

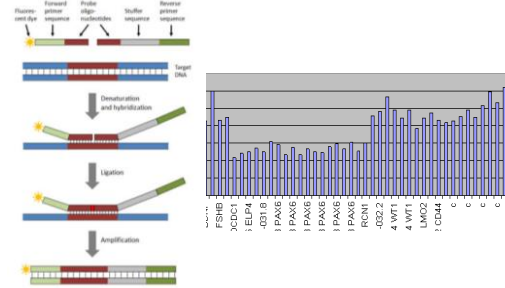
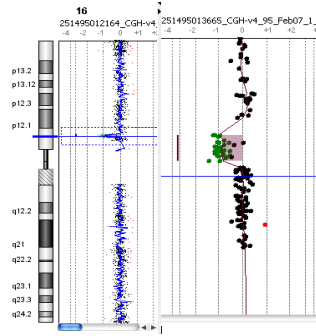
Kvantitative analyser av DNA og RNA

Randi Hovland	Senter for medisinsk genetikk og molekylærmedisin, HUS
Atle Brendehaug	Senter for medisinsk genetikk og molekylærmedisin, HUS
Gunnar Houge	Senter for medisinsk genetikk og molekylærmedisin, HUS
Agnete Jørgensen	Medisinsk Genetisk Avdeling, UNN
Marijke van Ghelue	Medisinsk Genetisk Avdeling, UNN
Hilde Monica Stensland	Medisinsk Genetisk Avdeling, UNN
Christa Schmidt	Avdeling for patologi og medisinsk genetikk, St. Olavs Hospital
Anette Kildal Eek	Enhet for medisinsk genetikk, STHF
Linda Strand	Enhet for medisinsk genetikk, STHF
Olaug Rødningen	Enhet for generell genetikk, AMG, OUS
Marta Vorland	Seksjon for molekylærbiologiske analyser., Lab for klinisk biokjemi (LKB), HUS
Sara Bremer	Medisinsk biokjemi, Rikshospitalet, OUS
Kari Bente Foss Haug	Medisinsk biokjemi, Ullevål, OUS
Marianne Kringen	Avdeling for farmakologi, Ullevål, OUS
Dag Andre Nymoen	Laboratorium for Molekylærpatologi, OUS

Agenda WS

- **Kopital 10.30 – 11.10**
 - Filtreringskjeder i Cartagena – demo
 - Hvordan håndterer vi VUSer
 - Når og hvordan svarer vi ut homozygositets-områder?
 - Utsvaring av tilfeldige/recessive funn
 - Kan avdelingene dele klassifiserte varianter?
 - Utvide veileder til å omfatte prenatal?
- **RNA-analyser 11.10 – 11.25**
 - Christa Schmidt viser metode og strategi for mutasjonsscreening og VUS-utredning
- **Kvantitativ real-time PCR 11.25 – 12.00**
 - Sara Bremer gjennomgå utkast til veileder

Kvantitative analyser av DNA og RNA i diagnostikk

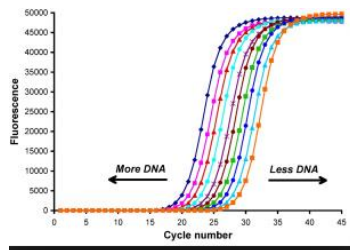


Helgenom kopitall, mikromatrise

- screener hele genomet for del/dup
- >20-50kb
- ser IKKE balanserte kromosomfeil
- SNP analyse kan påvise homozygotets-regioner >5Mb

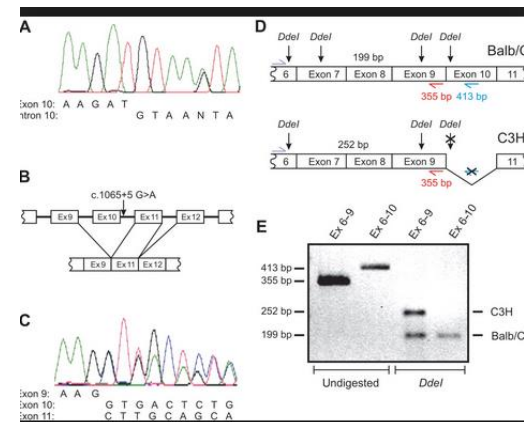
MLPA

- deleasjoner/duplikasjoner
- målrettet til kjente gener/områder
- begrenset av probeplassering



Real-time PCR

- Absolutt mengde DNA/RNA (kalibreringskurve)
- Relativ mengde DNA/RNA (referanseen)
- Påvise kjente del/dup, allelspesifikke varianter, fusjonsgener etc.
- målrettet analyse av kjente gener/områder



RNA-analyser

- real-time PCR til kvantitering eller påvisning
- fragmentanalyse/sekvensering til mutasjonsscreening eller påvisning av spleisefeil

Hva har vi jobbet med?

- Skaffe oversikt over hvem som gjør hva, volum
- Avdekke områder vi ser som utfordrende

Veileder for postnatal helgenoms kopitallsanalyser

Versjon 1.0

- **Utarbeidet av NSHG arbeidsgruppe bestående av:**
- HUS: Randi Hovland, Siren Berland, Gunnar Houge, Atle Brendehaug
- UNN: Mona Nystad, Hilde Monica F Riise Stensland, Agnete Jørgensen, Valeria Marton
- OUS: Olaug Rødningen, Mari Ann Kulseth, Ketil Heimdal, Benedicte Paus, Madeleine Fannemel
- STHF: Anette Kildal Eek, Linda Strand; Kjell Oskar Clausen, Geir Braathen
-
- Versjon 1.0 - 27.05.2013

Kopitalanalyser, mikromatrise

Indikasjoner: PUH, dysmorfologi, medfødte misdannelser, autisme spekter tilstander

	MGM-HUS	UNN	EGG-OUS	STHF	St. Olav
Antall/år	~500	~100	~1200	~200	~60 sendes HUS
Karyotyping i tillegg?	G-band 2 metafaser	G-band	Nei (noen unntak)	G-band	
Prenatal?	kun ved fosterdød eller alvorlige avvik som skal aborteres	nei	Ja, ved kjente sykdomsgivende funn i familien	senaborter/ dødfødsler	ved dødfødsler
Analyse/tolkning	Cartagenia	Cartagenia	Under utredning	Egen access db	

Kopitalanalyse, mikromatrise

- Veileder på nshg.no (rev. 2015)
- Felles utfordringer:
 - Hvordan skiller vi sikre sykdomsgivende varianter fra normalvarianter?
 - Hvordan formidles funn på en forståelig måte til rekvirenter?
- Diskusjonstema på workshop
 - Filtreringskjeder i Cartagena – demo
 - Hvordan håndterer vi 3`ere
 - Når og hvordan svarer vi ut homozygositets-områder?
 - Utsvaring av tilfeldige/recessive funn
 - Oppfølging av funn
 - Kan avdelingene dele klassifiserte varianter?
 - Utvide veileder til å omfatte prenatal?

.....som grunnlag for en oppdatering av veilederen vår -15

RNA-analyser i diagnostisk sammenheng

- **Laboratorium for Molekylærpatologi, OUS:**
 - Påvisning av 20-25 fusjongs-gentranskripter ved ALL, AML, KML tilbys kvantitativt
 - WT1 og EVI1 ekspressjon
 - fusjongs-gen ved sarkom og screening av 28 ulike fusjongs-gen ved leukemi (ikke-kvantitative analyser, real-time)
 - Sekvensering av ABL1-mutasjoner i BCR-ABL1 transkript og IgH-VH mutasjoner- KLL.
- **Senter for medisinsk genetikk og molekylærmedisin, HUS**
 - Oppfølging ved sterk mistanke om spleisevarianter (6 hittil i år).
 - Leukemi – under etablering for diagnostikk og måling av behandlingsrespons
Fusjongs-gener og gen ekspresjon
- **St. Olav**
 - Mutasjonsscreening på RNA-nivå (NF1, NF2) samt karakterisering av VUSer, mistanke om spleisevarianter
- **MBK-RH:**
 - Karakterisering av VUSer. NFAT-regulert genekspressjon (*IL2*, *IFNG* og *CSF2*) som markør for respons på kalsineurinhemmereffekt (immundempende legemidler). Per i dag ikke i diagnostisk rutine, men utføres i forbindelse med kliniske studier med nyretransplanterte pasienter.
- **AMG-OUS (to enheter)**
 - oppfølging ved mistanke om spleisevarianter, karakterisering av VUSer. Ikke rutine

Bruk av real-time PCR i diagnostikk

- **Laboratorium for Molekylærpatologi, OUS**
 - DNA: Kvantitativ allelspesifikk/pasientspesifikk qPCR for beregning av minimal residual disease (MRD) ved oppfølging av B-ALL, T-ALL og KLL. Myeloproliferative neoplasier. Kvantitering av HPV. Diagnostisering av liposarkom.
 - RNA: RT-qPCR ved ulike fusjongenstranskripter og genekspressjon for beregning av MRD for oppfølging av pasienter med ALL, AML, KML og andre myeloproliferative neoplasier.
 - 5-8000/år.
- **Medisinsk biokjemi, Rikshospitalet, OUS**
 - Farmakogenetiske analyser for prediksjon av legemiddelrespons eller som kartlegging ved manglende effekt eller bivirkninger/toksisitet av legemidler.
 - 2-300/år.
- **Senter for medisinsk genetikk og molekylærmedisin, HUS**
 - BRCA mutasjonspanel med de 30 hyppigste mutasjonene (ikke kvantitativ).
 - Leukemi – under etablering for måling av behandlingsrespons (RNA)
- **Medisinsk biokjemi, Ullevål, OUS:**
 - Farmakogenetiske analyser (CYP2D6) og utredning av hemoglobinopati.
 - 300/år
- **Lab for klinisk biokjemi, HUS**
 - kvantitativt for diagnostikk av myeloproliferative sykdommer, absolutt kvantifisering og en semi-kvantitativ metode. Vurderes evt. for å verifisere MLPA funn.
 - 900/år

Veileder for sanntids PCR-analyse av DNA/RNA

Prøvemateriale og prøvebehandling

- Blod/vev
- DNA/RNA
- Oppbevaring
- Holdbarhet
- Stabilisering RNA

Ekstraksjon DNA/RNA (total/mRNA)

- Prinsipp
- DNA/RNA
- Utbytte
- Kvalitet
- Renhet
- Stabilisering RNA

cDNA-syntese (RNA)

- Prinsipp
- Primingstrategi
- Enzym
- Replikater

Sanntids PCR

- Prinsipp
- Metodedesign
- Relativ/absolutt
- Referansgener
- Replikater
- Kontroller
- Validering
- Dataanalyse
- Kategorisering
- Svarrapportering
- Validering

Relevante retningslinjer:

OECD Guidelines for quality assurance in molecular genetic testing, 2007

Clinical and Laboratory Standards Institute. MM1-A2. Molecular Diagnostics Methods for Genetic Diseases; Approved Guideline

EP17-A, Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantification

Clinical and Laboratory Standards Institute. MM13-A. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem 2009;55:611-22.

Mattocks CJ, et al. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. Eur J Hum Genet. 2010.

Norsk selskap for Humangenetikk

Veileder for rapportering av MLPA resultater (versjon 1; 11.02.2014)

Utarbeidet av: Bjørn Ivar Haukanes (HUS)
Wenche Sjursen (St Olavs Hosp)
Monica Ingebrigtsen og Marijke van Ghelue (UNN)
Mari Ann Kulseth (OUS)

- Relativt ny veileder for rapportering
- Oppdatere nomenklatur
 - MLPA(kit nr.-versjon)[hg19] Kromosomområde (xx--yy)x1
 - inkludere mer ift. krav til prøvemateriale, validering av metoden etc. ?