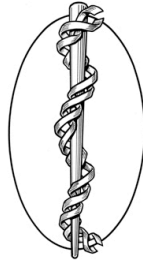


*The Swedish Society of
Medical Genetics*



*Svensk Förening för
Medicinsk Genetik*

RIKTLINJER FÖR KVALITETSSÄKRING I KLINISK GENETISK VERKSAMHET

Dessa riktlinjer är antagna av Svensk Förening för Medicinsk Genetik
2011-01-27 och ersätter tidigare riktlinjer daterade 2002-01-26

INLEDNING

Specialiteten klinisk genetik omfattar genetiska faktorerens betydelse för uppkomsten av medfödda och förvärvade sjukdomar, missbildningar och utvecklingsrubbnings hos människan. Sjukdomspanoramata har förändrats avsevärt i vårt land under 1900-talets senare del så att de genetiskt betingade tillstånden har ökat i betydelse. Idag känner vi till *minst* 7000 sjukdomar som beror på genförändringar. Vidare har ca 0,7 % av alla barn som föds en kromosomavvikelse. Sambanden mellan genetik och miljö har börjat klarläggas vid flera vanliga sjukdomar som exempelvis allergi, cancer, diabetes, hypertoni och schizofreni. Man beräknar att 5 – 10 procent av befolkningen under sin livstid får en sjukdom som helt eller delvis är genetiskt betingad. Utvecklingen inom genetiken har under de senaste åren varit mycket snabb inom såväl cytogenetik som molekylärgenetik, vilket givit helt nya förutsättningar för diagnostik, förebyggande insatser och behandling.

En fullvärdig klinisk genetik verksamhet skall omfatta både laboratorieservice, omhändertagande av patienter (genetisk vägledning) och konsultverksamhet till hälso- och sjukvården. Laboratorieverksamheten skall omfatta såväl cytogenetiska som molekylärcytogenetiska och molekylärgenetiska analyser; alternativt skall avtal finnas med andra enheter där verksamhet bedrivs med beaktande av samma kvalitetsnormer som laboratoriet ställer på sig själv. Den patientrelaterade verksamheten skall omfatta mottagnings- och konsultverksamhet. Av stor vikt är hur informationen till patienter och anhöriga överbringas och följs upp, med beaktande av såväl den genetiska informationen som erbjudande om kliniska uppföljningsprogram för personer med genetiskt ökad risk för sjukdom. En läkare vid en klinisk genetik enhet skall också som konsult bistå specialister inom andra medicinska verksamhetsområden vid utredning av genetiska eller presumtivt genetiska sjukdomar, missbildningar och utvecklingsrubbnings. Detta inkluderar även att kunna ge genetiska synpunkter vid utredning och behandling av tumörsjukdomar.

Kraven för att som läkare uppnå specialistkompetens i ämnet har fastställts av Socialstyrelsen (SOSFS 2008:17) <http://www.socialstyrelsen.se/sosfs/2008-17> "Om läkarnas specialiseringstjänstgöring". Socialstyrelsen har också i sin rapport "Genetik och genteknik inom hälso- och sjukvården" (SoS-rapport 1999:12) sammanställt en översikt av kompetenskrav och utbildning för personal som arbetar med genetisk informationsöverföring och vägledning inom hälso- och sjukvården. Med hänsyn till den snabba utvecklingen inom verksamhetsområdet är det av största vikt att såväl kliniskt genetiskt verkamma läkare som annan personal kontinuerligt har möjlighet till fortbildning för att kunna upprätthålla sin kompetens.

Klinisk genetik verksamhet skall omfattas av ett kvalitetssystem som syftar till att upprätthålla god kvalitet inom alla grenar av verksamheten, såväl laboratorieservice, patientomhändertagande som konsultverksamhet och kompetensutveckling.

Kvalitetsarbetet för klinisk genetik verksamhet i Sverige rekommenderas, förutom att vara anpassat till SOSFS 2005:12(M) "Ledningssystem för kvalitet och patientsäkerhet i hälso- och sjukvården" http://www.socialstyrelsen.se/sosfs/2005-12/Documents/2005_12.pdf, följa dessa övergripande riktlinjer som antagits av Svensk förening för medicinsk genetik (SFMG) den 27 januari 2011.

Andra styrdokument för kvalitetsarbetet vid svenska kliniskt genetiska enheter är riktlinjer utarbetade av:

- European Cytogeneticists Association, ECA. Workgroup for Cytogenetics and Society. <http://www.biologia.uniba.it/eca/NEWSLETTER/NS-17/03-Guidelines.html>
- European Molecular Genetic Quality Network, EMQN. <http://www.EMQN.org>
- European Society of Human Genetics, ESHG www.ESHG.org/PPPC
- Council of Europe. Additional Protocol to the Convention on Human Rights and Biomedicine, concerning Genetic Testing for Health Purposes. 2008. CETS No. 203. <http://conventions.coe.int/Treaty/EN/Reports/Html/203.htm>
- OECD Guidelines for Molecular Genetic Testing. OECD 2007. <http://www.oecd.org/dataoecd/43/6/38839788.pdf>

Verksamheterna bör i vad mån det är möjligt vara ackrediterade enligt ISO/EN 15189, ISO/EN 17025, eller motsvarande standard.

ORGANISATION

- Verksamheten skall ha en medicinskt ansvarig ledningsläkare med svensk legitimation och i Sverige godkänd specialistkompetens i klinisk genetik. Mot bakgrund av den snabba kunskapsutvecklingen inom ämnet bör den medicinskt ansvarige ha egen självständig forskningserfarenhet inom ämnesområdet. Om enheten har delegerat ansvar till metodansvariga personer under enhetschefen, t.ex. sjukhusgenetiker (cytogenetiker, molekylärgenetiker, kemister, etc.), bör dessa ha doktorsexamen.
- Personal skall ha för verksamheten adekvat utbildning och utrustning.
- Sådan klinisk verksamhet som utförs vid forskningsenheter skall omfattas av samma kvalitets- och sekretesskrav som gäller inom sjukvården.
- Alla medarbetares kompetens skall fortlöpande dokumenteras; ansvar och befogenheter, inklusive delegeringar och delegeringsregler, skall vara fastställda i skriftliga instruktioner.
- Enheten skall ha en dokumenterad organisationsplan som anger laboratoriets verksamhetsområde, arbetsfördelning och arbetstagarnas befogenheter. Det skall också finnas en plan som anger den minimikompetens som den enskilde arbetstagaren skall besitta för att självständigt få utföra en analys.
- Verksamheten skall ha angivna mål för personaltäthet inom olika delar av verksamheten.
- Spårbarhet i analysarbetet skall vara en regel. Det skall gå att ta reda på vem som gjort vad, när och enligt vilken metod.
- Journalmaterial inom mottagningsverksamheten skall arkiveras utan tidsbegränsning.
- Verksamheten skall bedrivas i lokaler som säkerställer kvalitetskraven.
- Verksamheten skall vara organiserad så att utvärdering är möjlig.
- Den forskning och utveckling som bedrivs inom en klinisk genetisk enhet skall denna organisatoriskt vara tydligt avgränsad från rutinsjukvård.

GENERELLA KRAV PÅ LABORATORIEANALYSER OCH MOTTAGNINGSVERKSAMHET

De krav som anges på laboratorieanalyser nedan avser endast analyser som inkluderats i den rutinmässiga sjukvårdsverksamheten.

- Alla laboratorieanalyser skall utföras enligt metoder som är vetenskapligt dokumenterade och för ändamålet accepterade i internationell praxis.
- Verksamhetens omfattning skall vara sådan att den tillgodoser tillräcklig bemanning t.ex. vid semester, sjukdom.
- För att förhindra avbrott i verksamheten skall nyckelutrustning vara dubblerad. Alternativt skall det finnas avtal som säkerställer att analyser kan utföras även om instrument inte fungerar.
- Material som inköps för verksamheten skall uppfylla EC-standard och kunna ingå i ackrediterade system.
- Laboratoriet skall regelbundet samla och utvärdera kvalitetsparametrar. Svarstiden ("Turn-around-time") bör ingå som en av de kvalitetsparametrar som beskrivs. Andra parametrar kan vara avvikelser och analysmängd.
- Remisser skall före analys bedömas av läkare.
- Skriftliga provhanteringsanvisningar skall finnas.
- Skriftliga metodbeskrivningar skall finnas.
- Alla analysresultat skall verifieras av minst 2 oberoende personer.
- Rutiner för uppdatering av provhanteringsanvisningar och metodbeskrivningar skall finnas.
- Bildmaterial, preparat och annan provdokumentation skall arkiveras på lämpligt, dokumenterat sätt.
- Rutiner för långtidsförvaring av provmaterial skall finnas.
- För återkommande analysresultat skall "standardsvar" formuleras så att svarstexten är entydig, enhetlig och lika resultat besvaras på samma sätt.
- Mottagningsverksamhet skall bedrivas i särskilda lokaler lämpade för samtal och anpassade för både barn och vuxna, enskilt såväl som i grupp.
- Mottagningslokaler skall vara anpassade för barn och personer med funktionshinder.

RIKTLINJER FÖR KVALITETSSÄKRING INOM MOTTAGNINGSVERKSAMHET

Den patientrelaterade verksamheten omfattar mottagnings- och konsultverksamhet. Konsultverksamhet innebär, förutom handläggning av remissförfrågningar och syndromutredningar, telefon och brevkonsultationer till sjukvården och allmänheten.

Vid en klinisk genetisk enhet skall den som söker information om ärftlig sjukdom, egen eller hos familjemedlem, erbjudas såväl genetisk information om tillståndets ärftlighet baserat på bästa möjliga tillgängliga kunskap, riskbedömning att drabbas för egen del och för nära släktingar, som information och erbjudande om uppföljnings- och/eller behandlingsprogram. Den vård sökande skall också erbjudas psykosocialt stöd i att hantera den kunskap de får om

egna eller andras sjukdomsrisker samt stöd i att sprida kunskapen om sjukdomen till andra släktingar.

MOTTAGNINGSVERKSAMHET

- Ansvaret för mottagningsverksamheten ska innehas av läkare med i Sverige godkänd specialistkompetens i klinisk genetik och med erfarenhet av genetisk vägledning.
- Informationen vid genetisk vägledning till patienten skall vara neutral och objektiv. Patienten ska erbjudas allsidig information om diagnostik, riskbedömning, prognostisk bedömning och upplysning om de möjligheter till uppföljningsprogram och terapi som finns tillgängliga.
- Verksamheten ska bedrivas på sådant sätt att patientens psykosociala situation, inklusive krisbearbetning, kan tas om hand. Detta kan ske i klinikens egen regi eller i samråd med andra sjukvårdande insatser. För att kunna erbjuda bästa möjliga psykosociala stöd rekommenderas att personer med kompetens i genetisk vägledning är anknutna till mottagningen.
- Vid anlagsbärrundersökningar bör samarbetsformer med relevanta specialister inom andra verksamhetsområden ha upprättats för att kunna erbjuda patienter bästa möjliga information före och efter genetisk utredning; t.ex. bör vid Huntingtons sjukdom finnas upparbetade kontakter med specialister i neurologi.
- Personer som lämnar prov på mottagningen endera för egen eller anhörigs del för molekyलगenetiska utredningar, ska vara informerade om betydelsen av en eventuell funnen mutation. Medgivande för analysen och tillåtelse att använda information till andra släktingar skall dokumenteras.
- Handläggningstiden för brevkonsultationer och syndromutredningar bör inte överskrida 4 veckor.
- Väntetiden efter provtagning för anlagsbärrundersökning till svar finns tillgängligt bör inte överskrida 4-6 veckor.
- Verksamheten ska bedrivas kontinuerligt med regelbundna mottagningstillfällen. Patienter ska i akuta situationer kunna erbjudas kontakt med läkare inom en vecka. I normalfallet bör väntetiden inte överskrida tre månader. För utredning av komplexa genetiska sjukdomstillstånd där insamling av familjedata kravs för bedömning tex vid onkogenetiska utredningar, skall patienten ha fått information om fortsatt utredningsgång inom tre veckor.
- Inkomna remisser skall granskas och bedömas inom 1 vecka av läkare med specialistkompetens i klinisk genetik.

KONSULTVERKSAMHET

- Konsultverksamheten omfattar dels patientrelaterade frågor dels allmän information om genetiska sjukdomar både sjukvården och allmänheten. Informationen ges genom muntliga svar eller, som mer omfattande utredningar, med skriftliga svar. Konsultverksamheten omfattar även sammottagningar, ronder och konferenser. Journalföring sker liksom för mottagningsverksamheten enligt lokala föreskrifter.

RIKTLINJER FÖR KVALITETSSÄKRING I LABORATORIEVERKSAMHET

Cytogenetik

GENERELLA RIKTLINJER

- Cytogenetisk analys, baserad på ljusmikroskopi, i syfte att undersöka förekomsten av konstitutionella eller förvärvade kromosomavvikelser, ska utföras med någon metod för detaljerad kromosombandning (G-band, Q-band eller R-band). Undantaget detta är bl.a. undersökning av frekvensen kromosomskador vid misstanke om kromosombrottssyndrom.
- Analysen ska baseras på granskning av hela kromosomkomplementet, även om frågeställningen är riktad mot någon enskild kromosom.
- Eventuella kromosomavvikelser bör studeras på en resolutionsnivå som är adekvat för den aktuella frågeställningen, med hänsyn tagen till den undersökta typen av provmaterial.
- Analysresultatet ska baseras på minst 2 kvalificerade personers bedömning.
- Kromosomavvikelser och karyotyper ska beskrivas enligt rekommendationerna i An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). De klonalitetsskriterier som definieras i ISCN ska tillämpas.
- Bilddokument av analyserade metafaser eller preparat ska arkiveras från varje patient.
- Personalen som utför cytogenetisk analys ska ha tillgång till adekvat utrustning och ska ha adekvat utbildning. Det ska finnas ett skrivet regelverk som styr den interna utbildningens teoretiska och praktiska inriktning och omfattning för nyanställd personal samt upprätthållande och utveckling av kompetens för befintlig personal. Utbildningen ska vara förenad med någon form av objektiv kompetenskontroll.
- Använd utrustning ska vara testad och godkänd samt ska ha årlig service och ska däremellan kontrolleras och kalibreras regelbundet. Övervakningslarm avseende temperatur och gasblandning ska finnas på inkubatorer.
- Arbetet ska bedrivas i enlighet med upprättade dokument som klart och entydigt beskriver arbetsgången och säkerhetsaspekter avseende såväl provmaterial som personal.
- System och rutiner för avvikelshantering ska finnas.
- Rutiner för vitalfrysning eller frysning av celler i fixativ ska finnas.

TEKNISKA RIKTLINJER

- Analysarbetets omfattning styrs av frågeställning, val av analysmetod(er) och de fynd som görs vid analysen. Olika frågeställningar är kopplade till olika minimiantal metafaser som bör analyseras. Särskilda fynd kan föranleda utvidgad cytogenetisk analys av fler metafaser eller kompletterande analys med andra bandningsmetoder, FISH eller molekylärgenetiska metoder. I vissa analysituationer är cytogenetisk analys ett komplement till andra analyser.
- Riktlinjer måste vara robusta och enkla att tillämpa i det vardagliga arbetet och har därför utformats utan försök till heltäckande detaljrikedom. Alla tänkbara utfall kan inte förutses varför flexibla lösningar grundade på medicinsk bedömning och erfarenhet får tillgripas i sådana fall. Nedan anges generella riktlinjer och kommenteras vissa särskilda omständigheter.

1. AMNIONVÄTSKA/KORIONBIOPSI - konstitutionell kromosomavvikelse

- Minst två kulturer bör sättas upp från det insända provmaterialet.
- Cellerna från de olika kulturerna bör odlas i olika batcher av samma medium eller i olika medier och i skilda inkubatorer.
- Korionbiopsi: Odling mer än ett dygn bör företrädesvis användas – direktpreparering eller odling över natt bör endast undantagsvis tillgripas för analys med kromosombandning, men kan vara att föredra för FISH-analys.
- Analys kan utföras antingen av preparat tillverkade från celler i suspension eller av *in situ* preparat eller en kombination därav. Om möjligt prioriteras analys av primärkulturer.
- Celler i odling ska finnas tillgängliga tills analysen är avslutad och svar har lämnats.

1.1 Kromosombandning enbart

A. Suspensionspreparat:

Bestäm kromosomtalet i minst 7 metafaser.
Dokumentera minst 2 av dessa metafaser på bild och identifiera samtliga kromosomer.
Fastställ bandresolutionen i minst 1 av de bästa metafaserna.

B. *In situ*:

Bestäm kromosomtalet i minst 7 metafaser.
Vid primärkultur ska metafaser från minst 5 kolonier väljas.
Dokumentera minst 2 av dessa metafaser på bild och identifiera samtliga kromosomer.
Fastställ bandresolutionen i minst 1 av de bästa metafaserna.

1.1.1 Normal kromosomuppsättning i samtliga metafaser:

Avsluta analysen.

1.1.2 Avvikande kromosomuppsättning i samtliga metafaser:

Analysera 3 metafaser från oberoende kultur.

- A. Om avvikelsen återfinns i samtliga metafaser avslutas analysen.
- B. Om annat fynd erhålls görs en medicinsk bedömning av vidare hantering.

1.1.3 Fynd, i åtminstone 1 metafase, av tillskott av kromosomerna 8, 9, 13, 18, 21, X eller Y och bortfall av X eller Y och förekomst av övertalig markörkromosom:

Utvidga analysen, avseende mosaicism, till sammanlagt minst 17 metafaser.

- A. Om avvikelsen inte återfinns avslutas analysen.
- B. Avvikelse återfinns i ytterligare 1 eller flera metafaser:
 - Analysera metafaser från oberoende kultur till sammanlagt minst 25 metafaser.
 - a. Om avvikelsen inte återfinns avslutas analysen.
 - b. Om avvikelsen återfinns, bedöms äkta mosaicism föreligga.

1.1.4 Fynd av 1 metafase med XY och övriga med XX:

Analysera minst 7 metafaser från oberoende kultur.

1.1.5 Fynd av 1 metafase med XX och övriga med XY:

Avsluta analysen.

1.1.6 Bortfall av samma autosom i 3 eller fler metafaser:

Avsluta analysen. Notera som klon men inkludera ej i karyotypen.

1.2 Kromosombandning som komplement till QF-PCR eller interfus-FISH

Bestäm kromosomtalet i minst 3 metafaser.

Identifiera samtliga kromosomer i minst 1 av dessa metafaser.

1.2.1 Om fynden är i överensstämmelse med tidigare resultat avslutas analysen.

1.2.2 Om fynden skiljer sig från tidigare resultat (normal → avvikande eller avvikande → normal):

Medicinskt ställningstagande, ev utökad cytogenetisk analys.

2. BLOD, POSTNATALT, MITOGENSTIMULERAT

Sedan celler satts till odling bör resterande blod förvaras i kylskåp tills analysen är slutförd och svar har lämnats.

2.1 Frågeställning: konstitutionell kromosomavvikelse – ospecificerat

Bestäm kromosomtalet i minst 7 metafaser.

Dokumentera minst 2 av dessa metafaser på bild och identifiera samtliga kromosomer.

Fastställ bandresolutionen i minst 1 av de bästa metafaserna.

2.1.1 Normal kromosomuppsättning i samtliga metafaser:

Avsluta analysen.

2.1.2 Avvikande kromosomuppsättning i samtliga metafaser:

A. Vid fynd som ej indikerar Turner syndrom:

Avsluta analysen.

B. Vid fynd som är förenligt med Turner syndrom:

Granska X kromosomerna i ytterligare metafaser, upp till sammanlagt minst 25 metafaser.

2.1.3 Kromosomavvikelse förenlig med Turner syndrom i åtminstone 1 metafaser:

Granska X-kromosomerna i ytterligare metafaser, upp till sammanlagt minst 25 metafaser.

2.1.4 Extra kopia av kromosomerna 8, 9, 13, 18, 21, X eller Y i åtminstone 1 metafaser:

Analysera ytterligare metafaser, upp till sammanlagt minst 17 metafaser.

A. Om avvikelsen inte återkommer:

Avsluta analysen.

B. Avvikelsen återfinns i ytterligare 1 eller flera metafaser:

Analysera ytterligare metafaser, upp till sammanlagt minst 25 metafaser.

2.1.5 Strukturell kromosomavvikelse i 1 metafaser

Medicinskt ställningstagande.

2.2 Frågeställning: konstitutionell kromosomavvikelse – Turner syndrom

Bestäm kromosomtalet i minst 7 metafaser.

Dokumentera minst 2 av dessa metafaser på bild och identifiera samtliga.

Granska X kromosomerna i ytterligare metafaser, upp till sammanlagt minst 25 metafaser.

Fastställbandresolutionen i minst 1 av de bästa metafaserna.

2.3 Frågeställning: kromosombrottssyndrom

Utför analysen blint på kodade preparat från patient samt köns- och helst även åldersmatchad kontroll.

Beräkna antal kromosomskador och andelen metafaser med skador i preparat från kulturer utan och med exposition för klastogent agens.

Analysera minst 50 metafaser från varje preparation.

3. ABORTRESTER / ÖVRIG POSTNATAL, ICKE-NEOPLASTISK VÄVNADSBIOPSI - konstitutionell kromosomavvikelse?

Analys kan utföras antingen av preparat tillverkade från celler i suspension eller av *in situ* preparat eller en kombination därav. Se **Amnionvätska / korionbiopsi**

4. BENMÄRG / OSTIMULERAT BLOD - förvärvad kromosomavvikelse

Antalet kärnförande celler i det insända provet bör bestämmas så att kulturer med kontrollerad celltäthet kan sättas upp.

Sätt, om möjligt, upp minst två kulturer från det insända provmaterialet för skörd vid olika tillfällen.

Eventuellt överblivet material bör bevaras på ett sätt som medger kompletterande molekylärgenetiska analyser.

4.1 Misstänkt hematologisk malignitet

Analysera i första hand preparat från benmärg om både benmärg och perifert blod erhållits. Beakta även metafaser av sämre kvalitet vid urvalet av metafaser för analys.

Analysera, om möjligt, 25 metafaser.

Karyotypera minst 2 av de analyserade metafaserna eller så många som krävs för att utreda förekommande avvikelser och kloner.

Dokumentera minst 2 metafaser från varje klon på bild.

Fastställ bandresolutionen i minst 1 av de bästa metafaserna.

4.2 Misstänkt infiltration av solid tumör i benmärg

Analysera, om möjligt, minst 10 metafaser eller, om inga klonala avvikelser kunnat påvisas bland dessa, upp till sammanlagt 25.

5. TUMÖRBIOPSI - förvärvad kromosomavvikelse

Sätt, om möjligt, upp minst två kulturer från det insända provmaterialet.

Analysera, om möjligt, 10 metafaser.

Karyotypera minst 2 av de analyserade metafaserna eller så många som krävs för att utreda förekommande avvikelser och kloner.

Dokumentera minst 2 metafaser från varje klon på bild.

Fastställ bandresolutionen i minst 1 av de bästa metafaserna.

5.1 Om enkel klonal avvikelse eller komplexa klonala avvikelser kan påvisas:

Avsluta analysen.

Speciell omständighet: Samma enkla avvikelse som påträffas nära varandra eller i en koloni på ett *in situ* preparat från en primärkultur måste bekräftas i annan koloni eller i en oberoende kultur.

5.2 Om misstänkt tumörassocierad avvikelse påträffats men inte uppfyller klonalitetskriterierna då 10 metafaser analyserats:

Fortsätt, om möjligt, analysen tills klonalitet uppnåtts eller tills sammanlagt 25 metafaser analyserats.

Speciell omständighet: Se 4.1.

5.3 Om ingen klonal avvikelse påträffas, tveksamt fynd erhållits eller misstanke finns om förekomst av två eller flera kloner:

Fortsätt, om möjligt, analysen tills sammanlagt 25 metafaser analyserats.

Vid fynd av klonal avvikelse är analys av ett *in situ* preparat eller en kultur tillräckligt.

Två eller flera kulturer ska analyseras om ingen klonal avvikelse identifierats.

Olika avvikelser i nära-diploida metafaser från strålbehandlade patienter behöver inte dokumenteras på bild.

6. RIKTLINJER FÖR KVALITETSBEDÖMNING

Kvalitetsbedömning ska tillämpas systematiskt och ska inbegripa mätbara kvalitetsmått. Det enskilt viktigaste kvalitetskriteriet – att ett korrekt provsvar lämnas – är endast delvis och ofullständigt mätbart. System för uppföljning av nedanstående mätbara, rimligt objektiva kvalitetsmått bör finnas.

Bandresolution

Någon form av indikatormetod för att uppskatta TNB (total number of bands), som medger en viss uppskattning av sannolikheten att upptäcka strukturella förändringar, ska användas i varje enskilt fall. Det finns ett stort antal olika metoder, som delvis ger mycket olikartade resultat, att välja bland. Alltför trubbiga och överskattande metoder ska undvikas. Det bör beaktas att resultat mellan olika laboratorier inte är fullt jämförbara om olika metoder används. Uppskattat TNB bör främst betraktas som en intern standard som är användbar för att upptäcka systematiska försämringar eller förbättringar. Det är tillräckligt att urskilja de nivåer som illustreras i ISCN (2009), d.v.s. 300-, 400-, 550-, 700- och 850-band, dock med tillägget <300 band för exempelvis benmärgspreparat av låg kvalitet.

Andel prov som resulterar i ett konklusivt resultat

System bör finnas som gör det möjligt att enkelt fastställa andelen prov med konklusivt resultat för varje enskild typ av provmaterial under valfri tidsperiod. Detta mäter i viss mån en kombination av den valda metodens prestanda och det laborativa handhavandet.

Extern kvalitetskontroll

Laboratoriet bör regelbundet delta i nationell/internationell kvalitetskontroll där resultatet från hantering och bedömning av insänt testmaterial utvärderas av utomstående part.

Svarstid

System bör finnas som gör det möjligt att enkelt fastställa svarstid, från inregistrering till utskick av svar (t.ex. medelvärde, median, spridning) för varje enskild typ av provmaterial under valfri tidsperiod. Resultaten kan användas för att värdera förekommande arbetsrutiner och använda metoder, men påverkas även av provtillströmning och personalsituation.

APPENDIX 1

Tekniskt underlag avseende mosaicism

Olika typer av beräkningar har genomförts i syfte att fastställa antalet metafaser som måste analyseras för att på en viss sannolikhetsnivå kunna utesluta (eller bekräfta) mosaicism på olika nivåer. Dessa beräkningar har sammanställts i tabellform. Beslut om vilken säkerhetsnivå som ska tillämpas är en balans mellan risken att inte upptäcka en mer eller mindre låg grad av mosaicism och arbetsinsats mätt i tid och pengar. Det är inte alla kromosomavvikelser som upptäcks vid grundanalysen som bör föranleda utvidgad analys i syfte att påvisa eller avfärda mosaicism. Beslut om utvidgad analys påverkas även av om enbart en cytogenetisk analys utförts eller om denna gjorts i kombination med t.ex. interfase FISH eller QF-PCR.

Andra beräkningar har gjorts i syfte att fastställa minsta antal metafaser som ska analyseras i suspensionspreparat från en primär vävnadskultur för att med viss sannolikhet ha analyserat celler från ett förutbestämt antal kolonier i flaskan. Även detta finns tabulerat. Generellt gäller att det krävs färre analyserade celler från ett *in situ* preparat från primärkultur än från ett preparat tillverkat från lossade celler i suspension eller ett *in situ* preparat från en passerad kultur. Alla sådana typer av beräkningar är behäftade med olika typer av svagheter och baseras på vissa antaganden, men är i all praxis tillräckligt solida för att grunda beslut om säkerhetsnivå på.

Genom att analysera 11 metafaser från olika kolonier på *in situ* preparat från en primärkultur uppnås en sannolikhet på 95 % att finna en avvikande klon som utgör 24 % eller mer av samtliga metafaser i kulturen. Om man önskar uppnå 99 % sannolikhet måste klonen utgöra 35 % eller mer. Om endast en av de analyserade cellerna uppvisar avvikelserna måste analysen utvidgas till 17 celler (d.v.s. ytterligare 6 celler) för att med 95 % sannolikhet finna en cell till med samma avvikelse. Motsvarande beräkningar för *in situ* preparat från en passerad kultur eller suspensionspreparat är mer komplicerade där både antalet kolonier i kulturen och antalet analyserade celler måste beaktas - ju fler kolonier desto färre celler. Med ovanstående exempel, 95 % sannolikhet och en klon på ≥ 24 %, krävs 60 celler om det fanns 11 kolonier men bara 16 celler om det fanns 20 kolonier.

Det är inte alla typer av avvikelser som bör föranleda utvidgad analys för att utreda möjlig mosaicism. Det finns olika skolor och säkerhetstänkande avseende vilka dessa avvikelser bör vara. Det är dessutom något oklart vilka konsekvenser lågradig mosaicism har. I de nationella riktlinjerna listas ett minimum av avvikelser som bör leda till utvidgad analys. De enskilda klinikerna kan efter önskemål utvidga denna lista.

Typ av mosaicism:

- | | |
|----------|--|
| Nivå I | En enstaka abnorm cell.
-> Praktiskt taget alla fall representerar pseudomosaicism. |
| Nivå II | Två eller flera celler med samma avvikelse i en enstaka kultur eller koloni.
-> Majoriteten representerar pseudomosaicism. |
| Nivå III | Två eller flera celler med samma avvikelse fördelade i två eller flera kulturer eller kolonier.
-> Detta representerar ofta äkta mosaicism. |

Korionbiopsi

Ett potentiellt problem vid analys av korionvilli är ”confined placental mosaicism”.

Vid fynd av, i synnerhet, trisomi 15 (genomgående eller i mosaikform) men också trisomi 7, 11, 14 och 22 bör uppföljande analys genom amniocentes eller kordocentes utföras.

Mosaicism förekommer i ca 1 % av korionprover, men kan konfirmeras hos fostret i endast 10-40 % av fallen, beroende på typ av avvikelse. Mosaicism i form av ”vanliga” autosomala trisomier (21, 18 och 13) kan bekräftas hos fostret i ca 19 % och ”ovanliga” trisomier i ca 3 %, medan mosaicism för könskromosomer kan bekräftas i ca 16 %. Icke-familjär markör kan bekräftas i mer än 25 % och andra strukturella avvikelser i ca 9 %.

APPENDIX 2

Analysförfarande

Metafaser kan analyseras på olika nivåer:

1. *Räkna*, räkna antalet kromosomer utan hänsyn till morfologi.
2. *Analysera*, räkna antalet kromosomer och granska deras bandmönster i mikroskop.
3. *a Karyotypera*, uppställning av ett *karyogram* med hjälp av digital eller fotografisk bildteknik
b Karyotypera, noggrann genomgång i *mikroskop* av de enskilda kromosomparens morfologi, från kromosom 1 till 22 och X/Y

Särskilda frågeställningar eller fynd kan föranleda utvidgad, riktad granskning av en särskild kromosom.

Fluorescent in situ hybridisering (FISH)

GENERELLA RIKTLINJER

- Metodbeskrivningar som beskriver metodernas grundläggande förutsättningar skall finnas.
- Analysbeskrivningar som innehåller detaljerad instruktion om hur en enskild analys utförs skall finnas.
- Analysbeskrivningen skall ange hur många celler som bör analyseras så att ett tillförlitligt resultat erhålls.
- Vid ny inmärkning av egentillverkade, icke-kommersiella, DNA-sonder skall specificiteten och sensitiviteten undersökas på metafaskromosomer och/eller interfaskärnor, beroende på användningsområde. Sensitivitet och specificitet bör vara hög för att undvika feldiagnostik.
- Om en analys utförs prenatalt skall verksamheten även ha provat ut reagenserna på postnatal vävnad.
- Provsvaret skall innehålla information om vilka DNA-sonder som använts samt vilken typ av vävnad och antal metafaser/interfaser som analyserats.
- Det är ej nödvändigt att besvara analysen enligt ISCN(2009) FISH nomenklaturstandard. Det räcker med att tydligt beskriva resultaten och ge en förklarande sammanfattning.

METAFAS-FISH

- Minst 10 mitoser bör analyseras när endast FISH används vid en utredning.
- Minst 5 mitoser bör analyseras för att bekräfta en avvikelse hittad vid cytogenetisk analys.
- En kontroll bör alltid användas. Signalen på den normala kromosomen utgör den bästa kontrollen, men andra kontrollsonder kan också användas.

INTERFAS-FISH

- Gränsvärden och tolkningskriterier för DNA-sonderna bör finnas.
- Vid osäkra resultat bör ytterligare en oberoende person analysera provet.
- Vid prenataldiagnostik bör minst 30 celler per sond analyseras.
- Vid prenataldiagnostik skall eventuell maternell kontamination omnämnas i svaret.
- Vid misstanke om mosaicism bör minst 100 celler analyseras.
- Vid könschimerism efter stamcellstransplantation bör minst 500 celler analyseras.
- Vid misstanke om förvärvade avvikelser bör minst 100 celler analyseras.

Molekylärgenetiska/biokemiska analyser

GENERELLA RIKTLINJER

Det rekommenderas att laboratoriet följer riktlinjer angivna i ”OECD Guidelines for quality assurance in molecular genetic testing” från 2007. Laboratoriet bör uppfylla kriterier för ackreditering enligt ISO/EN 15189, ISO/EN 17025, eller motsvarande standard, vilket bland annat innebär att:

- Varje metod skall ha en skriftlig metodbeskrivning.
- Laboratoriets validering av metoden skall finnas dokumenterad.
- Laboratoriet skall upprätthålla ett avvikelssystem och utföra egenrevision.
- Om analysmetoden baseras på att mutationen i fråga inte påvisas på sekvensnivå utan genom en restriktionsklyvning och dylikt skall om möjligt interna kontroller som påvisar hur ett normalt och ett avvikande mutationsmönster finnas. Om positiva kontroller finns bör dessa finnas med vid varje analystillfälle. Kriterier för godkänd analys skall vara beskrivna.
- Nomenklatur enligt HGVS (<http://www.hgvs.org>) bör användas.

Intern kvalitetskontroll.

Rutiner för att identifiera kontamination vid analys skall finnas. Negativa kontroller skall hanteras som patientprov. Laboratoriet skall ha beskrivit sina rutiner för att förebygga kontamination. Prenatalprover bör bedömas med kunskap om grad av maternell kontamination. Om analyser utförs prenatalt rekommenderas laboratoriet även ha erfarenhet av motsvarande analyser postnatalt. Prover insamlade i forskningssyfte skall normalt inte användas inom klinisk diagnostik. Rekommendationen är att ett nytt prov tas från patienten.

Extern kvalitetskontroll.

Laboratoriet skall så långt detta är möjligt delta i externa kvalitetskontrollprogram. Objektiva kvalitetsmått skall finnas.

SPECIFIKA RIKTLINJER:

Detta avsnitt omfattar följande dokument:

- Riktlinjer för DNA sekvensanalys och rapportering av provsvar
- Riktlinjer för QF-PCR analys och rapportering av provsvar
- Riktlinjer för MLPA analys och rapportering av provsvar
- Riktlinjer för mikroarrayanalyser och rapportering av provsvar

1. RIKTLINJER FÖR DNA-SEKVENSANALYS

Syftet med DNA-sekvensbestämning kan antingen vara:

Att bekräfta eller exkludera närvaro av en specifik sekvensvariant (genotypning/anlagsbärartestning) eller

Att förutsättningslöst söka efter avvikelser från en referenssekvens (screening).

Dessa båda tillämpningar ställer olika kvalitetskrav på utförandet av analysen.

Analysbeskrivning som innehåller detaljerad instruktion om hur sekvensanalysen utförs, samt information om programvara för tolkning av resultaten skall finnas.

1.1 Patientmaterial

1.1 Som utgångsmaterial för DNA-sekvensbestämning skall användas patientprov som hanteras i enlighet med de för laboratoriet fastställda kvalitetskrav.

1.2. Templat, sekvensreaktion och rening

DNA-templat för DNA-sekvensbestämning kan framställas med hjälp av olika metoder och riktlinjer för detta är bortom målsättningen för utformandet av de här angivna riktlinjerna.

Vid egen design av primers för framställning av DNA-templat bör en utvärdering av förekomst av eventuella homologa sekvenser utföras. Primersekvenser bör även analyseras för förekomst av ev. SNP för att minimera risk för allelisk ”drop out” vid PCR-amplifiering. Efter att PCR-amplifieringen optimerats och reaktionsbetingelserna bestämts så att endast definierade fragment av korrekt storlek erhållits är det inte nödvändigt att kontrollera varje DNA-templat före sekvensbestämning, såtillvida det inte uppstår problem med analysen. PCR-templat för sekvensbestämning skall innehålla ett PCR-fragment eller alternativt i de fall där sekvensning av multiplexa PCR-produkter utförs, av väl definierade fragment. Metoder som används för rening av templat före och efter sekvensreaktion samt sekvenskemi kan variera mellan olika laboratorier. De metoder som används skall ge tillfredställande resultat. Tydliga skriftliga metodbeskrivningar inklusive metodvalideringar skall finnas. Primersekvenser som används vid DNA-sekvensanalysen samt PCR-amplifieringen skall dokumenteras. Referenssekvensen skall utgöras av en vedertagen referenssekvens med angivet ”Accession number”.

1.3 Datahantering

Provet skall vara spårbart under hela analysprocessen. Resultat och rapporter skall vara spårbara till elektroferogram (pappersformat eller datafil) och/eller till rådatafil från automatiserat instrument och referenssekvens bör anges på analysprotokollet. Entydiga resultat skall jämföras med dokumenterad referenssekvens och resultatet (d.v.s. identifierad mutation eller konfirmerad normal sekvens) skall dokumenteras tillsammans med signatur och datum av behörig person som utför analysen.

1.4 Utvärdering av sekvenskvalitet och identifiering av sekvensvarianter

Den sammantagna kvaliteten på DNA-sekvensbestämningen skall utvärderas. Det rekommenderas att kvalitén på DNA-sekvensen utvärderas med hjälp av därför avsedd mjukvara. Manuell bedömning av områden där mjukvara har svårigheter med tolkning skall utföras med största försiktighet. För att sekvensen skall utgöra ”diagnostisk kvalitet” rekommenderas att bakgrunden av ospecifik sekvens efter dataprocessning utgör <5 % av höjden på den huvudsakliga toppen (utom i heterozygota positioner). Resultat från en högkvalitativ DNA-sekvensanalys av en normal kontroll skall finnas dokumenterad och validerad för jämförelse med patientprov. Det är dock inte nödvändigt att inkludera en normal kontroll vid varje analysomgång. Det rekommenderas att mer än en behörig person utför tolkningen av sekvensdata.

1.4.2 Screening av okända mutationer

Vissa mutationer kan undgå detektion om sekvensbestämningen utförs endast på en DNA-sträng. Det rekommenderas därför att sekvensbestämning av prover utförs på båda DNA-strängarna.

1.4.3 Sekvensbaserad utvärdering av känd mutation

Det rekommenderas att båda DNA-strängarna analyseras. Korrekt "base-calling" bör sträcka sig >10 bp på varje sida om mutationen i fråga. En positiv kontroll bör inkluderas i samma analysomgång. För att minimera risk för allelisk "drop out" bör den positiva kontrollen, om möjligt, vara från samma familj som probanden. En högkvalitativ DNA-sekvens från en normal kontroll skall finnas dokumenterad för jämförelse med patientprov, men behöver inte inkluderas i varje analysomgång.

1.5 Tolkning och rapportering

1.5.1 Påvisad avvikelse från referenssekvens

Avvikelser från referenssekvens bedömda som patologiska som påvisas vid screening bör verifieras på nytt templat.

1.5.2 Ingen påvisad avvikelse från referenssekvens

Analyssensitiviteten, d.v.s. hur många procent av mutationerna som man förväntas detektera med den använda metoden bör anges i rapporten.

1.5.3 Rapportering

Laboratoriet skall följa instruktionerna i detta dokument. Vid rapportering av sekvensavvikelser skall nomenklaturen följa HGVS riktlinjer (<http://www.hgvs.org/>). Av historiska skäl har ett antal vanligt förekommande mutationer namn som inte följer HGVS rekommenderade nomenklatur. Vid sådana fall rekommenderas att den gamla beteckningen används tillsammans med den standardiserade nomenklaturen.

Kända polymorfier utan klinisk betydelse bör inte inkluderas i svaret till inremitterande.

2.RIKTLINJER FÖR QF-PCR-ANALYS

Dessa riktlinjer baseras på "CMGS Best Practice Guidelines for QF-PCR in the diagnosis of aneuploidy" och är anpassade till svenska förhållanden.

QF-PCR (Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction) är en metod som används för att detektera aneuploidier. Metoden beskrevs redan 1993 och har sedan dess utvecklats och validerats för att nu vara en metod som rutinemässigt erbjuds vid fosterdiagnostik i flertalet länder. Undersökningar har visat att QF-PCR och interfase-FISH har samma säkerhet som kromosomanalys vid diagnostik av numeriska kromosomavvikelser av kromosomerna 13, 18, 21 samt könskromosomerna.

2.1 Preparering av prover

Som utgångsmaterial för QF-PCR skall användas patientprov som hanterats och preparerats i enlighet med de för laboratoriet fastställda kvalitetskraven.

2.1.1 Den rekommenderade provvolymen från amnionvätska (AF) för analys med QF-PCR är 0.5-4 ml; volymen kan variera beroende på i vilken graviditetsvecka provet är taget.

2.1.2 Vid QF-PCR-analys med korionvilli-biopsi (CVS) som utgångsmaterial bör DNA-extraktionen göras på minst två CVS-bitar tagna från två olika ställen av biopsin; d.v.s. man ska undvika att bara ta material från de distala delarna av biopsin - detta för att minska risken att ett provresultat svaras ut som är baserade på mosaicism som är begränsad till placentan.

Alternativt kan DNA från hela CVS (när eventuellt prov tagits av för kromosomanalys) prepareras och analyseras. DNA preparerat från CVS innehåller DNA från både cytotrofoblast- och mesodermagren.

2.2 DNA-extraktion

Metod som används för DNA-extraktion skall vara validerad för QF-PCR av laboratoriet.

2.3 PCR-reaktion

2.3.1 Det rekommenderade antalet PCR-cykler för multiplexreaktionen är normalt 24-26 cykler. Det är acceptabelt att öka antalet cykler, till exempel om provet har låg DNA-koncentration, under förutsättning att man samtidigt analyserar ett prov med en känd aneuploidi (positiv kontroll) samt en normal kontroll. Analysen kan svaras ut om kontrollernas kvoter (se nedan) faller ut inom de förväntade intervallen.

2.3.2 Minst fyra markörer ska analyseras per kromosom (kromosomerna 13, 18 och 21) för att undvika icke informativa resultat. Det rekommenderas att man använder tri-/tetra-/penta-/hexanukleotid markörer. Om dinukleotidmarkörer används kan tolkningen av allel-mönstret försvåras av sk. ”stutter-toppar”. Därför bör ej dinukleotidmarkörer användas om inte stor erfarenhet av tolkning av dessa föreligger på laboratoriet. Markörer ska uppvisa ett högt heterozygositetstal för att anses vara lämpliga att använda i analysen. Markörer som tidigare inte har använts för QF-PCR ska valideras på minst hundra kromosomer (50 prov), inklusive normala prov och prover med känd trisomi, innan de införs i ordinarie marköruppsättning.

2.3.3 En kontroll utan DNA ska inkluderas i varje analystillfälle. Det är däremot inte nödvändigt att inkludera en positiv och en normal kontroll.

2.4 Analys

2.4.1 Analysinstrumentet som används för analys av QF-PCR resultatet ska ha en upplösning på minst 2 baspar. Elektroferogram och kvot mellan toppar för respektive markör ska analyseras. Rekommenderade intensitetsintervall för respektive utrustning ska följas. Markörer som inte befinner sig i det rekommenderade intensitetsintervallet för instrumentet ska inte inkluderas i analysen. Det är tillåtet att stryka toppar i kromatogrammet som härrör från ”genomblödning” och/eller ”spikes”.

2.4.2 Förekomst av tre alleler påvisas av toppar med 1:1:1 förhållande till varandra, eller två alleler med 1:2 eller 2:1 förhållande. Generellt kan toppens höjd och/eller area användas för beräkningarna, dock bör man följa eventuella rekommendationer från tillverkaren av laboratoriets instrument. Vid beräkning av kvoten rekommenderas att den kortare allelen delas med den längre allelen. För att förhållandet mellan toppar ska anses vara 1:1 ska kvoten ligga mellan 0,8-1,4. För att allelerna ska uppfylla trisomi, 1:2 eller 2:1, ska kvoten vara <0,65 respektive >1,8. Detta gäller under förutsättning att storleken på de två olika allelerna inte skiljer mer än 24 baspar. Om två allelstorleken för en markör skiljer mer än 24 bp kan en kvot på 1,5 accepteras (se rekommendationer från kit-tillverkare). Kvoter som hamnar mellan 1.4 – 1.8 är icke tolkningsbara och markören

ifråga ska därför inte ligga till grund för tolkningen av analysresultatet. Om det skiljer mer än 40 bp mellan allelerna ska dessa markörer ej inkluderas i tolkningen.

Kvot	Förhållande mellan toppar
0,8-1,4*	1:1 - normalt
<0,65 eller >1,8	2:1 eller 1:2 indikerar trisomi
0,65–0.8 och 1,4-1,8	Icke tolkningsbart

* om avståndet mellan två alleler inom en markör är mer än 24 bp kan en kvot på 1,5 accepteras. Se rekommendationer från kit-tillverkare.

2.4.3 Provet besvaras som avvikande när minst två informativa markörer uppvisar tri-allelisk genotyp och övriga markörer (avseende samma kromosom) inte är informativa. Analysen ska ej tolkas då endast en markör är informativ. För att ett prov ska kunna besvaras som ”normal” ska minst två informativa markörer uppvisa di-allelisk genotyp om övriga markörer (avseende samma kromosom) inte är informativa.

2.4.4 För samtliga analyserade markörer ska allelerna skilja med >2 baspar för att kunna inkluderas i analysen. Detta på grund av påverkan av ”stutter” toppar.

2.4.5 Om både ”icke normala” och ”normala” markörer erhålls inom en och samma kromosom är analysen inte tolkningsbar för kromosomen ifråga utan en fullständig kromosom- eller riktad FISH-analys rekommenderas i dessa fall. Orsaken till en skev allelkvot för endast en markör kan vara ”primer site polymorfi”, somatisk mikrosatellitmutation eller en submikroskopisk kromosomobalans.

2.4.6 Mosaicism. Om det i ett prov föreligger mosaicism mellan en normal cellinje och en trisomi-cellinje kan detta detekteras med QF-PCR genom förekomst av extra toppar och/eller skev allel-kvot för samtliga informativa markörer inom en och samma kromosom. I vissa fall går det att särskilja mellan ett mosaiskt genotypsmönster och ett mönster som har sitt ursprung i två olika genotyper. Det rekommenderas inte att i ett svar redovisa en trisomi-mosaicism identifierad genom QF-PCR utan istället bör provet analyseras med FISH eller fullständig karyotypering.

2.4.7 Maternell kontamination. Ett fostervattenprov kan innehålla små mängder blod, antingen av fetalt eller maternellt ursprung. Det är godtagbart att analysera blodkontaminerade prov om tolkningen av resultatet kan göras på ett tillfredställande sätt. En kontamination bestående av maternella celler resulterar i att provet uppvisar ett allelmönster förenligt med två separata genotyper. Om den övervägande genotypen är av fetalt ursprung och uppvisar entydigt normalt eller avvikande allelmönster är det godtagbart att analysen besvaras. Om däremot allelkvoten är inkonklusiv och/eller den maternella genotypen är mest frekvent ska analysen inte användas för att avge en rapport. Om svar ska avges för ett prov där två olika genotyper är närvarande ska det avgöras vilken av de två genotyperna som har fetalt ursprung genom att analysera ett maternellt blodprov parallellt med det fetala provet. Om fostret är av manligt kön kan graden av kontamination avgöras genom att jämföra topp-höjden på Y-specifik(a) markör(er) med topphöjden på markör(er) från den icke-transmitterade maternella X-kromosomen. Huruvida ett maternellt blodprov alltid ska efterfrågas vid QF-PCR eller endast efterfrågas om behov uppstår avgörs lokalt av varje kliniskt genetiskt laboratorium.

2.5 Validering av resultat

Varje laboratorium som utför QF-PCR ska utforma rutiner för provhantering, analysgång m.m. så att risken för provsammanblandning minimeras. Detta är speciellt viktigt då flera prover ofta analyseras samtidigt. Exempel på viktiga steg är rör-till-rör överföring av fostervatten/DNA, provhantering vid uppsättandet av PCR m.m.. Om fler än ett prov analyseras vid ett och samma analystillfälle rekommenderas det att identiteten fastställs för prov med avvikande fynd. Det sistnämnda kan göras på flera sätt vilka inkluderar analys av maternellt prov eller sekundär analys av originalprovet, t ex med interfase-FISH eller upprepad QF-PCR.

2.6 Rapportering

2.6.1 Det rekommenderas att det i rapporten ska framgå vilket material som analyserats, samt att små obalanser för de undersökta kromosomerna inte kan detekteras. I rapporten ska det framgå om QF-PCR kommer att efterföljas av en cytogenetisk analys.

2.6.2 Det är viktigt att man i svaret tydligt anger att QF-PCR är en indirekt metod. Normala QF-PCR resultat kan rapporteras enligt följande: ”tyder på en normal diploid kromosomuppsättning för kromosomerna 13, 18 och 21”, ”en till synes normal kromosomuppsättning för kromosomerna 13, 18 och 21 detekterades”, eller liknande.

Avvikande mönster kan anges som ”Analysen visar en extra kopia av flera olika delar av kromosom 21. Mönstret är typiskt för det man finner hos patienter med en extra kromosom 21 (Down syndrom). Metoden kan inte avgöra om det föreligger en strukturell kromosomavvikelse eller om en del av kromosom 21 är duplicerad”.

2.6.3 Vid fynd av extra kromosom 13 och 21 rekommenderas karyotypering av foster eller föräldrar.

2.6.4 Det är viktigt att understryka att QF PCR med markörer specifika för könskromosomerna kan detektera monosomi X (Turner syndrom), men att QF-PCR inte är ett diagnostiskt test för detta syndrom. Ett fynd som tyder på monosomi X, där samtliga markörer endast visar en topp och avsaknad av signal för Y, kan representera en normal kvinnlig kromosomuppsättning där samtliga undersökta markörer är homozygota. Det rekommenderas därför att resultatet verifieras med en annan teknik, t ex FISH eller cytogenetisk analys. Om ett laboratorium rapporterar fynd av monosomi X enbart baserat på QF-PCR analysen bör man i rapporten ange en ungefärlig sannolikhetssiffra för att det kan röra sig om en normal kvinnlig könskromosomuppsättning.

3. RIKTLINJER FÖR MLPA-ANALYS

MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) är en metod som kan användas för att detektera avvikelser i kopiaantal av hela eller delar av gener.

3.1 Analys

3.1.1 Analysbeskrivning som innehåller detaljerad instruktion om hur MLPA-analysen och beräkningar utförs samt information om programvara skall finnas.

3.1.2 Varje ny MLPA-analys som introduceras bör valideras med ett antal prover från friska individer samt om möjligt positiva prover (från sjuk individ). Resultatet från valideringen skall dokumenteras.

- 3.1.3** Vid varje analystillfälle skall följande kontrollprover inkluderas och analyseras parallellt från hybridiserings-/ligeringssteget; en vattenkontroll (utan DNA), en eller två normala kontroller (prov från friska individer), samt om möjligt en positiv kontroll (prov från sjuk individ).
- 3.1.4** Signalstyrkan bör ligga inom de intervall som rekommenderas för det specifika analysinstrument som används.
- 3.1.5** En probe betraktas som normal då kvoten patient jämfört med normal kontroll är 1:1. Rekommenderade gränsvärden är 0,7-0,8 respektive 1,2-1,3, beroende av hur data har normaliserats. Om den aktuella proben detekterar fler eller färre än två alleler kan dessa riktvärden avvika.
- 3.1.6** En deletion av en probe hos en patient ska jämfört med en normalkontroll visa en kvot <0,7-0,8 (se ovan). Angående prober som detekterar fler eller färre än två alleler, se ovan.
- 3.1.7** En duplikation hos en patient ska jämfört med en normalkontroll visa en kvot >1,2-1,3 (se ovan). Angående prober som detekterar fler eller färre än två alleler, se ovan.
- 3.1.8** Då endast en probe påvisar deletion/duplikation skall avvikelsen verifieras med annan metod eller annan probe i det aktuella området.
- 3.1.9** Om en analys utförs prenatalt skall laboratoriet även ha erfarenhet av MLPA-proberna/analysen på postnatal vävnad. Risker för maternell kontamination samt placentamosaisism skall tas i beaktning.

3.2. Användning av kommersiella kit från MRC-Holland

Kontrolltoppar för DNA-mängd/kvalitet bör vid varje körning uppfylla de av tillverkaren angivna kriterierna för analysen.

3.3 Användning av icke-kommersiella MLPA-prober:

- 3.3.1** Vid användning av ”egentillverkade”, icke-kommersiella MLPA-prober bör dessa valideras med ett antal normala kontroller för att kontrollera specificiteten innan de används för analys av patient.
- 3.3.2** I varje probe-mix skall det ingå minst tre kontrollprober, som används för beräkningar av kvot.
- 3.3.3** Om positiva kontroller finns bör dessa finnas med vid varje analystillfälle.

3.4 Rapportering

Laboratoriet skall följa instruktionerna i detta dokument, se ”Riktlinjer för rapportering av provsvar”, se nedan punkt 5. Provsvar bör innehålla information om vilket MLPA-kit som använts samt eventuella deleterade och/eller amplifierade prober/regioner som påvisats. En kortfattad teknisk information innehållande kommersiellt kit-namn och eventuella referenser rekommenderas. Det är viktigt att den tekniska informationen utformas så att den inte stör tolkningen av svaret.

4. RIKTLINJER FÖR MIKROARRAYANALYS

4.1 *Analys*

Varje mikroarrayplattform ska valideras med ett antal prover med kända kopietalsavvikelser. Valideringen ska dokumenteras.

Varje laboratorium skall upprätta en analysbeskrivning som:

- 4.1.1 Innehåller detaljerad instruktion om hur mikroarrayanalysen utförs samt information om vilka programvaror som används.
- 4.1.2 Definierar gränsvärden för minsta storlek för en kopietalsavvikelse (antal involverade prover och/eller baspar) som kan detekteras med mikroarrayplattformen
- 4.1.3 Bör innehålla en beskrivning om vad som vid analysen betraktas som ”normalt fynd” respektive ”avvikande fynd.”
- 4.1.4 Bör dokumentera kvalitetsnivån på den utförda mikroarrayanalysen. En beskrivning av lägsta gränsvärdet för plattformsspecifika kvalitetsmått (tex standardavvikelse) skall finnas. Konstitutionella prover bör ha en CallRate ≥ 90 % för att godkännas.

4.2 *Tolkning av avvikelser:*

- 4.2.1 En kopietalsavvikelse bör verifieras när resultatet är svårbedömt, tex pga liten storlek på avvikelsen eller tekniskt svagt resultat.
- 4.2.2 För varje kopietalsavvikelse som inte tidigare rapporterats, vare sig som benign eller patogen, bör föräldraprover analyseras för samma avvikelse. Föräldraprov bör också analyseras för att underlätta bedömningen av kopietalsavvikelser med oklar betydelse.
- 4.2.3 Varje kopietalsavvikelse bör jämföras mot Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>), eller motsvarande, för att utesluta eventuella normalvarianter.
- 4.2.4 Detekterade normalvarianter skall dokumenteras.
- 4.2.5 Varje laboratorium avgör om och när information om kopietalsneutralt ”Loss-of-heterozygosity” (LOH) eller segregationsmönster ska användas vid bedömning av analysresultatet.

4.3. *Rapportering*

- 4.3.1 Provsvaret skall innehålla den molekylära karyotypen (enligt aktuell ISCN-nomenklatur), samt ange avvikelstens storlek.
- 4.3.2 Provsvaret ska innehålla en beskrivning och tolkning av provresultatet.
- 4.3.3 Om en annan analysmetod använts för att konfirmera resultaten skall detta nämnas i provsvaret.
- 4.3.4 Provsvaret bör omfatta en teknisk information innehållande uppgifter om avvikelstens baspars-positioner, typ av mikroarrayplattform och om möjligt även information om vilken praktisk upplösning som använts. Den bör även innehålla information om använda genomdatabaser och vilken Genome Build eller Assembly av desamma som använts. Referens till producerande företag samt eventuella lämpliga referenser rekommenderas. Dessa uppgifter kan med fördel stå separat för att inte störa tolkningen.

5. PROVRAPPORTENS UTFORMNING

För molekylärgenetiska analyser rekommenderas att laboratoriet följer riktlinjer angivna i “OECD Guidelines for quality assurance in molecular genetic testing från 2007 och “Best practice guidelines on reporting in molecular genetic diagnostic laboratories in Switzerland”. För cytogenetik, och FISH rekommenderas att följa European Cytogenetics Association guidelines. För mikroarray är Europeiska guidelines under utarbetande.

Allmänt

Resultatet skall så långt det är möjligt tolkas i relation till angiven frågeställning och symtombild.

Rapporten skall utformas på ett sådant sätt att analysresultatet och slutsatsen tydligt framgår.

Standardsvar bör användas i största möjliga mån.

Om svaret avser en analys som utförts vid annat laboratorium skall kopia av originalsvaret bifogas.

Databaserade remissvar skall vara låsta så att originalsvar och eventuella senare ändringar kan spåras och ändringar av tidigare svar tydligt markerats så att det rör sig om ett kompletterande svar.

Rapporten skall innehålla information om:

- a) Patientens namn och personnummer.
- b) Provtagningsdatum och/eller remissdatum och/eller när prov inkom till laboratoriet
- c) Laboratoriets provnummer.
- d) Remitterande läkare, till vilken rapporten ställs.
- e) Vilken provtyp som analyserats (DNA från venblod, moderkaksprov, hudbiopsi, etc.).
- f) Frågeställning till varför analysen utförts.
- g) En kort beskrivning av vilken metod som använts (för att möjliggöra framtida utvärdering av analyser samt utvärdering av analyser utförda vid annat laboratorium).
- h) Analysens omfattning (test för specifik mutation, vilka exon/gener som analyserats, etc.).
- i) Analysens specificitet, så långt detta är möjligt.
- j) Analysens eventuella begränsningar bör anges.
- k) Resultat av analysen.
- l) Internationellt erkänd nomenklatur skall, om sådan finns, användas. I rapporten skall anges vilken nomenklatur och vilken version som använts.
- m) Slutsats.
- n) Laboratoriets kontaktuppgifter.
- o) Besvarande läkares och/eller sjukhusgenetikens (handskrivna eller elektroniska) signatur/signaturer.

- p) Rekommendationer om vidare familjeutredning, där så är tillämpligt.
- q) Rekommendationer om genetisk vägledning, där så är tillämpligt.
- r) Rekommendationer om vidare utredning, där så är tillämpligt (t.ex. om någon förändring inte påvisats och där ytterligare analyser kan erbjudas).
- s) Datum för rapportens upprättande.



Detta dokument är framtaget av en arbetsgrupp inom Svensk förening för medicinsk genetik.

För sammanställningen ansvarar Ulf Kristoffersson, Lund.

Ansvariga för de olika avsnitten har varit:

Mottagningsverksamhet: Erik Björk, Stockholm; Charlotta Enerbäck, Göteborg; Cecilia Gunnarsson, Linköping; Richard Rosenkvist, Uppsala; Maria Soller, Lund; Eva-Lena Stattin, Umeå.

Cytogenetik: Nils Mandahl, Lund

FISH: Elisabeth Blennow, Stockholm; Anna Collin, Lund.

Molekylärgenetik: Eva Arkblad, Göteborg; Marie-Louise Bondeson, Uppsala; Anna Erlandsson, Göteborg; Jenni Jonasson, Umeå; Helena Malmgren, Stockholm; Margareta Nordling, Göteborg; Magnus Nordenskiöld, Stockholm; Kristina Lagerstedt Robinsson, Stockholm; Lena Samuelsson, Göteborg; Jacqueline Schoumans, Stockholm; Ann-Charlotte Thuresson, Uppsala.

Typografiskt granskad av Hans Ehrencrona, Lund.