unklarer klinischer Prognose.

Doch NGS kann neben einer Therapieadaptierung und Prognosestellung auch in anderen Aspekten von großem Nutzen sein. Einerseits kann durch eine definierte Diagnosestellung die Verarbeitung der oft schwerwiegenden Situation den Kindseltern erleichtert werden. Die manchmal lange Odyssee bis zur korrekten Diagnosestellung und die schwerwiegenden Schuldgefühle der Eltern können dadurch beendet beziehungsweise entlastet werden. Andererseits können durch das Wissen der Genomik weitere Fertilitätsentscheidungen erleichtert werden. (6)

In sämtlichen herangezogenen Studien zeigte die vorliegende Datenlage, dass die NGS Diagnostik stets in mindestens zehn Prozent der diagnostizierten Fälle, durchschnittlich in 60 Prozent aller Fälle, einen klinischen Nutzen erbrachte. (2)

8 Limitationen des Einsatzes von NGS in der Neonatologie

Insbesondere das Whole-Genome-Sequencing ist eine Technologie, welche durch aktuell immer weiter sinkende Kosten und immer geringer werdender Dauer der Diagnostik in den Mittelpunkt der genetischen Testungen rückt. Jedoch gibt es derzeit noch Limitationen zum Einsatz dieser Diagnostik im klinischen Alltag.

In den vorliegenden Studien zu NGS in der neonatologischen Intensivmedizin variieren die Zahlen zur Diagnosefindung mittels NGS stark, insbesondere da die

Einschlusskriterien zum Teil sehr streng und zum Teil sehr locker gefasst wurden. In einigen der vorliegenden Studien wurden nur Kinder eingeschlossen, welche durch klinische Expertise einen eindeutigen Hinweis auf eine monogenetische Erkrankung zeigen, somit ergibt sich hier meist eine höhere Positivrate. (22)

In vielen Fällen in der neonatologischen Intensivmedizin wird laut Datenlage NGS in Betracht gezogen, wenn keine eindeutige klinische Verdachtsdiagnose gestellt werden kann. Daraus ergibt sich jedoch in vielen Fällen leider keine therapeutische Konsequenz oder gar Heilung. (6)

Viele der derzeit vorliegenden Studien zeigten bisher kaum auf welchen Benefit die Kinder und deren Familien in Folge der NGS Diagnostik haben. Eine hohe diagnostische Rate entspricht nicht automatisch einer Änderung im klinischen Management und einem Impact auf den klinischen Outcome.

Eine Kosten-Nutzen Abwägung wird in den meisten Studien ebenso nicht getroffen. Viele Studien beschreiben zwar eine Kostenreduktion durch die Vermeidung unnötiger weiterer Diagnostik und Therapie einer mittels NGS gewonnenen Diagnose, jedoch sollte immer klinisch vom Zustandsbild des Kindes abhängig entschieden werden, welche therapeutische Maßnahme indiziert ist und welche nicht. Zusätzlich kann eine Diagnosestellung durch NGS den Krankenhausaufenthalt, selbst in dadurch eingerichtetem palliativem Setting, nicht kostenrelevant verkürzen. Eine genetische Diagnose kann, selbst wenn diese dafür proklamiert werden, dabei nicht entscheidender Faktor sein. (9) (42)

Eine merkliche Kostenreduktion kann lediglich durch eine kostengünstigere diagnostische Variante erreicht werden, beispielsweise kann je nach Labor ein Whole-Exome-Sequencing im Vergleich zu einer Gen-Panel Untersuchung kosteneffizienter sein. (23)

Durch die je nach Labor längere Dauer von Probengewinnung bis zur Befundübermittlung kann es zu einer Verzögerung der präferablen Therapie und Pflege kommen, insbesondere wenn das klinische Zustandsbild des Kindes eine palliative Pflege klar bevorzugen würde. Dadurch kann der Prozess des Ablebens des Kindes weiter verzögert werden, jedoch ohne Chance auf Überleben oder gar Heilung. Diese wenig sinnbringende Intensivpflege sowie deren Kosten steht der Absicherung der Kindseltern und Mediziner einer gesicherten, nicht heilbaren

Grunderkrankung gegenüber. All dies ist jedoch abhängig von der Aufklärung und Zusammenarbeit zwischen betroffenen Familien und den behandelnden Medizinern. (6) (41)

Insbesondere die diagnostische Technologie größerer struktureller Varianten einzelner Loci fehlt es noch an ausreichender Sensitivität und Spezifität. Aktuelle Sequenziermethoden haben eine begrenzte diagnostische Breite von GC-reichen als auch homologen DNA-Regionen. Das Whole-Exome-Sequencing zeigt natürlich bei intrinsischen und nicht-kodierenden Varianten als auch bei CNV's und Deletionen sowie Duplikationen eine niedrigere Sensitivität als das Whole-Genome-Sequencing. Jedoch ist auch WGS durch die Interpretation der Varianten mit unklarer Signifikanz und Varianten, welche in Introns liegen, eingeschränkt. (43)

Die größte Herausforderung stellt jedoch nach wie vor die Variabilität des Genoms dar. Die Interpretation gefundener Varianten kostet viel Zeit und in einem großen Anteil der Fälle zeigen gefundene Varianten eine unklare Signifikanz. Die Pathogenität und die Ursache für das klinische Zustandsbild, um die Symptome des Betroffenen zu erklären, ist somit mit viel zeitlichem Aufwand verbunden und leider nicht immer sicher nachweisbar. Gibt es zu gefundenen und in Frage kommenden Varianten keinerlei bereits berichtete ähnliche Symptome, wäre eine funktionelle Testung notwendig, um den Zusammenhang nachweisen zu können. Durch das stetig zunehmende Wissen und durch die verbesserte Analyse steigt jedoch die Anzahl bekannter Varianten. (1) (10)

Zusätzlich sind falsch-positive Befunde eine Limitation im Bereich des NGS. *„Wo die A-priori-Wahrscheinlichkeit eines positiven Testergebnisses niedrig ist, wird auch ein hoch spezifischer Test ein nicht akzeptables Maß an falsch positiven Ergebnissen erbringen.“* (1)

Hierbei könnte eine in den Datenbanken als bekannt pathogene oder wahrscheinlich pathogene Variante als Ursache für die Erkrankung herangezogen werden, obwohl diese nicht krankheitsverursachend ist. Diese „Überinterpretation“ gefundener Varianten ist durch die Ausweitung der Datenmengen stetig steigend und könnte durch die niedrige Vortestwahrscheinlichkeit verstärkt werden. Die Assoziation kann erst durch die verstärkte Ausprägung des Phänotyps im Verlauf oder auch durch die steigenden Berichte desselben Krankheitsbilds und derselben Variante bestätigt werden. Infolgedessen kann es auch zu falsch positiven

Befunden kommen, da durch nicht ausreichende Datenlage eine Variante als Variante mit unklarer Signifikanz eingestuft werden muss. Weiters könnte es zu Fehlern im Detektieren der Varianten als auch in der Kommentierung kommen. Die häufigste Fehlerquelle scheint jedoch die Missinterpretation gefundener Varianten in intrinsischen Regionen und nicht bekannt krankheitsverursachenden Genen zu sein. (10)

Nicht außer Acht zu lassen sind dennoch die Kosten und der zeitliche Aufwand einer NGS Diagnostik, trotz in den letzten Jahren deutlich gesunkener finanzieller und personeller Aufwendungen. Nicht nur die Kosten für das Equipment und Personal, auch die Speicherung der Daten und Analyse tragen zu den hohen Kosten bei. Eine weitreichende Aufklärung der Eltern und der Einsatz eines multiprofessionellen Teams in der Aufarbeitung des klinischen Falls sowie die Interpretation und Befundübermittlung tragen zu dem hohen Zeitaufwand bei. (19)

9 Die genetische Beratung

„§ 69.

(1) Eine genetische Analyse des Typs 2, 3 oder 4 einschließlich einer genetischen Analyse im Rahmen einer pränatalen Untersuchung, darf nur nach Vorliegen einer schriftlichen Bestätigung der zu untersuchenden Person durchgeführt werden, dass sie zuvor durch einen in Humangenetik/medizinische Genetik ausgebildeten Facharzt oder einen für das Indikationsgebiet zuständigen Facharzt über deren Wesen, Tragweite und Aussagekraft aufgeklärt worden ist und aufgrund eines auf diesem Wissen beruhenden freien Einverständnisses der genetischen Analyse zugestimmt hat. Werden diese Untersuchungen pränatal durchgeführt, so müssen Aufklärung und Zustimmung der Schwangeren auch die Risiken des vorgesehenen Eingriffes umfassen.“ (44)

Wie im vorliegenden Gesetzestext muss eine genetische Beratung immer von einem Facharzt oder einer Fachärztin für Genetik oder einem im entsprechenden Indikationsgebiet ausgebildeten Facharzt/Fachärztin durchgeführt werden. (44)

Ziel der genetischen Beratung ist es dem Ratsuchenden, in vorliegendem Szenario den Kindseltern, die Ursache, das Krankheitsbild und dessen Verlauf und Prognose

einer fraglichen genetischen Erkrankung so weit wie möglich zu erläutern. Die Kindseltern müssen über Tragweite der Erkrankung, mögliche weitere Betroffene in der Familie sowie über die Bedeutung für das weitere Leben des Kindes aufgeklärt werden. Sie sollten über die Art der genetischen Testung sowie dessen Ablauf und Dauer informiert werden. Es muss eine detaillierte Aufklärung über das Auffinden sowohl pathogener Varianten als auch Varianten unklarer Signifikanz durchgeführt werden. Die mögliche Detektion einer Anlageträgerschaft muss ebenso vorab mit den Kindseltern besprochen werden. All dies soll in verständlicher Sprache und in angemessenem Setting erfolgen. Vor allem im intensivmedizinischen Setting ist eine zusätzliche Hilfestellung durch Psychologen oder Sozialarbeiter in der Beratungssituation empfohlen. (18)

In der genetischen Beratungssituation erfolgt nach initialer Klärung der Fragestellung, die Eigen- und, vor allem im Neonatologie Setting, die Familienanamnese. Informationen zum klinischen Zustandsbild und Phänotyp des Kindes sollten klinisch erhoben werden. Die Kindseltern sollen in weiterer Folge über Verdachtsdiagnosen und das weitere diagnostische Vorgehen informiert werden. (18)

Für Eltern von Kindern, welche PatientInnen an der neonatologischen Intensivstation sind, gibt es besondere Herausforderungen. Sie sind mit einer Situation konfrontiert, auf welche sie sich meist nicht vorbereiten konnten und welche verlangt sich immer wieder rasch zu adaptieren. Eltern schwer kranker Kinder sind mit einer Reihe an Emotionen konfrontiert, seien es Schuldgefühle aufgrund des klinischen Zustandsbildes dem Kind gegenüber oder auch das Gefühl kein vollwertiger Elternteil zu sein, was vor allem auf das fehlende Bonding zurückzuführen ist. Diese Gefühle und Herausforderungen betreffen alle Eltern - sogar Mediziner, wie Janvier et al. in ihrer Arbeit über den Einfluss eines kranken Kindes an der NICU von Eltern aus dem medizinischen Fachbereich beschrieben haben. (45)

Sie beschreiben nicht nur ihre eigenen Erfahrungswerte, sondern beschreiben sowohl den teils lebenslangen negativen Impact wie eine posttraumatische Belastungsstörung, sondern auch positive Transformationen wie das posttraumatische Wachstum. Dies bezeichnet einen positiven Entwicklungsprozess auf persönlicher Ebene nach einer vorangegangenen traumatischen Erfahrung.

Obwohl die in der Arbeit beteiligten Personen allesamt aus dem medizinischen Bereich stammten, sowohl Ärzte als auch Pflegepersonal teils selbst im intensivmedizinischen Bereich tätig, waren sie nicht auf die Herausforderungen vorbereitet. Sie beschreiben ebenso wie alle betroffenen Eltern ein Gefühl des Kontrollverlustes, eine Hilflosigkeit in Anbetracht von medizinischen Entscheidungen und die schwierige Gradwanderung zwischen Optimismus und Realismus. (45)

Vor allem in Bezug auf genetische Fragestellungen und Testungen sind Eltern an der neonatologischen Intensivstation vor noch größere Herausforderungen gestellt. Genetische Testungen können sowohl negativen als auch positiven Einfluss auf die Familien haben. Oftmals erbringt jedoch eine genetische Diagnose im NICU Setting keinen Hinweis auf adäquate therapeutische Optionen und führt manchmal auch zu keiner adäquaten Prognosestellung. Eltern müssen daher in diesem Setting besonders weitreichend durch KlinikerInnen und GenetikerInnen über die weiteren Folgen sowohl prä- als auch postdiagnostisch aufgeklärt werden. Die Komplexität einer genetischen Testung muss aufgezeigt werden.

Insbesondere bei einem palliativen Setting sollten vor der genetischen Testung intensive Gespräche über den Einfluss der Testergebnisse geführt werden, um die Erwartungshaltung der Kindseltern entsprechend zu adaptieren. Zusätzlich gilt es insbesondere den Eltern in dieser schwierigen Situation so weit wie möglich das Gefühl der Schuldhaftigkeit zu nehmen. (6)

In der Literatur finden sich zwar auch Krankheitsbilder, welche in Folge der genetischen Diagnostik einer adäquaten Therapie zugeführt werden konnten, wie beispielsweise beim Vorliegen eines Dravet-Syndroms, in vielen Fällen ist diese aber unabhängig vom klinischen Handling. Sie können dennoch beispielsweise dazu beitragen das klinische Management auf ein palliatives Setting umzustellen, insbesondere in Hinblick auf die Akzeptanz der Kindseltern zu diesem Vorgehen.

Weiters kann eine genetische Diagnostik vor allem für Kindseltern von Vorteil sein, wenn diese planen weitere Kinder zu bekommen. So kann in indizierten Fällen eine entsprechende Pränataldiagnostik oder sogar Präimplantationsdiagnostik empfohlen werden.

Folgend der NSIGHT Studie wurde mittels Fragebogen die Zufriedenheit der Kindseltern bezüglich der Aufklärung und genetischen Genomsequenzierung erhoben. Obwohl nur 23 Prozent der beteiligten ProbandInnen eine genomische Diagnose durch NGS erhielten, haben mehr als 90 Prozent aller beteiligten Eltern angegeben adäquat aufgeklärt worden zu sein und 97 Prozent aller Elternteile beteiligter Kinder gaben an einen Nutzen aus der genetischen Diagnostik gezogen zu haben. Knapp mehr als 50 Prozent der Eltern gaben an die Testung nicht zu bereuen, fünf der 117 eingeschlossenen ProbandInnen gaben an Schäden infolge der genetischen Diagnostik fortgetragen zu haben. In der folgenden Nachforschung wurde durch einen Elternteil bestätigt, dass es zu einer Schädigung von Kind und Eltern, im Zusammenhang mit negativen Ergebnissen beziehungsweise keine Diagnose erlangt zu haben, kam. Zwei der beteiligten Elternteile gaben an aufgrund von Stress oder Verwirrtheit einen Nachteil davongetragen zu haben und zwei leugneten in weiterer Folge eine fragliche Schädigung. (46)

10 Genomische Sequenzierung aller Neugeborenen- A way to go?

10.1 Das Neugeborenen-Screening in Österreich

Das Neugeborenen-Screening, eine Untersuchung auf angeborene Stoffwechsel- und hormonelle Erkrankungen, gibt es bereits seit den 1960er Jahren in Österreich. Über die nächsten Jahrzehnte haben sich die Konditionen für das Neugeborenen-Screening laufend verändert, zahlreiche Erkrankungen konnten zum Screeningverfahren hinzugefügt werden, aufgrund von stetig wachsendem Wissen zu Pathogenität, Diagnostik und Therapie. (7)

Die meisten der eingeschlossenen Erkrankungen sind zwar insgesamt selten, jedoch ohne frühzeitige Therapie mit teilweise fatalen Folgen für das weitere Leben der Kinder. Die getesteten Erkrankungen zeigen in den seltensten Fällen bereits in den ersten Lebensstunden und -tagen Symptome, eine frühzeitige Therapie ist aber zum Beispiel bei der Spinalen Muskelatrophie oder Phenylketonurie essenziell für das langfristige Outcome der Neugeborenen. Alle eingeschlossenen Erkrankungen haben anerkannte Therapie- sowie Testoptionen, eine bekannte Pathogenität und ein vertretbares Kosten-Nutzen-Verhältnis. Das Screening erfolgt mittels Blutabnahme in den ersten Lebensstunden beziehungsweise -tagen über eine Trockenfilterkarte. Das Neugeborenen-Screening hat sich seit der Einführung in den Sechzigerjahren in vielen Ländern weltweit etabliert, wenn auch in sehr verschiedenen Konstellationen abhängig von Gesundheitssystemstrukturen, Politik, Finanzierung, fachlicher Kompetenzen und der Zustimmung der allgemeinen Bevölkerung. (7) (47)

Durch das Neugeborenen-Screening konnten in Österreich in den letzten Jahrzehnten über 2500 Kinder diagnostiziert und somit rechtzeitig einer therapeutischen Konsequenz unterzogen werden, womit die Mortalität und Morbidität deutlich gesenkt werden konnte. Bis dato erfolgt dieses Screening unter anderem durch die Tandem-Massenspektrometrie. Diese Technologie lässt es zu, eine Vielzahl an Parametern zeitgleich zu erheben. (7)

10.2 Die Zukunft des Neugeborenen-Screenings – Analyse relevanter Fragen für den Einsatz von Genomsequenzierung im Screening Programm

Bereits seit vielen Jahren gibt es immer wieder die Vision einer genomweiten Diagnostik im Rahmen des Neugeborenen-Screenings zur Früherkennung behandelbarer Erkrankungen. Sobald die Sequenziermethoden es zeitlich und finanziell erlauben, stelle dies das ultimative Ziel der personalisierten Medizin dar. (47)

Die stetige Weiterentwicklung der Technologien in der genetischen Diagnostik erlaubt inzwischen sowohl eine Kostenreduktion als auch eine zeitliche Reduktion bis zur Diagnoseübermittlung. Insbesondere durch das Whole-Genome-Sequencing und durch das Whole-Exome-Sequencing konnten in Forschung und Klinik bereits viele Fortschritte erzielt werden. Dadurch wirft sich die Frage auf, ob eine Genom-Sequenzierung zukünftig das Neugeborenen-Screening ersetzen könnte, um Varianten zu identifizieren, welche mit einem hohen Risiko verbunden sind eine Erkrankung zu entwickeln. Diese Varianten könnten im Idealfall für vermeidbare oder behandelbare Erkrankungen verantwortlich sein. (48)

Im Baby-Seq Projekt beispielsweise konnte in drei der eingeschlossenen 159 Kinder, welche ein unauffälliges Standard Neugeborenen-Screening durchlaufen hatten, mittels WES eine pathogene Variante krankheitsassoziiertes Gene für Erkrankungen, welche auch im Neugeborenen-Screening enthalten waren, nachgewiesen werden. (15)

In eine der größten angelegten Vergleichsstudie zum Neugeborenen-Screening wurden in Kalifornien die bisher standardmäßig im Einsatz stehende Tandemmassenspektrometrie mit Whole-Exome-Sequencing verglichen. Im NBSeq Projekt wurden von 4,5 Millionen Neugeborenen zwischen 2005 und 2013 über 1700 Trockenblutfilterkarten herangezogen. Weiters wurde ein Set von Neugeborenen etabliert, welche initial ein positives Testergebnis erhielten im Verlauf aber negativ auf die Erkrankung waren. Analysiert wurden in Folge 1190 Exome von 805 erkrankten Neugeborenen und 385 durch Tandemmassenspektrometrie falsch positiv getesteter Neugeborener. WES hatte eine Gesamtsensitivität von 88 Prozent und eine Spezifität von 98,4 Prozent,

verglichen mit 99,0 Prozent bzw. 99,8 Prozent für die Standardtestung. Insgesamt zeigte sich zusammenfassend eine deutlich geringere Sensitivität und Spezifität von WES als mit Massenspektrometrie. (49)

Die Sensitivität von WES allein war möglicherweise zu gering, eine Sequenzierung könnte jedoch viele behandelbare Erkrankungen identifizieren, vor allem Mendelsche Erkrankungen, die oft unerkannt bleiben. Eine Genomsequenzierung wäre als Sekundärtest nach einem positiven Standardtestergebnis wirtschaftlich interessant. (49)

Durch Whole-Genome-Sequencing würde man einen wesentlich weitreichenderen Informationsfluss als durch das konventionelle Neugeborenen-Screening erreichen und dadurch neben einer Ursache für symptomatische Neugeborene auch andere genetische Varianten finden, welche im Laufe des Lebens der Kinder zu Symptomen oder Erkrankungen führen könnten. Diese im Falle doch nebenbefundlich aufgetretenen Varianten können bezüglich der Prognose und klinischen Relevanz deutlich variieren. Obwohl rein aus technologischer als auch finanzieller Sicht zukünftig ein Whole-Genome-Sequencing als Neugeborenen-Screening durchaus vorstellbar wäre, stellt sich die Frage der Interpretation gefundener Varianten. Derzeit sind die Aufarbeitung und Interpretation von bisherigen Varianten mit unklarer Signifikanz mit einem großen Arbeitsaufwand verbunden und bringen oft keine klare Antwort. (48)

Jedoch könnten die Informationen, welche durch eine genomweite Sequenzierung in Zukunft gefunden werden können, quasi als Leitfaden für das Leben der PatientInnen herangezogen werden und so für Prognosen von möglichen Erkrankungen als auch zur Prophylaxe und Therapie dienen. (48)

Derart tiefgehende genetische Informationen können jedoch nicht nur für das Kind, sondern auch für potenziell betroffene Familienmitglieder herangezogen werden. Zusätzlich können genetische Informationen bezüglich des Auftretens von Erkrankungen oder Symptomen im Erwachsenenalter des Kindes zu präventiven Maßnahmen bereits in den ersten Lebensjahren führen und so möglicherweise den klinischen Outcome und die Lebensqualität verbessern. (48)

10.3 Herausforderungen

„Die Anwendung der Genomsequenzierung bei asymptomatischen Neugeborenen verschärft viele dieser Herausforderungen und wirft tiefgreifende gesellschaftliche Fragen über Schadensvermeidung, Wohltätigkeit, Autonomie und die Bewahrung der offenen Zukunft jedes Kindes auf.“ (48)

Eine genomweite Sequenzierung aller Neugeborenen wirft jedoch viele nicht nur finanzielle und technische, sondern auch ethische Fragen und Herausforderungen auf. In erster Linie ist derzeit aufgrund der eingeschränkten klinischen Interpretation gefundener Varianten mit unklarer Signifikanz eine genomweite Sequenzierung aller Neugeborenen mit zu hohem Arbeitsaufwand und zu wenig klinischer Relevanz verbunden. Insbesondere da bei vielen metabolischen Erkrankungen die Genotyp-Phänotyp Korrelation vor allem in der Neugeborenen Periode sehr divers ist. (47)

Weiters ist die Dauer von der Probengewinnung bis zur Befundübermittlung in vielen Fällen, insbesondere bei Erkrankungen, welche aktuell im Neugeborenen-Screening untersucht werden, essenziell für das Outcome der Kinder. Eine genomweite Sequenzierung wäre bis dato an vielen Standorten der genetischen Diagnostik mit der Probenanzahl überlastet und die Dauer bis zur Befundübermittlung zu lange. Eine Verkürzung der diagnostischen Technologien wäre jedoch mit enormen Kosten verbunden und würde auch die Dauer der Interpretation gefundener Varianten nicht verändern. (48)

Doch nicht nur bekannt pathogene Varianten und Erkrankungen könnten mit der Genomsequenzierung als Screening nachgewiesen werden, auch der Trägerstatus für beispielsweise die Zystische Fibrose könnte hiermit nachgewiesen werden. Die Stigmatisierung von Kindern, welche als Carrier für verschiedene Erkrankungen in dieser Form des Screeningverfahrens identifiziert werden könnten, wäre somit vorprogrammiert. Das Kind hat hierbei auch kein Mitentscheidungsrecht. Zusätzlich könnte es hierbei zudem zu Veränderungen im familiären Setting und zu überflüssigen Behandlungsmaßnahmen kommen. (47)

Gerade hinsichtlich der zukünftigen Themen dazu, wie Versicherung und Speicherung sowie Weitergabe von Daten, werfen sich viele ethische Fragen auf. Die Speicherung solch großer Datenmengen würde eine große Herausforderung darstellen. Diese könnte zwar somit im Laufe des Lebens des Kindes jederzeit

erneut für diagnostische Zwecke herangezogen werden, jedoch ist die Frage des Datenschutzes für die Sicherung des Zugriffs auf diese privaten Daten nicht geklärt. Derzeit ist es kaum vorstellbar eine anonyme Speicherung dieser sensiblen Daten zu garantieren. Die Kosten für eine solche sind derzeit auch nicht kalkulierbar. (47)

Ein Neugeborenes sollte genau wie jeder Erwachsene das Recht auf Nicht-Wissen sowie das Recht auf Einwilligung im zustimmungsfähigen Alter besitzen dürfen. In vorliegendem Szenario würde jedoch die Entscheidung bei den Eltern liegen, welche aber gerade in Hinblick auf die weitere Verarbeitung der genomischen Daten eine lebenslange Konsequenz hätte. In erster Linie müsste in diesem Fall jedes Elternpaar eine weitreichende Aufklärung erhalten. Zudem müssten persönliche Präferenzen, insbesondere bezüglich des Auffindens unklarer Varianten oder Varianten mit einer klinischen Relevanz im späteren Leben des Kindes sowie der Speicherung der Daten für einen späteren Gebrauch, berücksichtigt werden. Dies wirft jedoch große ethische Fragen auf, wie zum Beispiel inwieweit die Befundübermittlung bezüglich des Erwachsenenalters des Kindes betreffend, den Eltern zukommen sollte. Die größte Herausforderung würde hier die Grenzen der Befundübermittlung und der Weite der genetischen Diagnostik darstellen. (47) (48)

Die vollständige Genomsequenzierung könnte in Zukunft für seltene genetische Erkrankungen als diagnostisches Mittel der Wahl infrage kommen, vor allem für jene Erkrankungen, welche bis dato nicht im konventionellen Neugeborenen-Screening detektiert werden können. Welche Erkrankungen hierbei jedoch herangezogen werden sollten ist abhängig von der klinischen Relevanz, insbesondere möglicher klinischer Präventionsmaßnahmen und Therapien. Weiters müssten der Schweregrad, die Penetranz und der Beginn der Erkrankungen miteinbezogen werden. Die Konsequenz daraus ist, dass krankheitsverursachende Varianten, welche effektive Therapieoptionen und präventive Maßnahmen haben, in diese Form des Screenings miteinbezogen werden könnten. Dies würde jedoch eher Genpanels als einer gesamten Genomsequenzierung entsprechen. (47)

Zusätzlich könnte bei einem Screening-Verfahren mittels Genomsequenzierung der Trägerstatus für verschiedene rezessive Erkrankungen nachgewiesen werden, welches wie bereits erwähnt eine weitere ethische Frage der Befundübermittlung aufwirft. (48)

Die größte Herausforderung würde jedoch der fraglich positive und negative prädiktive Wert der Genomsequenzierung darstellen. Bis dato ist wenig zu diesen in der Genomsequenzierung asymptomatischen PatientInnen bekannt. Es muss wohlüberlegt sein, wie hoch die Sensitivität einer Sequenzanalyse verschiedener Erkrankungen im Vergleich zu herkömmlichen Testverfahren ist, da diese möglicherweise niedriger sein könnte. (47)

Das Auffinden möglicherweise pathogener Varianten oder Varianten unklarer Signifikanz stellt eine große Herausforderung in der Befundübermittlung dar. Die Frage, welche Zufallsbefunde, also Varianten, die nicht der klinischen Fragestellung entsprechen, übermittelt werden sollten und welche nicht ist schwer zu beantworten. (47)

Insbesondere falsch-positive Ergebnisse würden zukünftig zu einem enormen Kostenaufwand als auch zu unnötigen Behandlungen und Belastungen führen. Ziel der Genomsequenzierung wäre es Phänotyp-abhängiges klinisches Management mit Genotyp-basierter Therapie zu verbinden. (35) (48)

Da die positive Vorhersagewahrscheinlichkeit bei WGS niedrig ist, zeigt sich dennoch bei diesem hochspezifischen Test ein hoher Level an falsch positiven Ergebnissen.

Nach wie vor muss genauestens überprüft und überarbeitet werden, ob und wenn ja, welche Sequenzieretechnologien in das Neugeborenen-Screening zukünftig eingebunden werden könnten und sollten.

Die Rentabilität bei stetig steigender Nachfrage und Kostenreduktion genetischer Tests in unserem Gesundheitssystem ist fraglich. Auch wenn die Technologien, insbesondere in Bezug auf die Genomsequenzierung, immer kostengünstiger werden, ist die Interpretation gefundener Varianten und die Befundübermittlung mit einem hohen Personalaufwand und Ausbildungsaufwand derer verbunden. Die Kosten für die Datenspeicherung sowie Sicherung dieser sind schwer kalkulierbar. Weiters gilt es die Kosten für nachfolgende Untersuchungen wie Bestätigungstestungen zu bedenken. Den Einfluss einer solchen Diagnostik, insbesondere bei Varianten unklarer Signifikanz und Carrier-Status, auf die Familie sowie das spätere Leben des Kindes, welches ein Recht auf Nicht-Wissen haben

sollte, ist weitreichend. Rein den Vorteil einer Diagnostik für Forschung oder weitere Familienmitglieder sowie die Eltern zu bedenken wäre fatal.

Es sollten nur Varianten beziehungsweise Erkrankungen in die Diagnostik miteinbezogen oder in Folge an die Eltern übermittelt werden, durch welche das betroffene Kind einen unmittelbaren oder im Kindesalter zeitnahen Benefit erfährt. Sei dies durch therapeutische oder präventive Maßnahmen. Daher ist es essenziell vor einer solch weitreichenden genetischen Diagnostik ein weitreichendes Aufklärungsgespräch mit den betroffenen Eltern zu führen und diese über das Testverfahren, die Ergebnisse sowie deren Folgen physischer und psychischer Natur genauestens zu informieren. Weiters muss eine Aufklärung über nebenbefundlich gefundene Varianten und deren Konsequenz erfolgen.

Im Zusammenhang mit dem Neugeborenen-Screening erbringen die neuesten NGS Technologien hohe Erwartungen bezüglich des Potenzials dieser weitreichenden diagnostischen Möglichkeit. Bis der weitläufige Einsatz jedoch möglich ist müssen noch viele rechtliche, soziale, ethische und finanzielle Aspekte geklärt werden.

Literaturverzeichnis

1. Bourn D. Diagnostic Genetic Testing: Core Concepts and the Wider Context for Human DNA Analysis: Springer International Publishing; 2021.
2. Muriello M. Exome and Whole Genome Sequencing in the Neonatal Intensive Care Unit. *Clin Perinatol.* 2022;49(1):167-79.
3. Verma RP. Evaluation and Risk Assessment of Congenital Anomalies in Neonates. *Children (Basel).* 2021;8(10).
4. Moorthie S, Blencowe H, Darlison MW, Lawn J, Morris JK, Modell B, et al. Estimating the birth prevalence and pregnancy outcomes of congenital malformations worldwide. *J Community Genet.* 2018;9(4):387-96.
5. Saunders CJ, Miller NA, Soden SE, Dinwiddie DL, Noll A, Alnadi NA, et al. Rapid whole-genome sequencing for genetic disease diagnosis in neonatal intensive care units. *Sci Transl Med.* 2012;4(154):154ra35.
6. Janvier A, Barrington K, Lantos J. Next generation sequencing in neonatology: what does it mean for the next generation? *Hum Genet.* 2022;141(5):1027-34.
7. Konstantopoulou V, Greber-Platzer S, Zeyda M. Österreichisches Neugeborenen-Screening – Früherkennung von Vitamin-B12-Mangel im Fokus. *Pädiatrie & Pädologie.* 2021;56(4):163-7.
8. Elliott AM, du Souich C, Lehman A, Guella I, Evans DM, Candido T, et al. RAPIDOMICS: rapid genome-wide sequencing in a neonatal intensive care unit—successes and challenges. *Eur J Pediatr.* 2019;178(8):1207-18.
9. Farnaes L, Hildreth A, Sweeney NM, Clark MM, Chowdhury S, Nahas S, et al. Rapid whole-genome sequencing decreases infant morbidity and cost of hospitalization. *NPJ Genom Med.* 2018;3:10.
10. Petrikin JE, Willig LK, Smith LD, Kingsmore SF. Rapid whole genome sequencing and precision neonatology. *Semin Perinatol.* 2015;39(8):623-31.
11. Wright CF, FitzPatrick DR, Firth HV. Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children. *Nature Reviews Genetics.* 2018;19(5):253-68.
12. French CE, Delon I, Dolling H, Sanchis-Juan A, Shamardina O, Mégy K, et al. Whole genome sequencing reveals that genetic conditions are frequent in intensively ill children. *Intensive Care Med.* 2019;45(5):627-36.
13. Organization WH. Birth Defects Surveillance Training: Facilitator's Guide: World Health Organization; 2016.
14. Wojcik MH, Stadelmaier R, Heinke D, Holm IA, Tan WH, Agrawal PB. The Unrecognized Mortality Burden of Genetic Disorders in Infancy. *Am J Public Health.* 2021;111(S2):S156-s62.
15. Ceyhan-Birsoy O, Murry JB, Machini K, Lebo MS, Yu TW, Fayer S, et al. Interpretation of Genomic Sequencing Results in Healthy and Ill Newborns: Results from the BabySeq Project. *Am J Hum Genet.* 2019;104(1):76-93.

16. Gorzynski JE, Goenka SD, Shafin K, Jensen TD, Fisk DG, Grove ME, et al. Ultrarapid Nanopore Genome Sequencing in a Critical Care Setting. *N Engl J Med*. 2022;386(7):700-2.
17. Murken JD, Grimm T, Holinski-Feder E, Zerres K. Taschenlehrbuch Humangenetik: Thieme; 2017.
18. Moog U, Rieß O. Medizinische Genetik für die Praxis: Diagnostik, Beratung, Fallbeispiele: Thieme; 2014.
19. Hays T, Wapner RJ. Genetic testing for unexplained perinatal disorders. *Curr Opin Pediatr*. 2021;33(2):195-202.
20. Kingsmore SF, Cakici JA, Clark MM, Gaughran M, Feddock M, Batalov S, et al. A Randomized, Controlled Trial of the Analytic and Diagnostic Performance of Singleton and Trio, Rapid Genome and Exome Sequencing in Ill Infants. *Am J Hum Genet*. 2019;105(4):719-33.
21. Farwell KD, Shahmirzadi L, El-Khechen D, Powis Z, Chao EC, Tippin Davis B, et al. Enhanced utility of family-centered diagnostic exome sequencing with inheritance model-based analysis: results from 500 unselected families with undiagnosed genetic conditions. *Genet Med*. 2015;17(7):578-86.
22. Yang L, Wei Z, Chen X, Hu L, Peng X, Wang J, et al. Use of medical exome sequencing for identification of underlying genetic defects in NICU: Experience in a cohort of 2303 neonates in China. *Clin Genet*. 2022;101(1):101-9.
23. Dillon OJ, Lunke S, Stark Z, Yeung A, Thorne N, Gaff C, et al. Exome sequencing has higher diagnostic yield compared to simulated disease-specific panels in children with suspected monogenic disorders. *Eur J Hum Genet*. 2018;26(5):644-51.
24. Stark Z, Tan TY, Chong B, Brett GR, Yap P, Walsh M, et al. A prospective evaluation of whole-exome sequencing as a first-tier molecular test in infants with suspected monogenic disorders. *Genet Med*. 2016;18(11):1090-6.
25. Powis Z, Farwell Hagman KD, Speare V, Cain T, Blanco K, Mowlavi LS, et al. Exome sequencing in neonates: diagnostic rates, characteristics, and time to diagnosis. *Genet Med*. 2018;20(11):1468-71.
26. Meng L, Pammi M, Saronwala A, Magoulas P, Ghazi AR, Vetrini F, et al. Use of Exome Sequencing for Infants in Intensive Care Units: Ascertainment of Severe Single-Gene Disorders and Effect on Medical Management. *JAMA Pediatr*. 2017;171(12):e173438.
27. Wu ET, Hwu WL, Chien YH, Hsu C, Chen TF, Chen NQ, et al. Critical Trio Exome Benefits In-Time Decision-Making for Pediatric Patients With Severe Illnesses. *Pediatr Crit Care Med*. 2019;20(11):1021-6.
28. Wang H, Qian Y, Lu Y, Qin Q, Lu G, Cheng G, et al. Clinical utility of 24-h rapid trio-exome sequencing for critically ill infants. *NPJ Genom Med*. 2020;5:20.
29. Lunke S, Eggers S, Wilson M, Patel C, Barnett CP, Pinner J, et al. Feasibility of Ultra-Rapid Exome Sequencing in Critically Ill Infants and Children With Suspected Monogenic Conditions in the Australian Public Health Care System. *Jama*. 2020;323(24):2503-11.

30. Freed AS, Clowes Candadai SV, Sikes MC, Thies J, Byers HM, Dines JN, et al. The Impact of Rapid Exome Sequencing on Medical Management of Critically Ill Children. *J Pediatr*. 2020;226:202-12.e1.
31. Chung CCY, Leung GKC, Mak CCY, Fung JLF, Lee M, Pei SLC, et al. Rapid whole-exome sequencing facilitates precision medicine in paediatric rare disease patients and reduces healthcare costs. *Lancet Reg Health West Pac*. 2020;1:100001.
32. Sanford EF, Clark MM, Farnaes L, Williams MR, Perry JC, Ingulli EG, et al. Rapid Whole Genome Sequencing Has Clinical Utility in Children in the PICU. *Pediatr Crit Care Med*. 2019;20(11):1007-20.
33. Clark MM, Hildreth A, Batalov S, Ding Y, Chowdhury S, Watkins K, et al. Diagnosis of genetic diseases in seriously ill children by rapid whole-genome sequencing and automated phenotyping and interpretation. *Sci Transl Med*. 2019;11(489).
34. Mestek-Boukhibar L, Clement E, Jones WD, Drury S, Ocaka L, Gagunashvili A, et al. Rapid Paediatric Sequencing (RaPS): comprehensive real-life workflow for rapid diagnosis of critically ill children. *J Med Genet*. 2018;55(11):721-8.
35. Willig LK, Petrikin JE, Smith LD, Saunders CJ, Thiffault I, Miller NA, et al. Whole-genome sequencing for identification of Mendelian disorders in critically ill infants: a retrospective analysis of diagnostic and clinical findings. *Lancet Respir Med*. 2015;3(5):377-87.
36. Wang H, Lu Y, Dong X, Lu G, Cheng G, Qian Y, et al. Optimized trio genome sequencing (OTGS) as a first-tier genetic test in critically ill infants: practice in China. *Hum Genet*. 2020;139(4):473-82.
37. van Diemen CC, Kerstjens-Frederikse WS, Bergman KA, de Koning TJ, Sikkema-Raddatz B, van der Velde JK, et al. Rapid Targeted Genomics in Critically Ill Newborns. *Pediatrics*. 2017;140(4).
38. Petrikin JE, Cakici JA, Clark MM, Willig LK, Sweeney NM, Farrow EG, et al. The NSIGHT1-randomized controlled trial: rapid whole-genome sequencing for accelerated etiologic diagnosis in critically ill infants. *NPJ Genom Med*. 2018;3:6.
39. Wu B, Kang W, Wang Y, Zhuang D, Chen L, Li L, et al. Application of Full-Spectrum Rapid Clinical Genome Sequencing Improves Diagnostic Rate and Clinical Outcomes in Critically Ill Infants in the China Neonatal Genomes Project. *Crit Care Med*. 2021;49(10):1674-83.
40. Daoud H, Luco SM, Li R, Bareke E, Beaulieu C, Jarinova O, et al. Next-generation sequencing for diagnosis of rare diseases in the neonatal intensive care unit. *Cmaj*. 2016;188(11):E254-e60.
41. Dimmock DP, Clark MM, Gaughran M, Cakici JA, Caylor SA, Clarke C, et al. An RCT of Rapid Genomic Sequencing among Seriously Ill Infants Results in High Clinical Utility, Changes in Management, and Low Perceived Harm. *Am J Hum Genet*. 2020;107(5):942-52.
42. Dimmock D, Caylor S, Waldman B, Benson W, Ashburner C, Carmichael JL, et al. Project Baby Bear: Rapid precision care incorporating rWGS in 5 California children's hospitals demonstrates improved clinical outcomes and reduced costs of care. *Am J Hum Genet*. 2021;108(7):1231-8.

43. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016;17(6):333-51.
44. Bundesgesetz, mit dem Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen, das Freisetzen und Inverkehrbringen von gentechnisch veränderten Organismen und die Anwendung von Genanalyse und Gentherapie am Menschen geregelt werden (Gentechnikgesetz – GTG) StF: BGBl. Nr. 510/1994
45. Janvier A, Lantos J, Aschner J, Barrington K, Batton B, Batton D, et al. Stronger and More Vulnerable: A Balanced View of the Impacts of the NICU Experience on Parents. *Pediatrics.* 2016;138(3).
46. Cakici JA, Dimmock DP, Caylor SA, Gaughran M, Clarke C, Triplett C, et al. A Prospective Study of Parental Perceptions of Rapid Whole-Genome and -Exome Sequencing among Seriously Ill Infants. *Am J Hum Genet.* 2020;107(5):953-62.
47. Howard HC, Knoppers BM, Cornel MC, Wright Clayton E, Sénécal K, Borry P. Whole-genome sequencing in newborn screening? A statement on the continued importance of targeted approaches in newborn screening programmes. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(12):1593-600.
48. Berg JS, Agrawal PB, Bailey DB, Jr., Beggs AH, Brenner SE, Brower AM, et al. Newborn Sequencing in Genomic Medicine and Public Health. *Pediatrics.* 2017;139(2).
49. Adhikari AN, Gallagher RC, Wang Y, Currier RJ, Amatuni G, Bassaganyas L, et al. The role of exome sequencing in newborn screening for inborn errors of metabolism. *Nat Med.* 2020;26(9):1392-7.