

Norsk Selskap for Human Genetikk

Veileder for genomisk kopitallsdiagnostikk

Versjon 2.0



Forord

Med matrisebasert kopitallsanalyse kom en ny æra i cytogenetisk diagnostikk da den gir høyere sensitivitet og spesifisitet for genomiske ubalanser enn konvensjonell karyotypering. Dog erstatter det ikke karyotyping helt da balanserte avvik (inversjoner, insersjoner, translokasjoner) ikke detekteres. Størrelsen på avvik som oppdages vil avhenge av plattformen som benyttes, men de som benyttes i dag er minst 100 ganger mer sensitive enn karyotyping (<100 kb). Da den nøyaktige plasseringen av alle probene er kjent, vil analysen umiddelbart gi informasjon om gener som er involvert i avviket og dermed også i mange tilfeller hvilket syndrom det er snakk om. På den andre siden finnes det, på lik linje med enkeltnukleotidvariasjon, også stor normalvariasjon i kopitall. Hvilke gener som tolererer dosevariasjon eller er dosesensitive er ikke fullstendig kartlagt og dette gir tolkningsmessige utfordringer. Det er foreløpig ingen klar internasjonal konsensus på hvordan dette bør gjøres. Dette skrevet gir anbefalinger for blant annet tolkning og rapportering og baserer seg på publisert arbeid på området¹⁻¹⁰.

Den første utgaven av veilederen for kopitallsanalyser ble utgitt 27.05.2013 og inkluderte kun postnatale analyser. Fra juni 2017 har flere laboratorier i Norge implementert matrisebaserte kopitallsanalyser for prenatale prøver. Retningslinjer for disse analysene er inkludert i denne versjonen av veilederen for kopitallsanalyser. Der annet ikke er spesifisert gjelder samme betingelser for prenatale og postnatale kopitallsanalyser.

Utarbeidet av NSHG arbeidsgruppe bestående av:

HUS: Siren Berland, Atle Brendehaug og Gunnar Houge.

UNN: Marie Falkenberg-Smeland, Ragnhild Glad, Mona Nystad og Hilde Monica F Riise Stensland.

OUS: Katrine Bjørge og Olaug Rødningen.

STHF: Anette Kildal Eek og Trine Prescott.

Innhold

| | |
|---|----|
| Indikasjon for kopitallsanalyser..... | 4 |
| Fenotypisk beskrivelse..... | 4 |
| Genetisk veiledning ved prenatale analyser..... | 4 |
| Informasjonsskriv og samtykkeskjema til foreldrene ved prenatale analyser | 4 |
| Matriseplattform | 4 |
| Prøvemateriale..... | 5 |
| Analyse av data..... | 5 |
| Tolkning av kopitallsvarianter | 6 |
| Deling av data | 7 |
| Rapportering..... | 7 |
| Rapporteringspraksis | 7 |
| Oppfølging av funn | 9 |
| Avvik som bør følges opp med foreldreprøver..... | 9 |
| Mistanke om familær CNV | 10 |
| Anbefalt svartid | 10 |
| Indikasjon for hasteprøve | 10 |
| Revisjon av veileder | 10 |
| Referanser | 10 |

Indikasjon for kopitallsanalyser

Denne veilederen beskriver bruk av helgenomisk kopitallsanalyse for påvisning av konstitusjonelle genetiske ubalanser hos pasienter med psykisk utviklingshemning og/eller flere medfødte misdannelser/dysmorfe trekk eller andre utviklingsavvik og/eller autisme. Kun autistiske trekk er ikke nok til å rekvirere arrayanalyser. Hos barn under 3 år med tydelig autisme («barneautisme») som det er vanskelig å vurdere kognitivt nivå på er det aktuelt å tilby arrayanalyse.

Det gis også retningslinjer for analyse og tolkning av prenatale prøver (PND). Ved prenataldiagnostikk kan analysen tilbys ved økt nakkeoppklaring hos fosteret (NT>3,5 mm), isolert kompleks hjertefeil, hjernemisdannelse, intrauterin vekstretardasjon (IUGR) i 1. og 2. trimester samt ved multiple malformasjoner. Kopitallsanalyse kan også tilbys for undersøkelse av påvist familiært kopitallsavvik, og kan vurderes der risikovurdering ved kombinert test i første trimester viser høy risiko (>1:250) som ikke skyldes trisomi. Kopitallsanalysen kan også tilbys ved isolerte strukturelle misdannelser.

Fenotypisk beskrivelse

For tolkning av kopitallsvariasjoner er en god fenotypisk beskrivelse helt nødvendig. Baksiden av rekvisisjonsskjema som er tilgjengelig på Genetikportalen¹¹ (samt ved avdelinger som har et diagnostisk tilbud på denne typen analyse) må fylles ut av alle rekvirenter ved ønske om kopitallsanalyse grunnet utviklingsavvik. Ved videre utredning av familiemedlemmer er det viktig at det klart kommer frem hvem som er indekspersonen og hvilken familiær relasjon personen har. Dersom familiemedlemmer har overlappende fenotype bør dette også opplyses om på rekvisisjonen.

Genetisk veiledning ved prenatale analyser

Det anbefales at det i tilknytning til invasiv diagnostikk og prenatal kopitallsanalyse tilbys genetisk veiledning av spesialist i medisinsk genetikk.

Informasjonsskriv og samtykkeskjema til foreldrene ved prenatale analyser

Tilpasset informasjonsskriv og samtykkeskjema for begge foreldre benyttes, der dette er mulig, ved prenatal kopitallsanalyse. Ved innhenting av foreldreprøver ved postnatal kopitallsanalyse bør det tilstrebes informert samtykke fra foreldrene.

Matriseplattform

Sentrene står fritt til å velge hvilken matrise som benyttes diagnostisk, men den bør ha en minimumsresolusjon på 100kb. Det bemerkes at SNP-baserte plattformer i tillegg til kopitallsinformasjon gir genotypeinformasjon som kan benyttes for å avdekke recessive tilstander, UPD og mosaikker.

Prøvemateriale

Matrisebasert kopitallsanalyse kan utføres på alle typer celler og vev, så lenge mengde og kvalitet blir tilfredsstillende. For postnatale prøver benyttes fortrinnsvis DNA isolert fra EDTA-blod. Andre kilder for DNA isolering kan være: vevsbiopsier, EBV-transformerte celler, beinmarg, abortmateriale (miltvev, halsene), fostervannsprøver (amniocytt), morkakevev (chorion villus biopsi) samt dyrkede celler fra disse materialene.

Analyse av data

Grenseverdier (størrelse, antall markører) som benyttes for å identifisere kopitallsvariantene settes av det enkelte laboratoriet basert på matriseplattformen som benyttes (Tabell 1).

Tabell 1: Oversikt over matriser og filtrering av data på prenatale og postnatale prøver i Norge.

| | Bergen/Tromsø | Oslo | Skien |
|------------|---|---|--|
| Matrise | SNP-array Affymetrix cytoscan HD | aCGH Agilent/OGT Standard postnatal: 180k Standard prenatal: 60k Ved behov: 400k, 1M, 180k CNV+SNP | aCGH Agilent Ulike arrays etter behov |
| Filtrering | Cartagenia Bench | Cytogenomics (Agilent) | |
| Postnatale | Tap/delesjoner: > 30 prober Tillegg/duplikasjoner: > 90 prober Homozygoti: > 5Mb og > 500 prober X-krom hos gutter: del og dup >15 kb og > 5 prober | Delesjoner og duplikasjoner: >4 prober (gir resolusjon ca. 50 kb ved 180k, 20 kb ved 400k, 8 kb ved 1M) Kan påvise mosaikk > ca. 20% Ved 180k CNV+SNP: Homozygoti: > 5Mb | Skien: Programvaren har en default setting der kopitallsvariasjoner på >3 prober slår ut (deteksjon ned til ca. 26 kb på 180K arrays). |
| Prenatale* | Samme filterinnstillinger som ved postnatale prøver. Homozygoti: > 5Mb** Rapporterer kun sykdomsassosierte kopitallsvarianter (hovedsakelig >500 Kb ved screening men ingen absolutt nedre grense mht størrelse). | Samme filterinnstillinger som ved postnatale prøver. OGT 60k: resolusjon på ekson/gennivå i viktige regioner, ellers ca. 100 kb Rapporterer kun sykdomsassosierte kopitallsvarianter (klasse 4/5) | Skien gjør ikke prenatale prøver. |

*Ved intrauterin fosterdød (IUFD) benyttes i hovedsak samme filterinnstillinger som til prenatale analyser. I de tilfeller hvor det er stor grad av degradert materiale/autolyse benyttes lav

resolusjonsfilter med 400 Kb og 30 markører (tap), 400 Kb og 90 markører (tillegg) (Tromsø/Bergen).

** Ved PND skal som hovedregel ikke homozygositetsområder svares ut med mindre det er mistanke om UPD.

Se forøvrig ulike internasjonale standarder^{7,10,12-14}.

Tolkning av kopitallsvarianter

I likhet med sekvensvarianter klassifiseres den enkelte kopitallsvariant i klasse 1 til 5. Kriteriene under gjelder for både prenatale og postnatale prøver, men filtreringen gjør at det bare er større avvik som oppdages ved prenatale prøver.

Følgende retningslinjer foreligger for klassifikasjonen:

Klasse 1. Nøytral variant

>10 overlappende CNVer med samme kopitallstatus i normalvariasjonsdatabaser /lister/publikasjoner. Avvikene bør foreligge i minst to ulike arbeider.

Data fra BAC studier bør ikke inkluderes.

Klasse 2. Sannsynlig nøytral variant

- Avvik i område uten annoterte gener.
- Annoterte gen er et pseudogen.
- Intronisk avvik i gen uten kjent dosesensitivitet / gen som ikke finnes i OMIM morbid.
- 3-9 CNVer i normalvariasjonsdatabaser.

Klasse 3. Variant av usikker betydning

- Ingen av de andre klassene.
- Sterk (3+) og svak (3-) kan benyttes der det er hensiktsmessig.

Klasse 4. Sannsynlig klinisk relevant variant

- Delesjon > 1Mb, minst 10 gener.
- Duplikasjon >2 Mb, minst 20 gener.
- 2 pasienter i Decipher/Ecaruca/ISCA med fenotypisk overlapp og tilsvarende avvik (likt kopitall, ≈ CNV størrelse og overlapp, *de novo*/fra syk forelder).
- 2 pasienter i artikler med fenotypiske overlapp og tilsvarende avvik.
- Avvik i kjent sykdoms-gen som gir overlappende fenotype, men hvor dosesensitivitet ikke er beskrevet.
- Sjeldne familiære sårbarhetsvarianter (variant med redusert penetrans).

Klasse 5. Klinisk relevant variant, patogen

- Avviket har samme kopitallstatus og overlapper med kjent syndromområde.

- Avvik i kjent dosesensitivt gen.
- ≥ 3 pasienter i PubMed med fenotypisk overlapp og tilsvarende avvik.
- Sårbarhetsvarianter.

Insidente funn

- Funn som ikke er knyttet opp mot klinikken hos pasienten/fostret.

I lys av klinikk kan CNVer reklassifiseres.

Deling av data

Det er viktig å få oversikt over funn og normalvarianter i Norge. Dette er en uvurderlig hjelp under analyse av kopitallsvarianter. HUS og UNN deler data og korte kliniske beskrivelser via Cartagena. Det er ønskelig at Oslo også deler data med resten av Norge.

Rapportering

Den endelige svarrapport godkjennes av en medisinsk genetiker eller molekylær genetiker. Helt normale funn (klasse 1) kan svares ut av bioingeniører/ingeniører/avdelingsingeniører.

Rapporten bør inneholde:

- Vev DNA er rensert fra (hvis kjent).
- Matriseplattform (oppløsning osv).
- Beskrivelse av den molekylære karyotype i henhold til ISCN 2013¹⁵ og helst ISCN 2016¹⁶.
- Versjon av genomet (Genome Build).
- Begrensninger ved analysen: I normale svar bør det fremgå at det ikke påvist "sikre" sykdomsgivende kopitallsvarianter.
- Tolkning av funn.

Tolkning av funn:

- Pasientens kjønn på bakgrunn av resultatet fra analysen.
- Hvorvidt den endelige tolkningen etter analysen vurderes som normal eller avvikende.
- Ved abnormale funn: Detaljert beskrivelse av avvik (lokalisering, størrelse, geninnhold) og mulige sammenhenger med kjente syndromer eller sykdommer.
- Hvis det er mulig si noe om gjentagelsesrisiko.
- Forslag til videre utredning og hvilket prøvemateriale som da vil være nødvendig, eventuelt forespørsel om ytterligere forskning.
- Anbefale henvisning til genetisk veiledning dersom det er indisert.

Rapporteringspraksis

Ved PND skal som hovedregel ikke homozygositetsområder svares ut med mindre det er mistanke om UPD.

Klasse 4 og 5 CNV

- Beskrives alltid i svarrapporten.

- Sårbarhetsvarianter må vurderes særskilt. Noen bør gis ut (Tabell 2)^{7,9,14} og andre ikke (Tabell 3)^{7,14}.

Tabell 2: Sårbarhetsvarianter som rapporteres uavhengig av om det er pre- eller postnatal prøve.^{9,17}

| CNV | Size | Gene | OMIM | Penetrance* % | De novo* % | Ultrasound findings | Phenotype |
|--------------------|----------|--------|--------|---------------------|------------|------------------------|-----------------|
| Distal 1q21.1 del | 1.35 Mb | GJA5 | 612474 | 36.9 (23–55) | 18–20 | CHD, eye, microcephaly | ID, ASD, E |
| Distal 1q21.1 dup | 1.35 Mb | GJA5 | 612475 | 29.1 (16.9–46.8) | | CHD, eye, macrocephaly | ID, ASD, SCZ |
| 15q13.3 del | 1.5–2 Mb | CHRNA7 | 612001 | 80.5 | | (CHD) | ID, ASD, E, SCZ |
| Distal 16p11.2 del | 220 kb | SH2B1 | 613444 | 62.4 (26.8–94.4) | 30–33.3 | | ID |
| Prox 16p11.2 del | 550 kb | TBX6 | 611913 | 46.8 (31.5–64.2) | 65–70.2 | (CHD) | ID, ASD, E |
| 17q12 del | 1.4Mb | HNF1B | 614527 | 34 (13.7–70) | 55.6–62 | Renal and urogenital | ID, ASD,(SCZ) |

ASD = autism spectrum disorder; CHD = congenital heart disease; CP = cleft palate; E = epilepsy; ID = intellectual disability; OA = oesophageal atresia; SCZ = schizophrenia; TAR = thrombocytopaenia absent radius syndrome; TOF = trachea-oesophageal fistula; () = association less clear; **Girirajan et al.*, 2010¹⁸.

Tabell 3: Sårbarhetsvarianter som ikke bør rapporteres ved prenatal analyse.^{9,17}

| CNV | Size | Gene | OMIM | Penetrance* % | De novo* % |
|---------------------|--------|-------|--------|---------------------|------------|
| 15q11.2 BP1-BP2 del | 450 kb | NIPA1 | 615656 | 10.4 (8.45–12.7) | 0 |
| 15q11.2 BP1-BP2 dup | 450 kb | NIPA1 | 608636 | | |
| 16p13.11 del | 1.5 Mb | MYH11 | | 13.1 (7.91–21.3) | 21.7 |
| 16p13.11 dup | 1.5 Mb | MYH11 | | | |
| Proximal 1q21.1 dup | 0.5 Mb | RBM8A | 612475 | 17.3 | |
| 16p12.2 deletion | 0.5 Mb | CDR2 | 136570 | 12.3 | |
| Xp22.31 dup | 1.5Mb | STS | | | |
| Xp22.33 del | Varies | SHOX | | | |

() = association less clear; **Girirajan et al.*, 2010¹⁸. I Norge er følgende rapporteringspraksis vanlig: 1q21.1 dup gir økt risiko for Fallot og ved funn av Fallot hos foster svares det ut. 15q11.2 BP1-2 og STS dup svares ikke ut ved postnatale prøver heller. SHOX-delesjon kan svares ut.

Klasse 3

- Hvorvidt avvikene inngår i svarrapporten vurderes skjønnsmessig.
- Dersom en variant påvises og rapporteres bør avviket beskrives i detalj.

Store homozygositetsområder

- >5Mb.
- Store homozygositetsområder svares kun ut dersom det er relevant for fenotypen.

Utsiktet funn/ Bærentilstander

- Forekommer sjeldent og må håndteres særskilt.

Noen kopitallsvarianter bør undersøkes i detalj for å se etter assosierte anomalier eller rapporteres i klinisk kontekst (Tabell 4)⁷.

Tabell 4: Kopitallsvarianter som svares ut kun hvis en årsakssammenheng er sannsynlig.^{9,17}

| CNV | Size | Gene | OMIM | Penetrance* % | De novo* % | Ultrasound findings | Phenotype |
|---------------------|----------|-------|--------|---------------------|------------|--------------------------------|------------------|
| 22q11.2 dup | 1.5/3 Mb | TBX1 | 608363 | 21.9 (14.7–31.8) | 7–25.5 | Bladder exstrophy, (CHD), (CP) | ID |
| Proximal 1q21.1 del | 200 kb | RBM8A | 274000 | 17.3 (10.8–27.4) | 0 | Absent radius | TAR syndrome |
| 17q12 dup | 1.4 Mb | HNF1B | 614526 | 21.1 (10.6–39.5) | 22.2 | Renal (OA & TOF), | ID, E, ASD (SCZ) |

ASD = autism spectrum disorder; CHD = congenital heart disease; CP = cleft palate; E = epilepsy; ID = intellectual disability; OA = oesophageal atresia; SCZ = schizophrenia; TAR = thrombocytopaenia absent radius syndrome; TOF = trachea-oesophageal fistula; () = association less clear; **Girirajan et al.*, 2010¹⁸.

Oppfølging av funn

Behov for teknisk validering vurderes skjønnsmessig. Fluorescens *in situ* hybridisering (FISH) analyse og karyotypering benyttes blant annet til å kartlegge balanserte avvik, lokaliseringen til avviket, mosaikker m.m. Ved mistanke om recessive tilstander ved funn av delesjon bør Sanger sekvensering eller Next Generation Sequencing (NGS) tilbys.

Ved spesielle tilstander (f.eks. ringkromosom 20, som oftest er i mosaikktilstand,¹⁹ og andre mosaikktilstander) kan det også bli aktuelt med konvensjonelle cytogenetiske metoder. Tilstander som tetrasomi 12p oppdages lettere ved kopitall enn ved dyrkning, som introduserer seleksjonspress. Som hovedregel er en DNA-basert metode mer egnet til å påvise en klinisk signifikant mosaikktilstand enn G-båndsanalyse.

Foreldreprøver kan med fordel innhentes før prenatal kopitallsanalyse gjøres, for å spare tid ved utredning av mulig funn hos foster.

Avvik som bør følges opp med foreldreprøver

Klasse 3-4

- Dersom nedarvede varianter mistenkes
- Dersom arvegang vil være av verdi for familiemedlemmene
- Dersom arvegang vil kunne påvirke klassifisering av variant

Nedarvede CNVer fra foreldre med liknende fenotype styrker mistanken om patogen CNV. *De novo* CNVer og nedarvede CNVer fra friske foreldre må vurderes skjønnsmessig.

Klasse 5

- Analyse av foreldre vurderes etter genetisk veiledning

Mistanke om familiær CNV

FISH bør vurderes da metoden avdekker balanserte avvik (insersjoner og translokasjoner). Interfase FISH-analyse kan benyttes ved mistanke om mosaikk.

Anbefalt svartid

Standard: 6 uker

Hasteprøve: 5-7 virkedager

Forbehold

- Fristen gjelder dersom DNA renses direkte fra mottatt prøvemateriale og nødvendig mengde/kvalitet oppnås, samt at laboratoriet ikke får tekniske problemer.

Indikasjon for hasteprøve

- PND.
- Pasienter under 3 mnd.
- Ved graviditet i familien.
- Andre medisinske grunner vurdert av lege.

Revisjon av veileder

Hvert tredje år.

Referanser

1. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *American journal of human genetics*. 2010;86(5):749-764.
2. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2011;13(7):680-685.
3. Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, et al. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2011;13(9):777-784.
4. de Leeuw N, Dijkhuizen T, Hehir-Kwa JY, et al. Diagnostic interpretation of array data using public databases and internet sources. *Human mutation*. 2012;33(6):930-940.
5. Riggs ER, Church DM, Hanson K, et al. Towards an evidence-based process for the clinical interpretation of copy number variation. *Clin Genet*. 2012;81(5):403-412.
6. Duzkale H, Shen J, McLaughlin H, et al. A systematic approach to assessing the clinical significance of genetic variants. *Clinical Genetics*. 2013;84(5):453-463.
7. Gardiner C, Wellesley D, Kilby MD, Kerr B. Recommendations for the use of chromosome microarray in pregnancy. June 2015. Unique document number G144 In. London: The Royal College of Pathologists; 2015.
8. Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA, de Leeuw N. Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clinical Genetics*. 2013;84(5):415-421.
9. Rosenfeld JA, Coe BP, Eichler EE, Cuckle H, Shaffer LG. Estimates of penetrance for recurrent pathogenic copy-number variations. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2013;15(6):478-481.

10. South ST, Lee C, Lamb AN, Higgins AW, Kearney HM. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2013;15(11):901-909.
11. Gentikkportalen www.genetikkportalen.no. Accessed 03.11, 2017.
12. Professional guidelines for clinical cytogenetics. Constitutional postnatal chromosomal microarray. Best practice guidelines. 2011 v2.00. In: Association for Clinical Cytogenetics; 2011.
13. Zahir FR, Marra MA. Use of Affymetrix Arrays in the Diagnosis of Gene Copy-Number Variation. *Current protocols in human genetics*. 2015;85:8.13.11-13.
14. Vanakker O, Vilain C, Janssens K, et al. Implementation of genomic arrays in prenatal diagnosis: the Belgian approach to meet the challenges. *European journal of medical genetics*. 2014;57(4):151-156.
15. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. *ISCN 2013: An internasjonal system for Human Cytogenetisk Nomenclature*. Basel: S. Karger AG; 2013.
16. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. *ISCN 2016: An internasjonal system for Human Cytogenetisk Nomenclature*. Basel: S. Karger AG; 2016.
17. Pathologists TRCo. Recommendations for the use of chromosome microarray in pregnancy June 2015. [Recommendations]. 2015; 1-17. Available at: http://www.bsgm.org.uk/media/956141/g144_useofcmapregnancy_jun15.pdf.
18. Girirajan S, Eichler EE. Phenotypic variability and genetic susceptibility to genomic disorders. *Human molecular genetics*. 2010;19(R2):R176-187.
19. Ring chromosome 20. 2017; Orphanet. Available at: www.orphanet.net. Accessed 03.11, 2017.