

**EXPERTISE ET PRESTATIONS DE SERVICES
QUALITE DES LABORATOIRES**

COMITE DES EXPERTS *AD HOC*

BENCHMARKING TRIAL

**RAPPORT GLOBAL DEFINITIF
Next Generation Sequencing (NGS)**

Hémopathies malignes

2020/2

Sciensano/NGS benchmarking trial/7-FR

Expertise et prestations de services
Qualité des laboratoires
Rue J. Wytsman, 14
1050 Bruxelles | Belgique

www.sciensano.be

COMITE DES EXPERTS AD HOC

Sciensano					
Secrétariat		TEL:	02/642.55.21	FAX:	02/642.56.45
Aline Antoniou	Coordinateur d'enquête	TEL:	02/642.55.27		
		e-mail:	Aline.Antoniou@sciensano.be		
Vanessa Ghislain	Coordinateur d'enquête remplaçant	TEL:	02/642.52.08		
		e-mail:	Vanessa.Ghislain@sciensano.be		
Experts	Institution				
Elke Boone	AZ Delta Hospital Roeselare				
Katrien De Mulder	AZ-St-Lucas Hospital Ghent				
Barbara Denys	UZ Ghent				
Barbara Dewaele	UZ Leuven				
Laurent Dewispelaere	LHUB-ULB				
Guy Froyen	Jessa Hospital Hasselt				
Barbara Lambert	IPG				
Marie Le Mercier	UZ Antwerp				
Matthijs Vynck	AZ Sint-Jan Brugge				
Thomas Delcourt	Sciensano				
Nicolas Loucheu	Sciensano				
Aline Hébrant	Sciensano				
Els Van Valckenborgh	Sciensano				
Mohamed Rida Soumali	Sciensano				
Marc Van Den Bulcke	Sciensano				

Les versions provisoires de ce rapport ont été transmises aux experts les: 18/12/2020, 05/01/2021, 28/01/2021, 01/02/2021 et 02/02/2021.

Ce rapport a été discuté lors de la réunion du comité des experts *ad hoc* le :18/01/2021.

Responsabilités :

Le comité d'experts *ad hoc* a été consulté pour avis au sujet du contenu du rapport global, de l'interprétation des résultats, des critères d'évaluation et de l'organisation des prochaines évaluations. La responsabilité du choix des échantillons utilisés et de la conception finale de l'enquête est portée par le service Qualité des laboratoires de Sciensano.

Autorisation de diffusion du rapport:

Par Aline Antoniou, coordinateur d'enquête du Benchmarking trial NGS, le 16/03/2021.

Tous les rapports sont également consultables sur notre site web:

https://www.wiv-isp.be/QML/activities/NGS/fr/rapports_annee.htm

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION.....	5
1.1. Objectif du Benchmarking trial NGS – hémopathies malignes.....	5
1.2. Activité sous-traitée.....	5
1.3. Matériel.....	5
1.4. Demande.....	5
1.5. Critères d'évaluation.....	7
2. RESULTATS.....	8
2.1. Participation au Benchmarking trial NGS.....	8
2.2. Aperçu des méthodes.....	8
2.3. Aperçu des résultats.....	11
2.3.1. NGS-2020-4.....	11
2.3.2. NGS-2020-5.....	15
2.3.3. NGS-2020-6.....	22
2.3.4. Taux de réussite des participants.....	24
3. ANNEXE.....	25
3.1. Aperçu des conclusions cliniques.....	25
3.1.1. NGS-2020-4.....	25
3.1.2. NGS-2020-5.....	28
3.1.3. NGS-2020-6.....	34
3.2. Interprétation du rapport individuel.....	38

1. INTRODUCTION

L'organisation des benchmarking trials fait partie du projet pilote national relatif à l'introduction de la technologie NGS dans notre système de soins de santé qui a débuté en janvier 2016. Ce projet, qui s'étale sur une période de 5 ans, vise à bien intégrer cette nouvelle technologie au sein de la pratique clinique à l'aide d'actions concrètes. Toutes les informations relatives à l'étude pilote NGS sont détaillées dans le NGS Roadbook :

<https://www.compermed.be/docs/Roadbook%20PersMed%20NGS%20FR.pdf>

Depuis février 2018, le ComPerMed et MolecularDiagnostics.be ont mis sur pied un groupe de travail afin de standardiser l'interprétation des variants et le contenu des rapports cliniques NGS. Ce projet répond à la demande des experts suite à la diversité des réponses observées lors des premiers benchmarking trials réalisés en 2017.

Ce groupe travaille plus particulièrement sur la standardisation :

- de la nomenclature des variants
- de la classification biologique des variants
- de la classification clinique des variants
- du contenu du rapport clinique

Les conclusions retenues ont été publiées sur le site du Belac :

<https://economie.fgov.be/sites/default/files/Files/Publications/files/Belac-FR/2-405NGS-FR.pdf>

1.1. Objectif du Benchmarking trial NGS – hémopathies malignes

L'objectif de ce Benchmarking trial est d'établir l'état des lieux de la manière dont les variants somatiques dans les hémopathies malignes sont détectés, sélectionnés et rapportés dans les protocoles cliniques.

1.2. Activité sous-traitée

Les échantillons d'ADN génomique ont été produits par la firme SeraCare et sont distribués par la firme Sopachem.

1.3. Matériel

Le matériel transmis lors de cette étude comprenait :

- 3 tubes contenant de l'ADN génomique (Volume: 10µl, Concentration: environ 50 ng/µl) provenant de 3 échantillons différents avec les références suivantes: NGS-2020-4, NGS-2020-5 et NGS-2020-6.

L'homogénéité et la stabilité des échantillons ont été validées par le fournisseur.

1.4. Demande

Les échantillons devaient être analysés selon les procédures en vigueur au laboratoire pour les pathologies suivantes :

NGS-2020-4: Syndromes myélodysplasiques EB2 (MDS-EB2)

NGS-2020-5 : Leucémie aigüe myéloblastique (AML)

NGS-2020-6 : Myélofibrose primitive (PMF)

Pour chaque échantillon, il avait été demandé de répondre tous les variants à rapporter dans le rapport clinique du patient, selon les procédures en vigueur de votre laboratoire, mais uniquement

pour les régions incluses dans la convention NGS et selon les workflows du ComPerMed (ne pas rapporter les autres variants éventuellement identifiés):

<https://www.inami.fgov.be/fr/professionnels/etablissements-services/laboratoires/Pages/oncologie-remboursement-biologie-moleculaire-ngs.aspx>
<https://www.compermed.be/fr/workflows#/>

échantillon	tumeur	gènes
NGS-2020-4	MDS-EB2	SF3B1 (exon 14, exon 15) TET2 (exon 3, exon 9-11) SRSF2 (exon 1-codon 95) ASXL1 (exon 13=dernier exon) DNMT3A (exon 8-23) RUNX1 (tous les exons) U2AF1 (exon 2-codon 34, exon 6-codon 157) TP53 (exon 3-9) EZH2 (tous les exons)
NGS-2020-5	AML	ASXL1 (exon 13=dernier exon) CEBPA (tous les exons) DNMT3A (exon 8-23) FLT3 (exon 14, exon 15, exon 20-codon 835) IDH1 (exon 4-hotspot) IDH2 (exon 4-hotspot) KIT (exon 8, exon 10, exon 17) NPM1 (exon 11-codon 288) RUNX1 (tous les exons) TET2 (exon 3, exon 9-11) TP53 (exon 3-9) WT1 (exon 7, exon 9)
NGS-2020-6	PMF	JAK2 (exon 12-F537_I546), exon 14-codon 617) MPL (exon 10) CALR (exon 9) ASXL1 (exon 13=dernier exon) EZH2 (tous les exons) TET2 (exon 3, exon 9-11) IDH1 (exon 4-hotspot) IDH2 (exon 4-hotspot) SRSF2 (exon 1-codon 95) SF3B1 (exon 14, exon 15)

Sur le site internet de réponses : <https://qml.wiv-isp.be/NGS/20202>, il avait été demandé aux participants:

- De répondre au questionnaire concernant la méthode d'analyse.
- D'encoder les paramètres demandés pour chaque variant identifié et rapporté dans le rapport clinique:
 - Nom du gène et numéro NM associé (choix multiples)
 - Nomenclature de référence de la séquence ADN codante selon HGVSn : <http://varnomen.hgvs.org/>
 - Nomenclature de référence de la séquence protéique selon HGVS p : <http://varnomen.hgvs.org/>
 - Fréquence allélique
 - Classification biologique (choix multiple)
 - Classification clinique (choix multiple)
- De rédiger une conclusion générale pour chaque cas clinique sous forme d'un texte libre.

A l'aide du lien belnet envoyé aux participants, il avait été demandé de transmettre les données brutes (fichiers fastq, bam, bai et vcf) pour chaque échantillon, le(s) fichier(s) BED contenant les régions ciblées par le panel utilisé, les fichiers contenant les positions et les séquences des primers utilisés lors de la stratégie d'enrichissement (MANIFEST, BED,...).

1.5. Critères d'évaluation

Ce rapport contient les résultats des 17 laboratoires participants. Pour l'identification des variants, les critères d'évaluation sont basés sur le consensus des laboratoires avec un seuil fixé à 2/3 des participants.

De manière détaillée, les critères d'évaluation sont :

1/ L'identification de tous les variants rapportés par au moins 2/3 des participants, présents dans les 3 échantillons: consensus des variants à rapporter. Les valeurs médianes des fréquences alléliques rapportées par les laboratoires pour ces variants ont été fournies à titre indicatif ainsi que les valeurs SD.

2/ L'absence de signalement des variants rapportés par moins de 1/3 des participants, présents dans les 3 échantillons: consensus des variants à ne pas rapporter.

Remarques : Les variants rapportés entre 1/3 et 2/3 des laboratoires sont également détaillés dans le rapport et sont transmis à titre indicatif : pas de consensus. Les variants liés au background génétique des échantillons et présents dans les 3 échantillons sont également non évalués et repris dans ce rapport à titre indicatif. Enfin, un variant avec un consensus peut être non évalué si le groupe d'experts ne valide pas le consensus établi par les laboratoires pour ce variant.

Concernant les interprétations biologiques et cliniques, pour les variants du consensus des variants à rapporter, les réponses des laboratoires ont été classées en "résultat attendu" (en vert), "acceptable" (en jaune), "non-recommandé mais acceptable" (en orange), "non-acceptable" (en rouge) et "non-évalué" (en gris). Ces catégories ont été définies par un groupe d'experts en comparant les résultats du consensus des laboratoires aux résultats obtenus à l'aide des guidelines belges. Le contenu des conclusions générales rapportées par les laboratoires a été classé par informations types reprises par au moins 2 laboratoires.

2. RESULTATS

2.1. Participation au Benchmarking trial NGS

17 laboratoires belges sont repris dans l'analyse des résultats.

Aperçu des participants

Région	N
Région flamande	12
Région bruxelloise	3
Région wallonne	2
Total	17

Laboratoire	N
Anatomie pathologique	1
Biologie Clinique	13
Génétique humaine	3
Total	17

2.2. Aperçu des méthodes

Q1. Génome de référence utilisé pour l'analyse

Réponses	N
hg18	1
hg19/GRCh37	15
hg38/GRCh38	1

Q2. Quel séquenceur utilisez-vous pour les analyses NGS sur hémopathies malignes (firme et plateforme)?

Réponses	N
Illumina - MiSeq	13
Illumina - NextSeq 550	2
Illumina - NextSeq 550Dx	1
Illumina - NovaSeq 6000	1

Q3. Quels panels de gènes sont utilisés pour les analyses NGS sur hémopathies malignes sur ADN (nom des kits commerciaux et/ou custom) ?

Réponses	N
TruSight Myeloid Sequencing panel, Illumina	3
AmpliSeq Myeloid panel, Illumina	1
Myeloid Solution (MYS), Sophia Genetics	1
Archer VariantPlex Myeloid	1
Custom panel, QIASeq, Qiagen	5
Custom panel, SeqCap EZ HyperCap, Roche	2
Custom panel, SeqCap, Roche	1
Custom panel, Haloplex, Agilent	1
Custom panel, Ion AmpliSeq, ThermoFisher	1
Custom panel, not specified	1

Q4. Quelle stratégie d'enrichissement est utilisée pour les analyses NGS sur hémopathies malignes sur ADN?

Réponses	N
Amplicon-based	11
Probe-based	6

Q5. Votre(vos) méthode(s) de séquençage est-elle single ou paired-end ?

Réponses	N
Paired-end	17

Q6. Quel est la longueur des reads générés par votre méthode ?

Réponses	N
100	1
150	9
151	1
251	1
340	2
360	1
variable	2

Q7. Quels outils bio-informatiques sont utilisés pour l'analyse des données ?

Réponses	N
CLC Genomics Workbench, Qiagen	5
SeqNext, JSI medical systems	5
Variant Studio Software, Illumina	3
QCI Interpret-Somatic Cancer, Qiagen	2
Sophia DDM, Sophia Genetics	2
Archer DX software	1
Open source/in-house development	5

Remarques : Les outils bio-informatiques ont été utilisés en *open source* selon les combinaisons suivantes: 1/BWA, GATK UnifiedGenotyper, Annovar, 2/bcbio, 3/ Pindel

Q8. Quelles catégories de variants somatiques sont détectées par votre méthode d'analyse NGS utilisée pour les hémopathies malignes sur ADN? et limite de détection pour la fréquence allélique (%)

LOD	2%	5%	Total
Indels	3	14	17
SNV (Single nucleotides variants)	3	14	17

Q9. Quels types d'échantillons sont séquencés par votre laboratoire pour la détection de variants somatiques?

Réponses	N
Prélèvement de moelle	17
Sang	17
Tissu congelé	4
Tissu frais	4
Tissu paraffiné	4
Frottis des muqueuses buccales	1

Q10. Pour la recherche de variants somatiques sur les hémopathies malignes réalisée en routine sur ADN, séquencez-vous un échantillon normal du même patient en parallèle de l'échantillon tumoral?

Réponses	N
Non	16
Dans certains cas, si suspicion de mutation germinale dans les gènes RUNX1, CEBPA	1

Q11. Quelle est la quantité minimum d'ADN génomique requise par votre laboratoire pour réaliser l'analyse NGS sur hémopathies malignes?

Réponses	N
0-10ng	3
11-50ng	7
51-100ng	4
101-200ng	1
plus de 201ng	2

Q12. Quelle est la méthode utilisée pour la quantification de l'ADN ?

Réponses	N
Qubit	9
NanoDrop	4
DropSens	2
Quantus	2

Q13. Quelles sont les guidelines utilisées pour l'interprétation des variants somatiques?

Réponses	N
BELAC 2-405-NGS Rev0-2018	1
BELAC 2-405-NGS Rev1-2019	1
BELAC 2-405-NGS Rev2-2019	16
Standardization of Somatic Variant Classifications in Solid and Haematological Tumours by a Two-Level Approach of Biological and Clinical Classes: An Initiative of the Belgian ComPerMed Expert Panel. Froyen et al. Cancers, 2019 (PMID: 31888289)	13
World Health Organization guidelines	10
Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists, Li et al., JMD, 2017, 19(1), (PMID: 27993330)	9
European LeukemiaNet guidelines	9
National Comprehensive Cancer Network Guidelines	7
ACMG-AMP: Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology, Richard et al., Genet Med, 2015, 17(5), (PMID: 25741868)	6

2.3. Aperçu des résultats

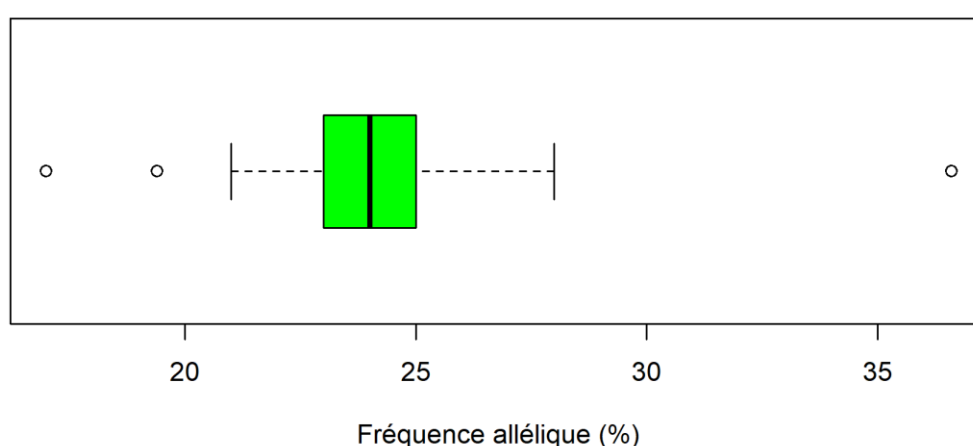
2.3.1. NGS-2020-4

genre	F
année de naissance	1963
informations médicales	Syndromes myélodysplasiques EB2 (MDS-EB2)
type d'échantillon	moelle osseuse

Consensus des variants à rapporter

- [SF3B1 NM_012433.3 c.1998G>T p.\(Lys666Asn\)](#)

SF3B1 NM_012433.3 c.1998G>T p.(Lys666Asn)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
17	23	24	25	36.6	1.48

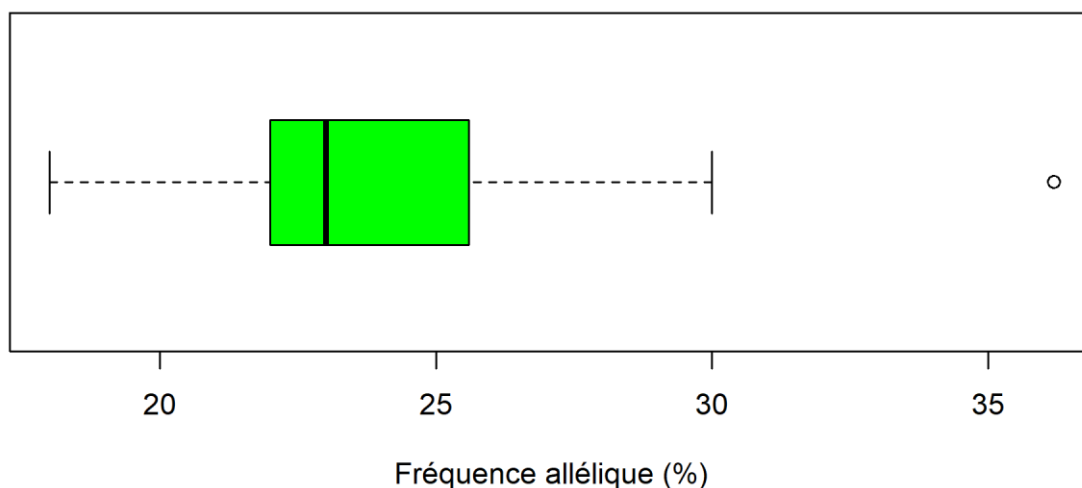
SF3B1 NM_012433.3 c.1998G>T p.(Lys666Asn) (Fréquence allélique médiane: 24 %)	
Identification du variant	N
Oui	17
Non	0
Classification biologique	N
Pathogénique	17
Total	17
Classification clinique	N
Tier I: Impact clinique avéré	17
Total	17

Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant SF3B1 NM_012433.3; c.1998G>T; p.(Lys666Asn). La nomenclature p.Lys666Asn, rapportée par un laboratoire, n'est pas recommandée selon les guidelines HGVS. Un autre laboratoire a rapporté le variant c.1998C>T à la place du variant c.1998G>T. Il s'agit probablement d'une erreur de retranscription du variant sur notre site internet puisque la mutation est correctement identifiée dans les données brutes (BAM et VCF) du laboratoire concerné. Concernant les classifications biologiques, le résultat attendu pour ce variant est la classification pathogénique. Concernant les classifications cliniques, le résultat attendu pour ce variant est la classification Tier I.

- [SF3B1 NM_012433.3 c.2098A>G p.\(Lys700Glu\)](#)

SF3B1 NM_012433.3 c.2098A>G p.(Lys700Glu) (Fréquence allélique médiane: 23 %)	
Identification du variant	N
Oui	17
Non	0
Classification biologique	N
Pathogénique	17
Total	17
Classification clinique	N
Tier I: Impact clinique avéré	17
Total	17

SF3B1 NM_012433.3 c.2098A>G p.(Lys700Glu)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
18	22	23	25.6	36.2	2.67

Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant SF3B1 NM_012433.3; c.2098A>G; p.(Lys700Glu). La nomenclature p.Lys700Glu, rapportée par un laboratoire, n'est pas recommandée selon les guidelines HGVS. Concernant les classifications biologiques, le résultat attendu pour ce variant est la classification pathogénique. Concernant les classifications cliniques, le résultat attendu pour ce variant est la classification Tier I.

Consensus des variants à ne pas rapporter

- [ASXL1 NM_015338.5 c.2879G>A Trp960*](#)

ASXL1 NM_015338.5 c.2879G>A Trp960* (Fréquence allélique médiane: 9 %)	
Identification du variant	N
Oui	1
Non	16
Classification biologique	N
Probablement pathogénique	1
Total	1
Classification clinique	N
Tier II: Impact clinique potentiel	1
Total	1

Commentaires: Dans cet échantillon, seul un laboratoire a identifié le variant ASXL1 NM_015338.5; c.2879G>A; Trp960*. Ce variant n'est pas présent dans les données brutes des autres laboratoires. Selon le consensus, ce variant ne doit pas être signalé. Les classifications biologiques et cliniques pour ce variant ne sont pas évaluées. De plus, nous rappelons que les guidelines HGVS recommandent de décrire cette séquence nucléotidique comme p.(Trp960*).

- [EZH2 NM_004456.4 c.728delA p.\(Lys243Asnfs*22\)](#)

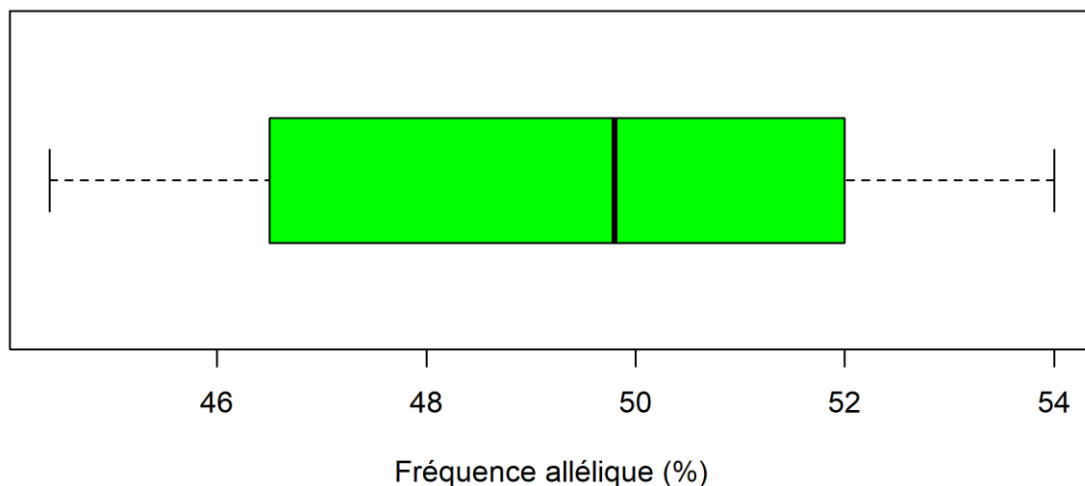
EZH2 NM_004456.4 c.728delA p.(Lys243Asnfs*22) (Fréquence allélique médiane: 11 %)	
Identification du variant	N
Oui	1
Non	15
Classification biologique	N
VUS	1
Total	1
Classification clinique	N
Tier III: Impact clinique indéterminé	1
Total	1

Commentaires: Dans cet échantillon, seul un laboratoire a identifié le variant EZH2 NM_004456.4; c.728delA; p.(Lys243Asnfs*22). Ce variant n'est pas présent dans les données brutes des autres laboratoires. Selon le consensus, ce variant ne doit pas être signalé. Les classifications biologiques et cliniques pour ce variant ne sont pas évaluées.

Variants non évalués

- [DNMT3A NM_175629.2 c.2732G>A p.\(Cys911Tyr\)](#)

DNMT3A NM_175629.2 c.2732G>A p.(Cys911Tyr)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
44.4	46.75	49.8	52	54	3.89

DNMT3A NM_175629.2 c.2732G>A p.(Cys911Tyr) (Fréquence allélique médiane : 49.8 %)	
Identification du variant	N
Oui	16
Non	1
Classification biologique	N
Probablement pathogénique	2
VUS	14
Total	16
Classification clinique	N
Tier I: Impact clinique avéré	1
Tier II: Impact clinique potentiel	1
Tier III: Impact clinique indéterminé	14
Total	16

Commentaires: Le variant DNMT3A NM_175629.2; c.2732G>A; p.(Cys911Tyr) est lié au background génétique de la lignée cellulaire utilisée pour la production des échantillons et est présent dans les 3 échantillons. Pour cette raison ce variant est non évalué. Il a été éliminé des variants rapportés par un laboratoire en raison de sa présence dans les 3 échantillons. Les classifications biologiques et cliniques pour ce variant sont transmises à titre informatif. Cependant, les classifications biologiques et cliniques validées par les experts sont les classifications VUS et Tier III.

Analyse des conclusions

Informations types	Informations spécifiques au cas 5 et reprises dans la conclusion générale par au moins 2 laboratoires (commentaires DNMT3A non évalués)	Laboratoires
Diagnostic	Variants SF3B1 récurrents dans les MDS - Profil mutationnel compatible avec diagnostic MDS	13
	Variants SF3B1 souvent associés à la présence de sidéroblastes en anneau (MDS-RS) - Profil mutationnel suggérant un diagnostic MDS-RS	15
	Variants SF3B1 rarement observés dans les MDS avec excès de blastes (MDS-EB) - Profil mutationnel compatible avec diagnostic MDS-EB2	4
Pronostic	Variants SF3B1 de pronostic favorable	16
	Aucune importance pronostique démontrée des variants SF3B1 dans les MDS-EB	4
	Variant SF3B1 p.(Lys666Asn) associé à une progression accrue et une survie réduite	2
Traitement	Traitement plus intensif suggéré en raison de la présence du variant SF3B1 p.(Lys666Asn)	2
Information sur gènes testés	Variants SF3B1 présents dans exon 14 et exon 15	2
Autres	Analyses complémentaires suggérées: caryotype, analyse morphologique, coloration au fer, paramètres hématologiques, etc.	2

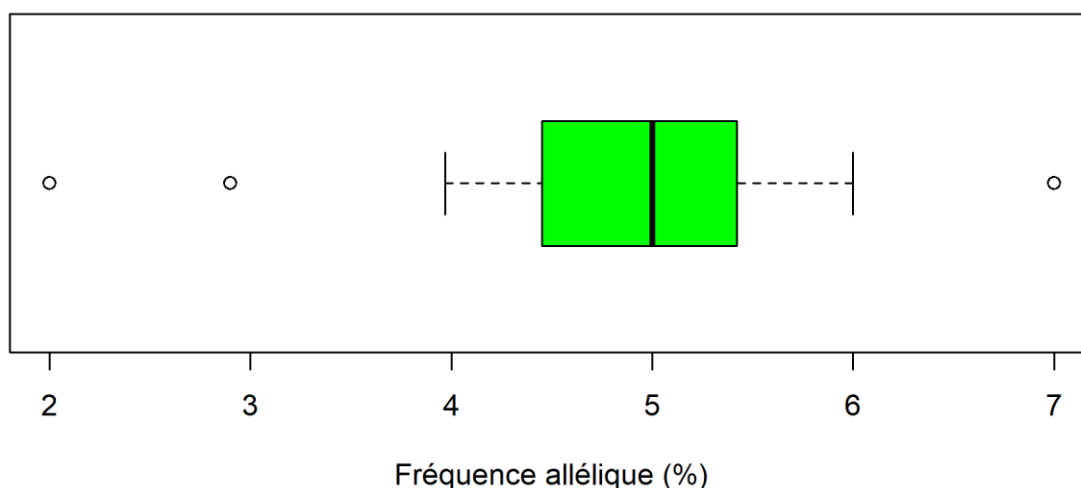
2.3.2. NGS-2020-5

genre	M
année de naissance	1968
informations médicales	Leucémie aigüe myéloblastique (AML)
type d'échantillon	moelle osseuse

Consensus des variants à rapporter

- [FLT3 NM_004119.2 c.2503G>T p.\(Asp835Tyr\)](#)

FLT3 NM_004119.2 c.2503G>T p.(Asp835Tyr)



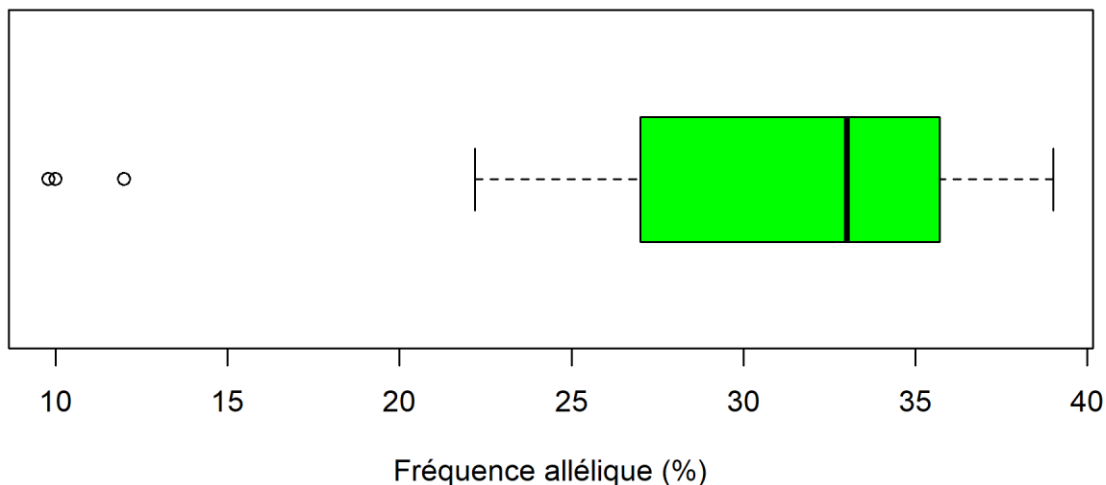
Min	P25	Median	P75	Max	SD
2	4.45	5	5.42	7	0.72

FLT3 NM_004119.2 c.2503G>T p.(Asp835Tyr) (Fréquence allélique médiane: 5 %)	
Identification du variant	N
Oui	15
Non	2
Classification biologique	N
Pathogénique	15
Total	15
Classification clinique	N
Tier I: Impact clinique avéré	14
Tier II: Impact clinique potentiel	1
Total	15

Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant FLT3 NM_004119.2; c.2503G>T; p.(Asp835Tyr). Deux laboratoires n'ont pas rapportés ce variant dont la fréquence allélique médiane est de 5%. Ces laboratoires ont fixé une limite de détection de 5% pour les SNV. La fréquence allélique de la mutation se trouve sur leur seuil de détection. Concernant les classifications biologiques, le résultat attendu pour ce variant est la classification pathogénique. Concernant les classifications cliniques, le résultat attendu pour ce variant est la classification Tier I. La classification Tier II est considérée comme non-acceptable étant donné le niveau d'évidence très élevé de ce variant.

- [NPM1 NM_002520.6 c.860_863dup p.\(Trp288Cysfs*12\)](#)

NPM1 NM_002520.6 c.860_863dup p.(Trp288Cysfs*12)



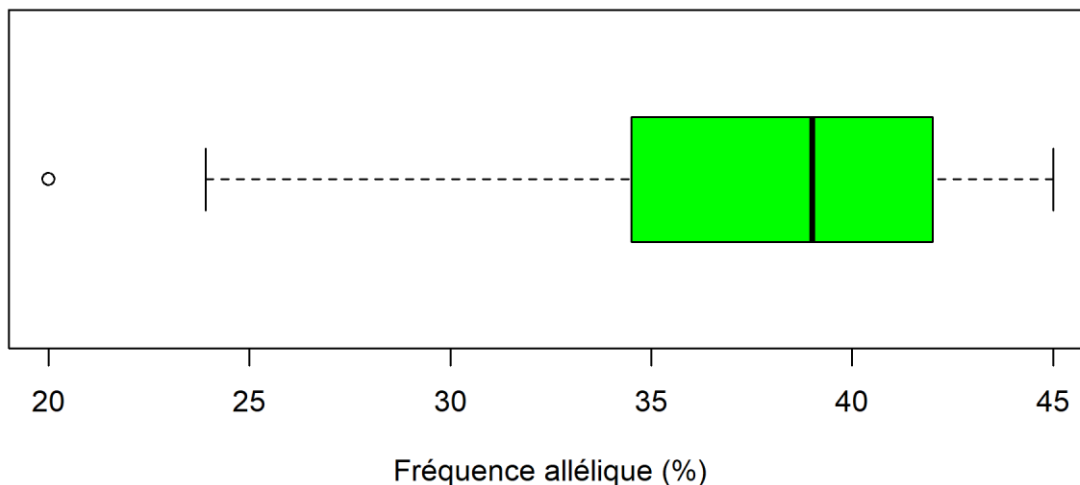
Min	P25	Median	P75	Max	SD
9.8	27	33	35.7	39	6.45

NPM1 NM_002520.6 c.860_863dup p.(Trp288Cysfs*12) (Fréquence allélique médiane: 33 %)	
Identification du variant	N
Oui	17
Non	0
Classification biologique	N
Pathogénique	17
Total	17
Classification clinique	N
Tier I: Impact clinique avéré	17
Total	17

Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant NPM1 NM_002520.6; c.860_863dup; p.(Trp288Cysfs*12). Concernant les références DNA: la nomenclature c.860_863dupTCTG, rapportée par 6 laboratoires, n'est pas recommandée selon les guidelines HGVS. Cette description est plus longue, elle contient des informations redondantes et les chances de faire une erreur augmentent. Concernant les références protéiques: la nomenclature Trp288Cysfs*12, rapportée par un laboratoire, n'est pas recommandée selon les guidelines HGVS. La nomenclature p.(Trp288Cysfs?*12), rapportée par un laboratoire, n'est pas valide selon les guidelines HGVS. La nomenclature p.(Trp288Cysfs*?), rapportée par 2 laboratoires, signifie que la séquence frameshift prédite n'entraîne pas la rencontre d'un codon de terminaison (stop) prématuré contrairement à la nomenclature attendue qui prévoit la rencontre d'un codon stop après 12 acides aminés. Cette nomenclature est incorrecte. Concernant les classifications biologiques, le résultat attendu pour ce variant est la classification pathogénique. Concernant les classifications cliniques, le résultat attendu pour ce variant est la classification Tier I.

- [ASXL1 NM_015338.5 c.1934dup p.\(Gly646Trpfs*12\)](#)

ASXL1 NM_015338.5 c.1934dup p.(Gly646Trpfs*12)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
20	34.75	39	42	45	5.37

ASXL1 NM_015338.5 c.1934dup p.(Gly646Trpfs*12) (Fréquence allélique médiane : 39 %)	
Identification du variant	N
Oui	16
Non	1
Classification biologique	N
Pathogénique	3
Probablement pathogénique	13
Total	16
Classification clinique	N
Tier I: Impact clinique avéré	10
Tier II: Impact clinique potentiel	6
Total	16

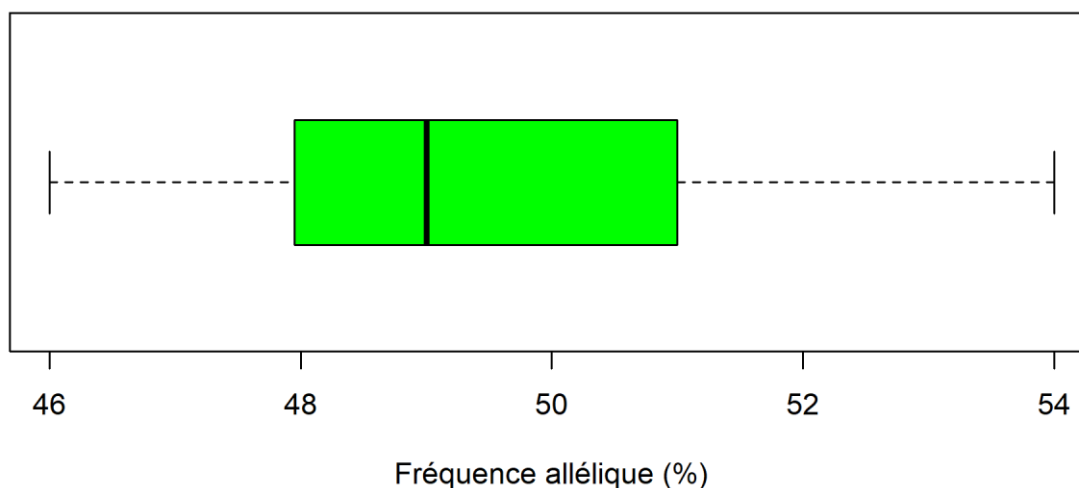
Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant ASXL1 NM_015338.5; c.1934dup; p.(Gly646Trpfs*12). Seul un laboratoire n'a pas rapporté ce variant malgré sa présence dans les données brutes du laboratoire concerné (fichier VCF). Un autre laboratoire a rapporté le variant c.1941dupG à la place du variant c.1934dup. Il s'agit probablement d'une erreur de retranscription du variant sur notre site internet puisque la mutation est correctement identifiée dans les données brutes (BAM et VCF) du laboratoire concerné. Concernant les références DNA: la nomenclature c.1934dupG, rapportée par 8 laboratoires, n'est pas recommandée selon les guidelines HGVS. Cette description est plus longue, elle contient des informations redondantes et les chances de faire une erreur augmentent. Concernant les références protéiques: la nomenclature p.Gly646Trpfs*12, rapportée par un laboratoire, n'est pas recommandée selon les guidelines HGVS. La nomenclature p.(Gly646TrpFs*?12), rapportée par un laboratoire, n'est pas valide selon les guidelines HGVS. Concernant les classifications biologiques, le résultat attendu pour ce variant est la classification probablement pathogénique. Dans les guidelines belges: une perte de fonction (LoF) de type frameshift dans un gène Tumeur Suppresseur (TS) est classée probablement pathogénique. La classification pathogénique est considérée comme non-acceptable. Les frameshifts dans le gène ASXL1 ne sont pas présents dans le tableau "Consensus pathogenic variants (CPV) Solid / Myeloid list". Ces règles seront maintenues lors de la prochaine révision des guidelines. Concernant les classifications cliniques, il n'y a pas de consensus des laboratoires. Les classifications Tier I et Tier II n'ont pas été évaluées

par les experts en raison de l'absence de directives claires pour les classifications Tier des variants pronostiques.

Variants non évalués

- DNMT3A NM_175629.2 c.2732G>A p.(Cys911Tyr)

DNMT3A NM_175629.2 c.2732G>A p.(Cys911Tyr)



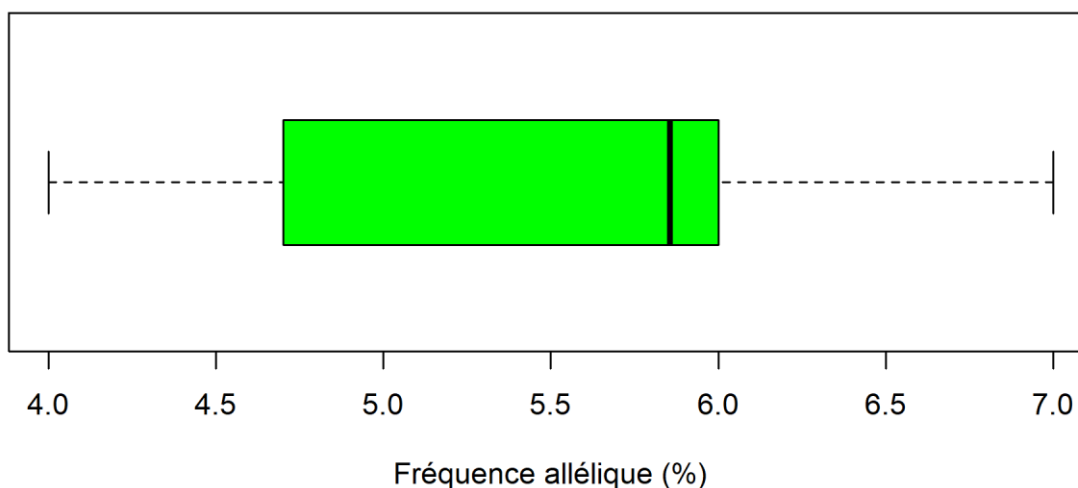
Min	P25	Median	P75	Max	SD
46	47.98	49	51	54	2.24

DNMT3A NM_175629.2 c.2732G>A p.(Cys911Tyr) (Fréquence allélique médiane : 49.8 %)	
Identification du variant	N
Oui	16
Non	1
Classification biologique	N
Probablement pathogénique	2
VUS	14
Total	16
Classification clinique	N
Tier I: Impact clinique avéré	1
Tier II: Impact clinique potentiel	1
Tier III: Impact clinique indéterminé	14
Total	16

Commentaires: Le variant DNMT3A NM_175629.2; c.2732G>A; p.(Cys911Tyr) est lié au background génétique de la lignée cellulaire utilisée pour la production des échantillons et est présent dans les 3 échantillons. Pour cette raison ce variant est non évalué. Il a été éliminé des variants rapportés par un laboratoire en raison de sa présence dans les 3 échantillons. Les classifications biologiques et cliniques pour ce variant sont transmises à titre informatif. Cependant, les classifications biologiques et cliniques validées par les experts sont les classifications VUS et Tier III.

- NPM1 NM_002520.6 c.859delinsGTCTG p.(Leu287Valfs*13)

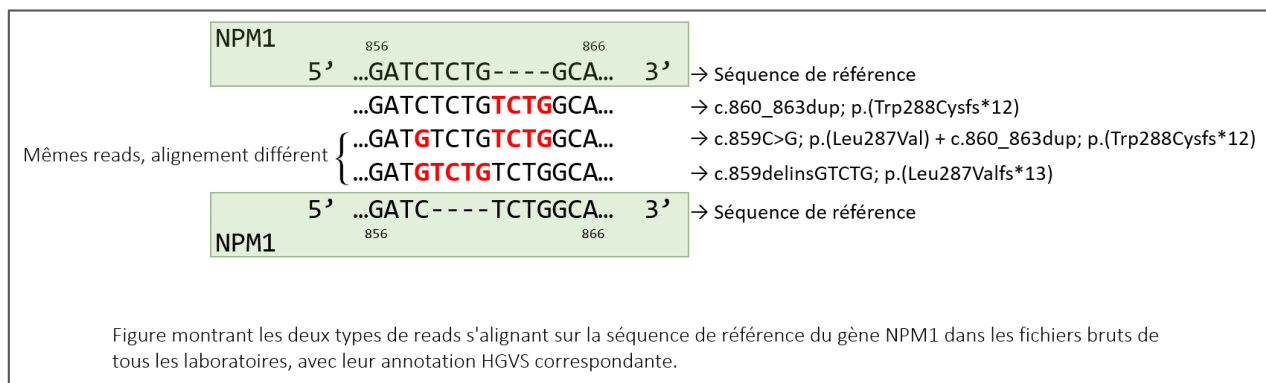
NPM1 NM_002520.6 c.859delinsGTCTG p.(Leu287Valfs*13)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
4	4.73	5.86	6	7	0.95

NPM1 NM_002520.6 c.859delinsGTCTG p.(Leu287Valfs*13) (Fréquence allélique médiane : 5.86 %)	
Identification du variant	N
Oui	10
Non	7
Classification biologique	N
Pathogénique	9
Probablement pathogénique	1
Total	10
Classification clinique	N
Tier I: Impact clinique avéré	8
Tier II: Impact clinique potentiel	2
Total	10

Commentaires: Le variant NPM1 NM_002520.6; c.859delinsGTCTG a été rapporté par 10 laboratoires. 7 laboratoires ont rapportés ce variant avec la référence protéinique p.(Leu287Valfs*13), un laboratoire avec la référence Leu287Valfs*13, un laboratoire avec la référence p.(Leu287Valfs*14) et un laboratoire avec la référence p.(Leu287Valfs*?). Après analyse bio-informatique, ce variant peut également correspondre à la combinaison des deux variants décrits séparément comme NPM1 NM_002520.6; c.859C>G; p.(Leu287Val) et NPM1 NM_002520.6; c.860_863dup; p.(Trp288Cysfs*12). Etant donné que ces deux variants sont présents sur les mêmes reads, ils peuvent également être rapportés en une seule nomenclature commune. La nomenclature HGVS recommande que deux variants séparés par 1 nucléotide ou plus doivent être décrits individuellement et non comme des «delins». Dans la description c.(859C> G; 860_863dup), la distance entre les 2 variants est inférieure à 1. Cependant, selon la façon dont l'alignement est effectué, la distance entre ces deux variants peut être également considérée de 4 nucléotides (voir figure p.20). La nomenclature HGVS n'est actuellement pas claire sur ce point. En raison de l'ambiguïté dans l'annotation de ce variant, les experts ont décidé de ne pas l'évaluer. Les classifications biologiques et cliniques sont transmises à titre indicatif.



- NPM1 NM_002520.6 c.859C>G p.(Leu287Val)

NPM1 NM_002520.6 c.859C>G p.(Leu287Val) (Fréquence allélique médiane: 6.7 %)	
Identification du variant	N
Oui	3
Non	14
Classification biologique	N
Pathogénique	1
VUS	2
Total	3
Classification clinique	N
Tier I: Impact clinique avéré	1
Tier III: Impact clinique indéterminé	2
Total	3

Commentaires: Dans cet échantillon, seuls 3 laboratoires ont identifié correctement le variant NPM1 NM_002520.6; c.859C>G; p.(Leu287Val). Après analyse de l'alignement des reads des laboratoires concernés, ce variant est bien présent dans leurs données brutes (BAM et VCF) ainsi que dans les données de l'ensemble des autres participants. 10 autres laboratoires ont rapporté ce variant combiné au variant NPM1 NM_002520.6; c.860_863dup; p.(Trp288Cysfs*12) sous la référence NPM1 NM_002520.6; c.859delinsGTCTG; p.(Leu287Valfs*13). En effet, étant donné que ces deux variants sont présents sur les mêmes reads, ils peuvent également être rapportés en une seule nomenclature commune. La nomenclature HGVS recommande que deux variants séparés par 1 nucléotide ou plus doivent être décrits individuellement et non comme des «delins». Dans la description c.(859C> G; 860_863dup), la distance entre les 2 variants est inférieure à 1. Cependant, selon la façon dont l'alignement est effectué, la distance entre ces deux variants peut être également considérée de 4 nucléotides (voir figure ci-dessus). La nomenclature HGVS n'est actuellement pas claire sur ce point. En raison de l'ambiguïté dans l'annotation de ce variant, les experts ont décidé de ne pas l'évaluer. Les classifications biologiques et cliniques sont transmises à titre indicatif.

Analyse des conclusions

Informations types	Informations spécifiques au cas 6 et reprises dans la conclusion générale par au moins 2 laboratoires (commentaires DNMT3A non évalués)	Laboratoires
Diagnostic	Profil mutationnel compatible avec le diagnostic AML	12
	Entité diagnostique distincte dans la classification OMS: 'AML with NPM1 mutated'	9
	Présence de variants ASXL1 indicatif d'un AML secondaire	3
Pronostic	Variant NPM1 de pronostic favorable en l'absence d'un variant FLT3-ITD	13
	Effet bénéfique supplémentaire du pronostic du variant NPM1 en raison de son association au variant FLT3-TKD	5
	Variant ASXL1 de pronostic défavorable - Effet péjoratif potentiel du pronostic dû à la présence du variant ASXL1	12
	Présence du variant ASXL1 sans influence sur le profil pronostic favorable lié au variant NPM1	3
	Variant FLT3-TKD de pronostic défavorable	3
Traitement	Sensibilité aux inhibiteurs tyrosine kinase FLT3 lié à la présence du variant FLT3-TKD	13
	Mécanismes de résistance potentielle à certains inhibiteurs - Absence de réponse aux inhibiteurs tyrosine kinase de type II	3
Information sur gènes testés	Variant NPM1 de type A	4
	Variant FLT3-TKD présent dans l'exon 20	2
	Variant NPM1 avec insertion dans l'exon 11	2
	Présence d'un sous-clone tumoral FLT3-TKD+ limité	2
Autres	Analyses complémentaires suggérées: recherche FLT3-ITD par une méthode indépendante, analyse cytogénétique, confirmation des variants avec VAF <5%	3

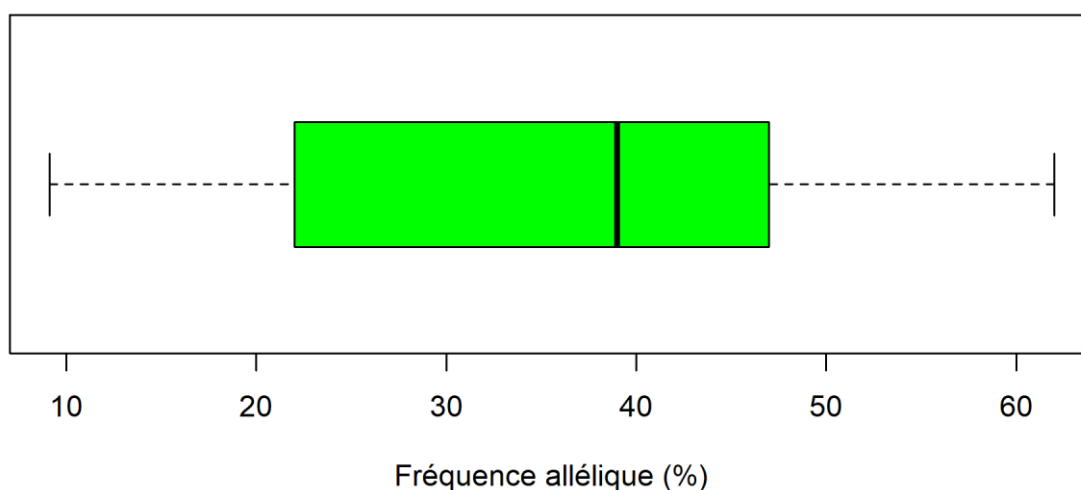
2.3.3. NGS-2020-6

genre	M
année de naissance	1947
informations médicales	Myélofibrose primitive (PMF)
type d'échantillon	moelle osseuse

Consensus des variants à rapporter

- [CALR NM_004343.3 c.1099_1150del p.\(Leu367Thrfs*46\)](#)

CALR NM_004343.3 c.1099_1150del p.(Leu367Thrfs*46)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
9.13	22	39	47	62	18.53

CALR NM_004343.3 c.1099_1150del p.(Leu367Thrfs*46) (Fréquence allélique médiane : 39 %)	
Identification du variant	N
Oui	17
Non	0
Classification biologique	N
Pathogénique	17
Total	17
Classification clinique	N
Tier I: Impact clinique avéré	17
Total	17

Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant CALR NM_004343.3; c.1099_1150del; p.(Leu367Thrfs*46). Concernant les références DNA: la nomenclature c.1099_1150del52, rapportée par un laboratoire, n'est pas valide selon les guidelines HGVS. Un autre laboratoire a rapporté le variant c.1092_1143del à la place du variant c.1099_1150del. En effet, une séquence identique de 7 nucléotides, en début et juste après la délétion de 52 pb, permet d'aligner la délétion en position 1092. Cependant cette nomenclature est incorrecte selon les guidelines HGVS, en raison de la règle de description en 3' de la séquence de référence. Concernant les références protéiques: la nomenclature p.(Leu367ThrfsTer46), rapportée par un laboratoire, n'est pas recommandée selon les guidelines belges. La nomenclature p.(Leu367Thrfs?46), rapportée par un laboratoire, n'est pas valide selon les guidelines HGVS. La nomenclature p.(Leu367Thrfs*?), rapportée par 2 laboratoires, signifie que la séquence frameshift

prédite n'entraîne pas la rencontre d'un codon de terminaison (stop) prématuré, contrairement à la nomenclature attendue qui prévoit la rencontre d'un codon stop après 46 acides aminés. Cette nomenclature est incorrecte. Concernant les classifications biologiques, le résultat attendu pour ce variant est la classification pathogénique. Concernant les classifications cliniques, le résultat attendu pour ce variant est la classification Tier I.

Consensus des variants à ne pas rapporter

- [CALR NM_004343.3 c.1144delG p.\(Ala382Glnfs*48\)](#)

CALR NM_004343.3 c.1144delG p.(Ala382Glnfs*48) (Fréquence allélique médiane: 31.4 %)	
Identification du variant	N
Oui	1
Non	15
Classification biologique	N
Pathogénique	1
Total	1
Classification clinique	N
Tier I: Impact clinique avéré	1
Total	1

Commentaires: Dans cet échantillon, seul un laboratoire a identifié le variant CALR NM_004343.3; c.1144delG; p.(Ala382Glnfs*48). Un alignement incorrect des reads a été observé dans les données brutes du laboratoire concerné. Il s'agit d'une erreur technique due au flux de travail bio-informatique. Ce variant correspond en réalité au variant consensus c.1099_1150del; p.(Leu367Thrfs*46). Selon le consensus, ce variant ne doit pas être signalé. Les classifications biologiques et cliniques pour ce variant ne sont pas évaluées. De plus, nous rappelons que pour les délétions, les guidelines HGVS recommandent de ne pas décrire la séquence nucléotidique délétée (c.1144del au lieu de c.1144delG).

Analyse des conclusions

Informations types	Informations spécifiques au cas 7 et reprises dans la conclusion générale par au moins 2 laboratoires	Laboratoires
Diagnostic	Variant CALR récurrent dans les MPN de type PMF et ET - Profil mutationnel compatible avec diagnostic MPN, PMF et ET	16
Pronostic	Dans PMF, variant CALR (type 1) de pronostic favorable - plus favorable que les variants JAK2, MPL, triple négatif ou que variant CALR de type 2	16
	Augmentation du risque de transformation en myélofibrose liée à la présence du variant CALR (dans ET)	2
	Modèles pronostiques intégrés des PMF: Scores de risque MIPSS70 et GIPSS	4
Information sur gènes testés	Variant CALR de type 1	15
	Variant CALR avec délétion dans l'exon 9	3
Autres	Analyses complémentaires suggérées nécessaires aux scores de risque MIPSS70 et GIPSS: caryotype, paramètres hématologiques, etc.	2

2.3.4. Taux de réussite des participants

Consensus des variants à rapporter

Taux de réussite basé sur le consensus des variants à rapporter	N
6/6 (100%)	14
5/6 (83,33%)	3
Taux de réussite total: 99/102 (97,06%)	

Consensus des variants à ne pas rapporter

Trois variants ont été rapportés par moins d'un tiers des participants et ont été classés dans la catégorie des variants à ne pas rapporter. Ces trois variants sont rapportés par trois laboratoires différents.

Classifications biologiques et cliniques

Taux de réussite des participants pour les classifications pour le consensus des variants à rapporter *	N
Classifications biologiques *	
6/6 ou 5/5 (100%)	17
Taux de réussite total - classifications biologiques : 99/99 (100%)	
Classifications cliniques	
5/5 ou 4/4 (100%)	16
4/5 (80%)	1
Taux de réussite total - classifications cliniques : 82/83 (98,80%)	

*Les résultats « non recommandés mais acceptables » sont considérés comme réussis.

3. ANNEXE

3.1. Aperçu des conclusions cliniques

Ces données ont été extraites à partir des réponses faites sur le site internet <https://qml.wiv-isp.be/NGS/20202/>. Afin de ne pas introduire d'erreurs de traduction, les conclusions ont été conservées dans la langue utilisée par les laboratoires.

3.1.1. NGS-2020-4

<p>Variante in SF3B1, zoals de gedetecteerde hotspotmutaties c.2098A>G (p.(Lys700Glu)) en c.1998G>T (p.(Lys666Asn)), zijn recurrent in myelodysplastisch syndroom en worden geassocieerd met een gunstige prognose. SF3B1 varianten worden sterk geassocieerd met MDS met ring sideroblasten. (Malcovati et al., 2020 SF3B1-mutant MDS as a distinct disease subtype: a proposal from the International Working Group for the Prognosis of MDS. Blood 136: 1578-170.)</p> <p>De biologische en klinische betekenis van de variant c.2732G>A (p.(Cys911Tyr)) is niet gekend (VUS, variant of unknown significance).</p>	1
<p>De gevonden varianten in het gen SF3B1 zijn recurrent in de context van MDS (vaak geassocieerd met de aanwezigheid van ring sideroblasten).</p> <p>De aanwezigheid van een variant in het SF3B1 gen wordt geassocieerd met een gunstige prognose (Ref: Swerdlow et al., WHO 2017; Kennedy and Ebert, J Clin Onc 2017. 35(9):968-974).</p>	2
<p>Mutaties in SF3B1 komen vooral voor in MDS en zijn geassocieerd met ringsideroblasten (80-90%) en een betere prognose (Patnaik et al., AJH 2016; NCCN MDS guidelines 1.2020).</p>	3
<p>Aanwezigheid van 2 pathogene SF3B1 varianten, geassocieerd met MDS RARS of RCMD-RS (81%). Wijst op betere overleving en del(5q).</p>	4
<p>Er werd een SF3B1 (NM_012433.3(SF3B1):c.1998G>T (p.(Lys666Asn)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 14.</p> <p>Er werd een SF3B1 (NM_012433.3(SF3B1):c.2098A>G (p.(Lys700Glu)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 15.</p> <p>De aanwezigheid van dit type varianten heeft significant klinische betekenis in MDS (tier I). SF3B1 mutaties komen voor in 80-90% van de MDS-RS-SLD cases en zijn geassocieerd met een betere prognose (PMID: 25957392, 32347921 WHO p. 110, NCCN guidelines MDS). SF3B1 varianten samen met eventuele additionele mutaties in TET2 of DNMT3A varianten zijn ook frequenter bij MDS-RS MLD dan in MDS-RS SLD (PMID: 25957392, WHO). Er is echter ook een verhoogde kans op progressie naar AML in aanwezigheid van een SF3B1 variant (PMID: 29988143).</p> <p>Er werden geen andere (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in het STH myeloïde subpaneel (inclusief TET2, SRSF2, ASXL1, DNMT3A, RUNX1, U2AF1, TP53 en EZH2). Daarnaast werd ook 1 variant met ongekende biologische en klinische betekenis geïdentificeerd in DNMT3A, cfr tabel.</p>	5

<p>Présence de variants des gènes SF3B1 et ASXL1.</p> <p>Les variants SF3B1 sont retrouvés dans 20-30% des syndromes myélodysplasiques (MDS) et constituent les atteintes cardinales des syndromes myélodysplasiques avec sidéroblastes en anneaux (MDS-RS) et des syndromes mixtes avec sidéroblastes en anneaux et thrombocytose (MDS/MPN-RS-T).^{1,2} Dans ces 2 entités, ces variants sont présents dans >80% des cas. Dans les syndromes myélodysplasiques au sens large, la présence de variants du gène SF3B1 est associée à un bon pronostic et un risque moindre de transformation en leucémie aigüe.^{1,2,3} A ce titre, le statut mutationnel du gène SF3B1 est inclus dans le score pronostique des SMD de la Taussing Cancer Institute (score incluant l'âge, le score IPPS-R et les statuts SF3B1, TP53 et EZH2.³</p> <p>Les variants du gène ASXL1 sont retrouvés dans 15-25% des syndromes myélodysplasiques.¹ Ces variants sont indépendamment associés à une péjoration du pronostic dans les toutes les pathologies myéloïdes.¹</p> <p>En conclusion, ce patient présente un profil moléculaire suggestif de syndrome myélodysplasique de type MDS-RS en évolution. En cas de transformation leucémique secondaire, ce profil serait associé à un pronostic péjoratif.^{1,4}</p> <p>1. NCCN Guidelines Version 1.2021 Myelodysplastic Syndromes 2. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. D. Arber et al. Blood 2016 3. Incorporation of molecular data into the Revised International Prognostic Scoring System in treated patients with myelodysplastic syndromes. A. Nazha et al. Leukemia. 2016 4. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. E. Papaemmanuil. 2016</p>	6
<p>In deze casus worden 2 varianten gevonden in het SF3B1 gen, beiden Tier klasse I, significant klinisch belang.</p> <p>In de globale ziekte-entiteit MDS zijn varianten in het spliceome gen SF3B1 aanwezig in 20-30% van de gevallen en hangen ze samen met een eerder gunstige prognose. Varianten in SF3B1 gaan specifiek gepaard met het ontstaan van ringsideroblasten.</p> <p>Recente literatuur suggereert de SF3B1 gemuteerde MDS als aparte entiteit te beschouwen, op basis van risico stratificatie en therapeutische implicaties (zie Malcovati et al.), al lijkt deze gunstige invloed niet meer van toepassing in de ziekte fase MDS-EB2 cfr huidige casus.</p> <p>Daarnaast wordt een variant in het DNMT3A gen gevonden. Deze wordt beschouwd als Tier klasse I, significant klinisch belang.</p> <p>Varianten in DNMT3A zijn vaak voorkomend bij MDS (ongeveer 10-15% van de gevallen), waarbij ze geassocieerd zijn met een verminderde prognose. Voorzichtigheid is echter wel geboden, aangezien varianten in DNMT3A evenwel ook voorkomen in een normale oudere populatie.</p> <p>Referenties</p> <p>1. Arber et al. Blood 2016;127:2391-4052 2. Malcovati et al. Blood 2015;126:233-41 3. Patnaik et al. Am J Hematol 2015;90:549-59 4. Cazzola et al. Blood 2013;121:260-9 5. Bejar et al. Haematologica 2014;99:956-64 6. Haferlach et al. Leukemia 2014;28:241-7 7. Malcovati et al. Blood 2020;136:157-70</p>	7
<p>NGS analyse toont de aanwezigheid van 2 varianten met significant klinisch belang (TIER I):</p> <ul style="list-style-type: none"> - SF3B1 c.2098A>G p.(Lys700Glu) (allel frequency 26%) en - SF3B1 c.1998G>T p.(Lys666Asn) (allel frequency 21%) <p>Deze mutaties komen in 20-30% van de patiënten met MDS voor en zijn geassocieerd met de aanwezigheid van ringsideroblasten en met een gunstige prognose (WHO revised 4th edition; LYON 2017). Recent werd beschreven dat SF3B1 p.(Lys666Asn) geassocieerd is met hoog-risico MDS, transformatie naar AML, trombocytopenie en gedaalde overleving. Dit impliceert dat deze groep patiënten een agressievere behandeling nodig hebben, zeker bij een lage IPPS-R categorie (PMID 32211880).</p> <p>Verder werd een variant met onduidelijke klinische betekenis (VUS) in het DNMT3A gen gedetecteerd.</p>	8

<p>Klinische indicatie: MDS-EB2 NGS toont aanwezigheid aan van varianten in de genen SF3B1 en DNMT3A:</p> <p>1) Twee gekende, consensus pathogene varianten in het SF3B1 gen (Lys666Asn met VAF 23% en Lys700Glu met VAF 20%): SF3B1 varianten worden teruggevonden bij ongeveer 10% van de patiënten met MDS-EB (6% MDS-EB-1 en 4% MDS-EB-2). In tegenstelling tot de andere MDS sub-categorieën is er geen positief effect op de algemene overleving of het risico op ziekte progressie bij MDS-EB patiënten (Malcovati et al., Blood 2020).</p> <p>2) Een missens variant-met-onbekende-betekenis (VUS) in het DNMT3A gen (VAF 50%): het effect van de variant op de eiwitfunctie is niet duidelijk waardoor er ook geen evaluatie kan gemaakt worden i.v.m. de klinische impact van deze variant.</p> <p>Er konden geen varianten met een VAF >5% teruggevonden worden in de andere bij MDS belangrijke genen (ASXL1, EZH2, RUNX1, SRSF2, TET2, TP53 en U2AF1 (opmerking: wegens sub-optimale coverage van de gen regio overeenkomend met AZ Asp33 tot Gly50 in RUNX1 en AZ Met1 tot Glu82 in EZH2 kunnen varianten in dit gebied gemist worden)).</p> <p>Besluit: NGS profiel in overeenstemming met aanwezigheid van MDS-EB-2. Gezien ontbreken van karyotype en hematologische parameters is het niet mogelijk om de IPSS-R risico analyse en de mogelijke impact van varianten op deze klassificatie zoals beschreven door verschillende groepen te evalueren (Hou et al., Blood Cancer Journal 2018, Tefferi A. et al. Am J Hematol 2017, NCCN guideline v2.2020). Ook het geïntegreerd moleculair/klinisch prognostisch model 'Mayo Alliance Prognostic Model for MDS' kan hierdoor niet worden toegepast (Tefferi et al., 2018 Mayo Clin Proc.).</p>	9
<p>Er werden twee pathogene mutaties in het SF3B1 gen geïdentificeerd: SF3B1 c.1998G>T p.(Lys666Asn) en SF3B1 c.2098A>G p.(Lys700Glu). Deze mutaties hebben een significant klinisch belang (Tier I). Dit zijn recurrente mutaties in de context van myelodysplastisch syndroom (MDS). SF3B1 mutaties komen voor in 20-30 % van de gevallen van MDS, zijn vaak geassocieerd met de aanwezigheid van ringsideroblasten en zijn in de meeste studies geassocieerd met een betere prognose [1, 2]. Specifiek voor de SF3B1 p.(Lys666Asn) mutatie is er echter recente evidentie voor een associatie met verhoogde progressie van MDS en verminderde overleving, wat een argument zou kunnen vormen voor een meer intensieve behandeling dan bij MDS met andere SF3B1 mutaties [3]. Daarnaast werd een variant van onduidelijke betekenis (VUS) gedetecteerd: DNMT3A c.2732G>A p.(Cys911Tyr). Aan deze variant kunnen momenteel geen klinische implicaties gekoppeld worden (Tier III: ongekende klinische betekenis).</p> <p>Referenties: 1. Swerdlow SH et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (revised 4th edition). IARC: Lyon 2017. 2. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: myelodysplastic syndromes, version 1.2021. 3. PMID 32211880.</p>	10
<p>Les mutations des éléments du spliceosome ont été rapportées dans les MDS de type SMD-RS ainsi que dans les MDS/MPN de type SMD/NMP-RS-T. La prévalence est de 20-30% dans les SMD. La mise en évidence de mutation de SF3B1 est associée à une VPP d'un phénotype associé à la présence de sidéoblastes annulaires de 97.7%, l'inverse étant également vrai pour la VPN. Pour les cas sans mutation de SF3B1, un minimum de 15% de sidéoblastes médullaires est requis pour retenir le diagnostic. A contrario, le diagnostic de SMD-RS peut-être posé en cas d'identification d'une mutation de SF3B1 dès le seuil de 5% de sidéoblastes annulaires dépassés. Association classique avec un pronostic favorable. Toutefois, Tang et al. n'ont pu mettre en évidence d'impact sur l'OS (Tang et al., Crit Rev in Oncology / Hematology 133 (2019). Critical Reviews in Oncology/Hematology 133 · August 2018. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2018.07.013</p>	11
<p>- DNMT3A (NM_175629.2) : Variant probablement pathogène selon les bases de données pour ce gène repris dans la convention NGS. Mutation missense au niveau de l'exon 23 de ce gène suppresseur de tumeurs conférant un pronostic défavorable en cas de syndrome myélodysplasique. - SF3B1 (NM012433.3) : Variants pathogènes repris dans la convention NGS. Mutations missense au niveau de l'exon 14 et 15 respectivement, conférant un pronostic favorable en cas de syndrome myélodysplasique. Résultats compatibles avec un syndrome myélodysplasique avec excès de blastes 2 de pronostic défavorable.</p>	12
<p>SF3B1 mutaties komen frequent (20-30%) voor bij MDS, echter deze worden zelden waargenomen bij MDS met excess aan blasten (CAVE: deze worden ook waargenomen bij MDS/MPN en CLL). Met deze techniek is het niet mogelijk te bepalen of beide varianten zich op hetzelfde allel bevinden. Mutaties in SF3B1 zijn sterk (>80%) gelinkt aan de aanwezigheid van ringsideroblasten. Iet tot het gunstig prognostisch belang van deze mutatie bij MDS met <5% blasten onafhankelijk van de IPSS-R risico score, werd er geen duidelijk prognostisch belang van deze mutatie aangetoond bij MDS met excess blasten. (Nasda et al. 2017, WHO 2016)</p>	13

Er werden 2 varianten gevonden in SF3B1. Mutaties in SF3B1 in MDS zijn geassocieerd met de aanwezigheid van ring sideroblasten (MDS-RS) en zijn geassocieerd met een goede prognose (Arber Blood 2016).	14
Met NGS werden twee SF3B1 mutaties gedetecteerd die recurrent voorkomen in MDS en die dus de diagnose kunnen bevestigen. Meer bepaald zijn deze SF3B1 mutaties in MDS geassocieerd aan het voorkomen van ringsideroblasten (RS). Te correleren met de beenmergmorfologie (+ ijzerkleuring). Enkelvoudige SF3B1 mutaties zijn in MDS-RS zonder blastenexces prognostisch gunstig. De prognostische impact bij blastenexces en van het samen voorkomen van twee SF3B1 mutaties is niet gekend. Geen targets voor therapie gedetecteerd.	15
Sur les 39 gènes séquencés, seuls les 16 gènes cibles suivants ont été interprétés : ASXL1, CEBPA, DNMT3A, EZH2, FLT3, IDH1, IDH2, KIT, NPM1, RUNX1, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF1, WT1. Toutefois, les éventuels variants pathogènes (ou probablement pathogènes observés dans les 23 autres gènes seront rapportés ci-dessous dans le résumé du rapport s'ils ont un impact clinique avéré dans le cadre d'un SMD EB2. Pour la description de chaque mutation se référer au tableau des résultats ci-joint. -Présence dans l'oncogène SF3B1 des mutations pathogéniques p.(Lys666Asn) et p.(Lys700Glu) décrites dans la littérature dans le cadre des SMD et dont l'impact clinique est avéré. Les mutations dans SF3B1 sont observées très fréquemment dans les MDS-RS (incidence : 80%) et sont fortement associées aux "ring sideroblasts". Dans le cadre des SMD, les mutations dans SF3B1 seraient associées à un pronostic plutôt favorable (NCCN-v1.2020; WHO 2017)). -Présence dans le gène DNMT3A du variant p.(Cys911Tyr) de signification biologique et donc clinique indéterminé.	16
SF3B1 mutatie als evidentie voor MDS. SF3B1 mutaties geassocieerd met de aanwezigheid van ringsideroblasten en eerder gunstig klinisch verloop. Referenties: Malcovati L et al. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. Blood 2015 Malcovati L et al. SF3B1-mutant MDS as a distinct disease subtype: a proposal from the International Working Group for the Prognosis of MDS. Blood 2020	17

3.1.2. NGS-2020-5

Varianten in NPM1 en ASXL1 ondersteunen de diagnose van acute myeloïde leukemie (AML). Varianten in ASXL1 worden geassocieerd met een slechte prognose. (Pratcorona et al. 2012. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. Haematologica. 97(3): 388–392.) De aanwezigheid van de hotspotmutatie c.2503G>T (p.(Asp835Tyr)), slechts teruggevonden in 3.97% van de reads, (dus lager dan de detectielimiet van onze test, = 5.00%) moet bevestigd worden met een onafhankelijke techniek. De biologische en klinische betekenis van de variant c.2732G>A (p.(Cys911Tyr)) in DNMT3A is niet gekend (VUS, variant of unknown significance).	1
De gevonden varianten in de genen NPM1 (o.a. type A), FLT3 (puntmutatie, geen ITD) en ASXL1 zijn recurrent in de context van AML. De aanwezigheid van een variant in het NPM1 gen zonder bijkomende FLT3-ITD (high)-mutatie wordt beschouwd als prognostisch gunstig. De aanwezigheid van een variant in het ASXL1 gen wordt echter geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152). Door de aanwezigheid van een FLT3 puntmutatie variant kan een "doelgerichte" therapie gebruikt worden.	2

<p>Mutaties in ASXL1 komen frequent voor bij MDS en AML en zorgen voor een adverse risk volgens de ELN criteria (Döhner et al., Blood 2017).</p> <p>Volgens de ELN guidelines zijn NPM1 mutaties in de afwezigheid van FLT3-ITD gecorreleerd met een gunstige prognose (Döhner et al., Blood 2017). Een bijkomende DNMT3A mutatie bij NPM1-positieve patiënten wordt echter door Gale et al (JCO 2015) en Ley et al (NEJM 2010) als een ongunstige marker voor prognose gezien. In een recentere studie van Metzeler et al. Blood 2016 wordt deze negatieve impact van een additionele DNMT3A mutatie enkel bij jongere NPM1+ patiënten (< 60 jaar) bevestigd, ook in afwezigheid van een FLT3-ITD.</p> <p>De combinatie van een NPM1 mutatie en een FLT3-TKD mutatie is gecorreleerd met een betere prognose dan wanneer enkel de NPM1 mutatie aanwezig is (Boddu et al., Blood Adv 2017 / Papaemmanuil et al., NEJM 2016). De FLT3-TKD mutatie is een mogelijk target voor FLT3 inhibitoren.</p>	3
<p>Aanwezigheid van een pathogene NPM1 type A variant, geassocieerd met AML (22-29%). Prognostisch gunstig indien niet geassocieerd met FLT3 ITD variant, slechtere prognose dan niet-type A varianten (Alpermann T. et al., Hematologica, 2016, 101:e57)</p> <p>Aanwezigheid van een vermoedelijk pathogene ASXL1 variant, geassocieerd met MDS (11-15%), CMML (40%) en AML (5-10%) met slechtere prognose.</p> <p>Te bespreken op MOC: aanwezigheid van 2 pathogene varianten met VF <5% (w orden normaal niet gerapporteerd)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Aanwezigheid van pathogene FLT3 TKD variant met VF van slechts 2.9%, geassocieerd met AML en slechtere prognose (Staudt D; et al., Int. J. Mol. Sc., 2018) 2. Aanwezigheid van een pathogene NPM1 niet-type A variant met VF% van slechts 4.7% 	4
<p>Er werd een FLT3 (NM_004119.2(FLT3):c.2503G>T (p.(Asp835Tyr)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 20.</p> <p>De aanwezigheid van deze variant (FLT3-TKD) heeft significant klinisch belang (tier I) en is geassocieerd met AML met in het algemeen een goede respons op gilteritinib (FDA approved) (PMID: 31665578). In de aanwezigheid van de NPM1 out-of-frame insertie in exon 11 is de prognose gunstiger vergeleken met een geïsoleerde FLT3-TKD variant (PMID: 17965322) .</p> <p>Er werd een NPM1 (NM_002520.6(NPM1):c.860_863dup (p.(Trp288Cysfs*12)) pathogene frameshift variant geïdentificeerd in exon 11.</p> <p>Er werd een NPM1 (NM_002520.6(NPM1):c.859delinsGTCTG (p.(Leu287Valfs*14)) pathogene frameshift variant geïdentificeerd in exon 11.</p> <p>De aanwezigheid van deze variant heeft significant klinisch belang (tier I). De variant is geassocieerd met AML en heeft in het algemeen een goede prognose in de afwezigheid van FLT3-internal tandem duplicatie (NCCN guidelines AML v3 2020,ESMO guidelines en PMID: 27367478).</p> <p>Er werd een ASXL1 (NM_015338.5(ASXL1):c.1934dupG (p.(Gly646Trpfs*12)) vermoedelijk pathogene frameshift variant geïdentificeerd in exon 14.</p> <p>De aanwezigheid van een ASXL1 variant in AML heeft significant klinisch belang (tier I) en geeft in het algemeen een slechtere prognose (NCCN guidelines AML v3 2020,PMID: 27276561).</p> <p>Er werden geen andere (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in het SHT myeloïde subpaneel (inclusief CEBPA, IDH1, IDH2, KIT, RUNX1, TET2, TP53, WT1).</p> <p>Daarnaast werd ook 1 variant met ongekende biologische en klinische betekenis geïdentificeerd in DNMT3A, cfr tabel.</p>	5

<p>Les variants du gène NPM1 constituent les atteintes ponctuelles les plus fréquentes dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et en l'absence d'anomalie cytogénétique et de variants des gènes FLT3 et TP53, définissent une pathologie de risque moléculaire faible, de bon pronostic. 1,2,3</p> <p>Les variants du gène ASXL1 sont retrouvés dans une proportion variable des LAM (5-35%) et dans moins de 15% des LAM NPM1 mutées. Ces anomalies sont généralement associées à une péjoration du pronostic dans les LAM mais leur impact n'est pas clairement défini dans le cadre des pathologies NPM1 mutées. 1,2</p> <p>EN CONCLUSION ce patient présente une pathologie de profil mutationnel associé à un pronostic favorable en raison de la présence d'un variant NPM1. Néanmoins la présence additionnelle d'un variant ASXL1 pourrait avoir un effet péjoratif sur le pronostic.</p> <p>1. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia, Eli Papaemmanui & al. NEJM 2016</p> <p>2. NCCN Guidelines Version 1.2021 Acute Myeloid Leukemia (Age >18 years)</p> <p>3.. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. D. Arber et al. Blood. 2016</p>	6
<p>In deze casus wordt een variant in het NPM1 gen aangetroffen, Tier klasse I, significant klinisch belang. Varianten in NPM1 zijn een van de meest voorkomende genetische afwijkingen in AML (45-64% van de gevallen met normaal karyotype) en zijn relatief specifiek voor AML. De aanwezigheid van een NPM1 variant resulteert in de classificatie AML met gemuteerd NPM1 volgens WHO 2016 en is vaak geassocieerd met myelomonocytair of monocytair kenmerken.</p> <p>In deze entiteit wordt over het algemeen een goede respons op inductie chemotherapie gezien.</p> <p>Daarnaast wordt een variant in het DNMT3A gen teruggevonden, Tier klasse I, significant klinisch belang. Varianten in DNMT3A komen bij AML vaak voor tesamen met varianten in NPM1. Ze hebben een eerder negatieve impact op prognose.</p> <p>Daarnaast wordt een variant in het ASXL1 gen aangetroffen, Tier klasse I, significant klinisch belang. Varianten in ASXL1 zijn frequent voorkomend bij AML. Hun impact op prognose en outcome is negatief. Voorzichtigheid is evenwel geboden, aangezien varianten in ASXL1 eveneens worden aangetroffen in een normale oudere populatie.</p> <p>Referenties</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Arber et al. Blood 2016;127:2391-4052 2. Döhner et al. Blood 2005;106:3740-6 3. Falini et al. N Engl J Med 2005;352:254-66 4. Thiede et al. Blood 2006;107:4011-20 5. Ohgami et al. Mod Pathol 2015;28:706-14 6. The Cancer Genome Atlas Research Network. N Engl J Med 2013;368:2059-74 7. Ley et al. N Engl J Med 2010;363:2424-33 	7

<p>NGS analyse toont de aanwezigheid van 3 varianten met significant klinisch belang (TIER I):</p> <ul style="list-style-type: none"> - NPM1 c.859delinsGTCTG p.(Leu287Valfs*13) (allel frequency 7%) - NPM1 c.860_863dupTCTG p.(Trp288Cysfs*12) (allel frequency 34%) - FLT3 c.2503G>T p.(Asp835Tyr) (allel frequency 7%) <p>Er is 1 variant aangetoond met mogelijk klinisch belang (TIER II):</p> <ul style="list-style-type: none"> - ASXL1 c.1934dupG p.(Gly646Trpfs*12) (allel frequency 41%) <p>NPM1 gemuteerde AML is een AML met recurrenente mutatie volgens WHO en klinisch geassocieerd met een gunstige prognose (WHO revised 4th edition; LYON 2017). De co-aanwzigheid van een mutatie in het tyrosine kinase domein (TKD) van FLT3 (FLT3 c.2503G>T p.(Asp835Tyr)) heeft een extra gunstig effect op de ziektevrije overleving (National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: acute myeloid leukemia, version 4.2020; PMID 29296796).</p> <p>FLT3-TKD mutaties komen voor in ongeveer 7% van de patiënten met AML en hebben een therapeutisch belang (FLT3 inhibitoren, vb. midostaurine) (National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: acute myeloid leukemia, version 4.2020; PMID 28644114). Resistentiemechanismen tegen bepaalde FLT3 inhibitoren werden beschreven (PMID 28576946).</p> <p>ASXL1 mutaties komen voor in 5-11% van de patiënten met AML en is een onafhankelijk ongunstige prognostische merker (PMID 30927018).</p> <p>Verder werd er een variant gevonden met onduidelijke klinische betekenis (VUS) in het DNMT3A gen gedetecteerd.</p>	8
<p>Klinische indicatie: AML</p> <p>NGS toont aanwezigheid aan van varianten in de genen ASXL1, DNMT3A, FLT3 en NPM1:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Een vermoedelijk pathogene frameshift variant in het ASXL1 gen (VAF 20%): ASXL1 varianten worden teruggevonden bij 5-17% van de AML patiënten. Bij AML is de aanwezigheid van ASXL1 varianten indicatief voor sAML of de novo 'elderly' AML/tAML met clinicopathologische eigenschappen van sAML (Lindsley et al., Blood 2015). ASXL1 varianten zijn geassocieerd met een ongunstige prognose en verminderde overleving in AML (Chou et al. Blood, 2010 en Patel et al. NEJM, 2012). 2) De gekende consensus pathogene missense variant Asp835Tyr (VAF 2%) in het tyrosine kinase domein (TKD) van het FLT3 gen. Gezien de lage VAF betreft het hier een sub-kloon. FLT3-TKD varianten worden teruggevonden in 5-10% van de AML patiënten. Door deze FLT3-TKD mutatie komt de patiënt in aanmerking voor behandeling met de Type I kinase inhibitor midostaurin, in combinatie met chemotherapy (FAGG, compassionate use programma Novartis) waarbij een betere algemene overleving wordt verwacht (Stone et al., NEJM, 2017). Echter gezien de lage VAF is het effect van de TKI behandeling mogelijk minder effectief. Belangrijk, type II kinase inhibitoren (e.g. quizartinib) hebben geen effect op deze FLT3-TKD varianten (zie review Antar et al., Leukemia 2020). Het effect van deze variant op prognose is niet duidelijk (Martelli et al., Blood Rev 2013; Mead et al, Blood 2007; Whitman et al., Blood 2008). 3) De gekende consensus pathogene variant p.(Trp288Cysfs*12) in het NPM1 gen (VAF 12%): de variant is een subtype A 4bp insertie variant. AML met gemuteerde NPM1 is een afzonderlijke WHO entiteit. 27% tot 35% van de AML patiënten zijn NPM1 positief en meer dan 70% van deze patiënten bevatten ook varianten in DNA methylatie of hydroxymethylatie genen (DNMT3A, IDH1, IDH2-R140 en TET2). 4) Een tweede consensus pathogene variant p.(Leu287Valfs*13) in het NPM1 gen (VAF 4%): de variant is een complexe deletie-insertie variant die verschillend is van de 3 meest voorkomende NPM1 subtypes (Type A, B en D). Deze variant werd nog niet beschreven in de COSMIC databank maar geeft eveneens aanleiding tot eenzelfde wijziging in de laatste aminozuren als bv. de Type A variant. 5) Een missens variant-met-onbekende-betekenis (VUS) in het DNMT3A gen (VAF 50%): het effect van de variant op de eiwitfunctie is niet duidelijk waardoor er ook geen evaluatie kan gemaakt worden i.v.m. de klinische impact van deze variant. <p>Er konden geen varianten met een VAF >5% teruggevonden worden in de andere bij AML klinisch belangrijke genen (CEBPA, IDH1/2, KIT, RUNX1, TET2, TP53 en WT1 (opmerking: wegens sub-optimale coverage bij het CEBPA gen en van de gen regio overeenkomend met AZ Asp33 tot Gly50 in RUNX1 kunnen varianten in dit gebied gemist worden. Ook grote ITD varianten bij FLT3 worden gemist, voor FLT3 en CEBPA zie daarom ook resultaten fragment analyse).</p> <p>Besluit:</p> <p>NGS profiel in overeenstemming met aanwezigheid van AML.</p> <p>Gezien aanwezigheid van de NPM1 varianten behoort deze patiënt tot de WHO groep 'AML with NPM1' en, onder voorbehoud van afwezigheid van een FLT3-ITD met hoge allelische ratio, tot de gunstige risico groep zoals beschreven in de ELN en NCCN guidelines (Döhner et al., Leukemia 2017, NCCN guideline version 3.2020, AML).</p> <p>De aanwezigheid van de FLT3-TKD variant is een therapeutische target (zie hierboven).</p>	9

<p>Er werden twee pathogene mutaties in het NPM1 gen, een pathogene mutatie in het FLT3 gen en een vermoedelijk pathogene mutatie in het ASXL1 gen geïdentificeerd. De NPM1 c.859delinsGTCTG p.(Leu287Valfs*13), NPM1 c.860_863dup p.(Trp288Cysfs*12) en FLT3 c.2503G>T p.(Asp835Tyr) mutaties hebben een significant klinisch belang (Tier I). De ASXL1 c.1934dup p.(Gly646Trpfs*12) mutatie heeft een mogelijk klinisch belang (Tier II).</p> <p>Mutaties in NPM1, FLT3 en ASXL1 worden in acute myeloïde leukemie (AML) recurrent aangetroffen. De aanwezigheid van een NPM1 mutatie definieert een aparte diagnostische entiteit in de WHO-classificatie van AML en is geassocieerd met een betere prognose [1, 2].</p> <p>In tegenstelling tot bij het gelijktijdig voorkomen van een interne tandem duplicatie (ITD) in FLT3 wordt de gunstige prognostische betekenis van een NPM1 mutatie niet ongedaan gemaakt door de simultane aanwezigheid van een mutatie in het tyrosine kinase domein (TKD) van FLT3, zoals FLT3 c.2503G>T p.(Asp835Tyr). Mogelijk hebben patiënten met zowel een NPM1 mutatie als een FLT3-TKD mutatie zelfs een betere ziektevrije overleving dan patiënten met enkel een NPM1 mutatie [1, 3]. Om een correcte prognostische inschatting te maken, is het aanbevolen om bij deze patiënt nog aanvullend de aanwezigheid van een lange FLT3-ITD mutatie uit te sluiten via een bijkomende techniek.</p> <p>Ook klinisch belangrijk is dat de aanwezigheid van een FLT3-TKD mutatie resulteert in gevoeligheid voor behandeling met bepaalde FLT3 inhibitoren, zoals midostaurine, dat daardoor een plaats heeft bij inductie- en consolidatietherapie (in combinatie met chemotherapie) en bij onderhoudsbehandeling (als monotherapie) [1, 4]. Sommige andere FLT3 inhibitoren zijn daarentegen niet effectief bij een FLT3-TKD mutatie [5].</p> <p>De aanwezigheid van een ASXL1 mutatie mag niet als een ongunstige prognostische merker gebruikt worden, aangezien de overige, hierboven geschetste, bevindingen wijzen op een AML met een gunstig risicoprofiel en binnen dit risicoprofiel de simultane aanwezigheid van een ASXL1 mutatie geen prognostisch ongunstige impact heeft [1]. In het geval dat de resultaten van de andere onderzoeken (bv. cytogenetica) het risicoprofiel alsnog veranderen naar een intermediair of ongunstig risico, dan is de aanwezigheid van een ASXL1 mutatie wel geassocieerd met een slechtere overleving en vloeit hieruit een bijkomend ongunstig prognostisch effect voort (met finale classificatie van het risicoprofiel als ongunstig tot gevolg) [1].</p> <p>Daarnaast werd een variant van onduidelijke betekenis (VUS) gedetecteerd: DNMT3A c.2732G>A p.(Cys911Tyr). Aan deze variant kunnen momenteel geen klinische implicaties gekoppeld worden (Tier III: ongekende klinische betekenis).</p> <p>Referenties:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: acute myeloid leukemia, version 4.2020. 2. Swerdlow SH et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (revised 4th edition). IARC: Lyon 2017. 3. PMID 17965322. 4. PMID 28644114. 5. PMID 28576946. 	10
--	----

<p>1) FLT3 c.2503G>T: Impact prédictif: les patients porteurs de mutations somatiques du gène FLT3 sont susceptibles de répondre à un traitement ciblé par Midostaurine ou gilteritinib ou une molécule équivalente. L'EMA et la FDA ont reconnu l'indication de ces traitements chez les patients porteurs de mutations du gène FLT3.</p> <p>https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/midostaurin https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rydapt https://www.fda.gov/drugs/fda-approves-gilteritinib-relapsed-or-refractory-acute-myeloid-leukemia-aml-flt3-mutation https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/summaries-opinion/xospata</p> <p>- Prédictif: Plusieurs études cliniques ont montré la sensibilité des patients porteurs de mutations du gène FLT3 aux inhibiteurs de tyrosine kinase de type : Midostaurine/Sorafenib/Quizartinib. L'indication de la Midostaurin chez les patients porteurs de mutation.</p> <p>2) NPM1 c860_863dup: - Diagnostic OMS 2016: LAM avec mutation de NPM1c+ (ICDO: 9877/3). - Pronostic: ELN 2017: Favorable (?) (NPM1c+/FLT3-ITD--neg)</p> <p>3) ASXL1 c.1934dupG: La prévalence des mutations d'ASXL1 est de 5-17%, dans les AML (Patel et al, 2017). Ces mutations sont mutuellement exclusive avec les mutations de NPM1 mais on note une co-occurrence fréquente avec les mutations de FLT3-ITD, CEBPA, RUNX1, SRSF2 et IDH2. La survie globale est généralement réduite chez les porteurs. Pour une évaluation détaillée de l'impact selon le caryotype, voir Arber et al., Blood 2016, supplementary data). Une association avec un pronostic péjoratif est également mentionnée dans les guidelines NCCN (NCCN guidelines AML v 3.2020 MS-8). La fréquence des mutations d'ASXL1 est corrélée de façon directe à l'accroissement d'âge. EFS et OS réduite semblent être retrouvées dans toutes les classes d'âges caractérisées par cette mutation.</p>	11
<p>- DNMT3A (NM_175629.2) : Variant probablement pathogène selon les bases de données pour ce gène repris dans la convention NGS. Mutation missense au niveau de l'exon 23 de ce gène suppresseur de tumeurs conférant un pronostic controversé en cas de leucémie myéloïde aigue.</p> <p>- NPM1 (NM_002520.6) : Variant pathogène repris dans la convention NGS. Mutation frameshift au niveau de l'exon 11 de ce gène suppresseur de tumeurs. La présence de cette mutation doit faire revoir le diagnostic en « AML with NPM1 mutated » de pronostic favorable, en l'absence d'autres mutations.</p> <p>- FLT3 (NM_004119.2) : Variant pathogène repris dans la convention NGS. Mutation missense au niveau de l'exon 20 de cet oncogène conférant un pronostic défavorable mais pouvant être ciblée par une thérapeutique.</p> <p>Résultats compatibles avec une leucémie myéloïde aigue de pronostic défavorab</p>	12
<p>Volgens de WHO 2016 classificatie behoort deze AML tot de klasse 'AML met gemuteerd NPM1'. In afwezigheid van een FLT3-ITD mutatie, behoort dit type leukemie tot een vorm met gunstige prognostisch profiel. Bijkomend wordt een FLT3-TKD mutatie waargenomen, wat behandeling met FLT3 inhibitoren mogelijk maakt. Echter betreft het een kleine subgroep van ruim 5% VAF. Ondanks het ongunstig prognostisch profiel van FLT3-TKD mutaties in andere gevallen, zorgt de aanwezigheid van een FLT3-TKD bij AML met NPM1 mutatie (<5% van de AMLs) voor een nog gunstiger effect op de PFS dan AML NPM1 mut/FLT3wt. ASXL1 mutaties komen vnl voor bij MDS en MDS/MPN en zeldzaam bij de novo AML. Aanwezigheid van ASXL1 mutatie bij AML met NPM1 mutatie is eerder zeldzaam en is suggestief voor een secundaire AML. ASXL1 mutaties op zich hebben een onafhankelijke slechte prognose en een negatief effect op de overleving, echter ASXL1 mutaties zouden het gunstige prognostische profiel van AML-NPM1 niet negatief beïnvloeden. (Papaemmanuil et al N Engl J Med 2016, Boddu et al Blood Adv 2017, Bacher et al. Blood 2008, Dohner et al. Blood 2016, Patel et al. N Engl J Med 2012).</p>	13
<p>Er werden drie varianten gevonden in NPM1, FLT3 (FLT3-TKD mutatie) en ASXL1. Volgens de WHO 2017 kan deze AML geklasseerd worden als AML met gemuteerd NPM1. Deze klasse heeft een gunstige prognose (risk stratification "favorable" volgens Döhner et al., Blood 2017).</p> <p>Mutaties in ASXL1 zijn in AML meestal geassocieerd met een lagere overleving maar door de aanwezigheid van de NPM1 mutatie, blijft deze AML in de "Favorable" risico group (Dohner et al, Blood 2017; WHO 2017).</p> <p>De aanwezigheid van FLT3-TKD in AML is geassocieerd met een sensitiviteit voor de FLT3 tyrosine kinase inhibitors midostaurine en gilteritinib (Stone et al., NEJM 2017; Perl et al., NEJM 2019).</p>	14

<p>Met NGS werd een NPM1 mutatie gedetecteerd, passend bij de diagnose van een AML met gemuteerde NPM1 (WHO 2016). Bijkomend werden ook (vermoedelijk) pathogene mutaties gedetecteerd in FLT3 en ASXL1: beide prognostisch ongunstig in AML. Het voorkomen van een FLT3 mutatie in AML is predictief voor een goede respons op FLT3-inhibitie therapie (midostaurin).</p>	15
<p>Sur les 39 gènes séquencés, seuls les 12 gènes cibles suivants ont été interprétés: ASXL1, CEBPa, DNMT3A, FLT3, IDH1, IDH2, KIT, NPM1, RUNX1, TET2, TP53, WT1. Toutefois, les éventuels variants pathogènes (ou probablement pathogènes) observés dans les 27 autres gènes seront rapportés ci-dessous dans le résumé du rapport s'ils ont un impact clinique avéré dans le cadre d'une LMA. Pour la description de chaque mutation se référer au tableau des résultats ci-joint.</p> <p>- Présence dans le gène suppresseur de tumeur ASXL1 du variant pathogénique p.(Gly646Trpfs*12) "frameshift" de type "perte de fonction" décrit dans la littérature dans le cadre des LMA. L'impact clinique des mutations "frameshift" du gène ASXL1 est avéré dans les LMA. Les mutations dans ASXL1 confèrent un pronostic défavorable (Döhner 2017, PMID 27895058).</p> <p>-Présence dans le gène NPM1 du variant pathogénique p.(Trp288Cysfs*12), mutation de type A (la plus fréquente ~72%), dont l'impact clinique est avéré et compatible avec le diagnostic de LMA.</p> <p>-Présence également dans le gène NPM1 du variant pathogénique p.(Leu287Valfs*13) "frameshift" dont l'impact clinique est avéré et compatible avec le diagnostic de LMA.</p> <p>Les variants dans le gène NPM1 confèrent :</p> <ul style="list-style-type: none"> - un pronostic favorable pour les LMA à caryotype normal si FLT3- ITD low (FA <50%) ou absent (Falini - Blood 2011 PMID 21030560 ; Döhner-Blood 2017 PMID 27895058)). - un pronostic intermédiaire pour les LMA à caryotype normal si FLT3- ITD high (FA < 50%) (Falini - Blood 2011 PMID 21030560 ; Döhner-Blood 2017 PMID 27895058)). <p>La recherche des mutations FLT3 -ITD doit être réalisée par une autre analyse (PCR) car notre NGS ne permet pas de détecter des duplications supérieures à 30 pb. Il convient également de se référer au protocole de cytogénétique pour le caryotype.</p> <p>-Présence dans l'oncogène FLT3 du variant pathogénique p.(Asp835Tyr) au niveau du domaine tyrosine kinase (FLT3-TKD), décrit dans la littérature dans le cadre des LMA et compatible avec le diagnostic de LMA. La présence de ce variant ouvre la voie à des thérapies ciblées (ex : Gilteritinib), (NCCN v3 2020AML).</p> <p>-Présence dans le gène DNMT3A du variant p.(Cys911Tyr) de signification biologique et donc clinique indéterminé.</p>	16
<p>NPM1 mutatie als de novo AML merker in tegenstelling tot ASXL1 mutatie als gekende secundaire (post-MDS) AML merker. Geen eenduidige AML ontogenese mogelijk op basis van dit moleculair profiel. FLT3 mutatie indicatief voor gebruik van multikinase inhibitoren (e.g. midostaurin, gilteritinib) in AML.</p> <p>Referenties: Lindsley RC et al. AML ontogeny is defined by distinct somatic mutations. Blood 2015. Perl AE et al. Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML. NEJM 2019. Stone RM et al. Midostaurin plus Chemotherapy for AML with a FLT3 Mutation. NEJM 2017.</p>	17

3.1.3. NGS-2020-6

<p>De aanwezigheid van een CALR mutatie past bij de diagnose van Primaire myelofibrose (PMF). De gevonden variant c.1099_1150del (p.(Leu367Thrfs*46)) is de CALR type 1 hotspotmutatie, dewelke prognostisch gunstig is in vergelijking met JAK2 of MPL gemuteerde PMF en JAK2/MPL/CALR wild-type (triple negative) PMF (Passamonti & Maffioli. Update from the latest WHO classification of MPNs: a user's manual. 2016 Hematology Am Soc Hematol Educ Program; Tefferi et al., Driver mutations and prognosis in primary myelofibrosis: Mayo-Careggi MPN alliance study of 1,095 patients. 2018 Am J Hematol).</p>	1
---	---

<p>De gevonden variant in het gen CALR (type 1) is recurrent in de context van MPN, type primaire myelofibrose (PMF). In PMF wordt een "driver" mutatie in CALR geassocieerd met een gunstigere prognose dan JAK2/MPL. Geen bijkomende varianten.</p> <p>Er zijn dus geen ongunstige factoren in de MIPSS70, MIPSS70-plus en GIPSS scores. (Ref: Guglielmelli et al, J Clin Oncol. 2018 36(4):310-318, Tefferi et al, Leukemia, 2018. 2(7):1631-1642)</p>	2
<p>Er wordt een Type I mutatie in CALR gedetecteerd. PMF patiënten met een CALR mutatie hebben een meer indolent klinisch verloop en een betere overleving in vergelijking met PMF patiënten met een JAK2 of MPL mutatie (Rumi et al, Blood 2014 - Rotunno et al, Blood 2014 - Tefferi et al, Leukemia 2014).</p>	3
<p>Aanwezigheid van CALR variant type 1: geassocieerd met primaire myelofibrose (met betere prognose dan met JAK2 of MPL mutatie) of ET (70-84%). Geeft hoger risico op transformatie naar myelofibrose.</p>	4
<p>Er werd een CALR (NM_004343.3):c.1092_1143del (p.(Leu367Thrfs*46)) pathogene frameshift variant geïdentificeerd in exon 9. De aanwezigheid van deze variant in PMF heeft significant klinisch belang (tier I) vermits CALR mutaties voorkomen bij 15-25% van de ET, 20-25% van de PMF en 70% van de ET of PMF patiënten die geen mutatie vertonen in JAK2 of MPL (PMID: 25301336)). CALR-gemuteerde PMF vertonen een betere overleving dan JAK2 of MPL gemuteerde PMF of triple negatieve PMF en hebben een lager risico op thrombosis dan JAK2 gemuteerde PMF (PMID: 31630335). Bovendien vertoont dit type variant CALR mutaties (type 1, deletie) bij PMF een betere overleving dan PMF met CALR mutaties type 2 (insertie) (PMID: 25301336).</p> <p>Er werden geen andere (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in het STHT myeloïde subpaneel (inclusief JAK2, MPL, ASXL1, EZH2, TET2, IDH1, IDH2, SRSF2, SF3B1).</p>	5
<p>Les mutations du gène CALR sont présentes dans +/- 25% des myélobroses primaires (PMF). Les mutations de type 1 (déletion de 52pb) représentent +/- 75% des mutations du gène CALR dans les PMF. Dans les PMF, la survie globale (OS) est supérieure chez les patients présentant une mutation du gène CALR de type 1 par rapport à ceux porteurs d'une mutation des gènes JAK2 ou MPL ou ceux ne présentant pas de mutation des gènes JAK2, CALR ou MPL (PMF « triple négatives »).</p> <p>Le bilan des PMF fait désormais l'objet de scores intégrant les données cliniques, moléculaire et cytogénétiques pour évaluer le pronostic. (cf. MIPSS70* et GIPSS**)</p> <p>EN CONCLUSION ce patient présente une pathologie de profil mutationnel compatible avec une myélobrose de pronostic favorable. Ce résultat est à compléter du celui de la clinique et du caryotype pour évaluer le pronostic de manière complète (score MIPSS70 et GIPSS).</p> <p>* Tefferi A et al: MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. JCO 36, no. 17 :1769-1770, 2018 ** Tefferi A et al : GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. Leukemia volume 32, pages1631–1642(2018)</p>	6
<p>In deze casus wordt een variant in het CALR gen teruggevonden, Tier klasse I, significant klinisch belang. Een CALR variant komt voor in ongeveer 30% van de patiënten met PMF. De aanwezigheid ervan vormt een majeur diagnostisch criterium voor PMF (WHO2016). De prognose van patiënten met PMF wordt gunstig beïnvloed door de aanwezigheid van een CALR variant.</p> <p>Referenties</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Arber et al. Blood 2016;127:2391-405 2. Tefferi et al. Leukemia 2010;24:1128-38 3. Tefferi et al. Blood 2014;124:2507-13 4. Tefferi et al. Leukemia 2014;28:1472-7 	7

<p>NGS analyse toont de aanwezigheid van één variant met significant klinisch belang (TIER I): - CALR c.1099_1150del p.(Leu367Thrfs*46) (allel frequency 22%) Een CALR mutatie komt bij ongeveer 30% van de patiënten met primaire myelofibrose voor en bevestigt hierbij de diagnose (WHO revised 4th edition; LYON 2017). CALR c.1099_1150del is één van de meest voorkomende mutaties en betreft een type 1 CALR mutatie (Cancergenome). Type 1 CALR mutaties zijn geassocieerd met een betere overleving in vergelijking met patiënten met een JAK2 mutatie, type 2 CALR mutatie en JAK2/CALR/MPL triple negatieve status (PMID 29164670; PMID 24569778; PMID 24997152).</p>	8
<p>Klinische indicatie: PMF</p> <p>NGS toont aanwezigheid aan van een variant in het CALR gen:</p> <p>De gekende, consensus pathogene 52bp deletie variant (type 1) in het CALR gen (VAF 22%): aanwezigheid van deze variant is compatibel met aanwezigheid van een myeloproliferatieve neoplasie (ET of PMF). Type 1 CALR varianten zijn preferentieel geassocieerd met een myelofibrose fenotype en een significant hoger risico op myelofibrotische transformatie bij een essentiële trombocytose (Pietra et al., Leukemia, 2016). Ongeveer 25% PMF patiënten zijn positief voor CALR (zie review Palandri et al. Annals of Hematol 2019). Aanw ezigheid van CALR type 1 varianten heeft bij PMF geen negatief effect op algemene overleving, in tegenstelling, de afw ezigheid van deze varianten is een DIPPS plus-onafhankelijke risicofactor voor lagere overall survival in PMF (Tefferi et al., Am J Hematol 2017, Mayo-Careggi MPN Alliance study; Tefferi, Am J Hematol 2016).</p> <p>Er konden geen varianten met >5% VAF teruggevonden worden in de andere bij MPN klinisch belangrijke genen (ASXL1, EZH2, IDH1/2, JAK2, MPL, SF3B1, SRSF2, TET2 en TP53 (opmerking: wegens sub-optimale coverage van de gen regio overeenkomend met AZ Met1 tot Glu82 in EZH2 kunnen varianten in dit gebied gemist worden)).</p> <p>Besluit: NGS profiel in overeenstemming met aanwezigheid van een PMF. Gezien ontbreken van karyotype en hematologische parameters is het niet mogelijk om de moleculair geïntegreerde prognostische modellen MIPSS70, MIPSS70-plus v2.0 of GIPSS toe te passen (Guglielmelli et al., JCO 2018; Tefferi et al., JCO 2018 en Tefferi et al., Leukemia 2018). Ook de indeling van patiënten met MPN zoals beschreven door Grinfeld et al. (NEJM 2018) en mogelijke evaluatie van prognose en risico op transformatie kan hierdoor niet toegepast worden.</p>	9
<p>Er werd een pathogene mutatie in het CALR gen geïdentificeerd: CALR c.1099_1150del p.(Leu367Thrfs*46). Deze mutatie heeft een significant klinisch belang (Tier I). CALR mutaties komen voor in 20-35 % van de gevallen van primaire myelofibrose (PMF) [1, 2]. De aanwezigheid van een CALR mutatie vormt een majeur WHO-criterium voor diagnose van PMF [1]. De aangetroffen deletie van 52 basenparen wordt ook omschreven als een type 1 CALR mutatie, die bij PMF geassocieerd is met een betere overleving in vergelijking met een type 2 CALR mutatie, een JAK2 p.(Val617Phe) mutatie of een JAK2/CALR/MPL triple negatieve mutatiestatus [1, 2]. Referenties: 1. Sw erdlow SH et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (revised 4th edition). IARC: Lyon 2017. 2. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: myeloproliferative neoplasms, version 1.2020.</p>	10
<p>La présence d'une mutation frameshift de CALR est pathognomonique du diagnostic de néoplasie myéloproliférative (MPN). On retrouve généralement ces mutations chez les patients répondants aux critères diagnostiques de TE ou PMF selon l'OMS.</p> <p>La présence d'une mutation de CALR de type 1-Type 1-like (del 52 pb) est considérée de "bon pronostic" étant associée avec une OS prolongée et un risque diminué d'acutisation (PMF) en comparaison avec des patients porteurs de mutation V617F de JAK2 ou CALR de type-2 (PMF) (Tefferi et al., 2017).</p> <p>Par rapport aux patients V617F+, le risque de thrombose est réduit pour les TE avec mutation de CALR.</p>	11
<p>- CALR (NM_004343.3) : Variant pathogène repris dans la convention NGS. Mutation frameshift au niveau de l'exon 9, soutenant le diagnostic de myélofibrose primitive de pronostic favorable. Résultat compatible avec une myélofibrose primitive de pronostic favorable.</p>	12

<p>CALR mutaties komen voor bij ET (15-24%) en IMF (25-35%). Voor IMF is de aanwezigheid van een CALR mutatie één van de diagnostische criteria. In vergelijking met JAK2 en MPL gemuteerde myeloproliferatieve aandoeningen kennen patiënten met een CALR mutatie, en met name de type 1 variant, een milder klinisch verloop en een langere overleving. Tevens is de CALR type 1 mutatie opgenomen in de MIPPS70+ risico score als gunstige prognostische merker. (WHO 2016, Rumi et al. Blood 2017, Tefferi et al. AJH 2018)</p>	13
<p>Er werd een variant gevonden in CALR (52bp deletie: Type I variant). CALR is een majeur criterium in de diagnose van MPN. In PMF, CALR type I mutaties zijn geassocieerd met een gunstigere prognose (Tefferi et al., Blood 2014; Tefferi et al., Am J Hematol 2018).</p>	14
<p>Met NGS werd een CALR type 1 mutatie gedetecteerd passend bij de diagnose van een MPN type PMF. CALR type 1 mutaties zijn prognostisch gunstig in PMF. Er werden geen bijkomende mutaties gedetecteerd met negatieve impact op de prognose, noch die kunnen dienen als therapie target.</p>	15
<p>Sur les 39 gènes séquencés, seuls les 11 gènes cibles suivants ont été interprétés: ASXL1, CALR, EZH2, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, SRSF2, SF3B1, TET2, TP53. Toutefois, les éventuels variants pathogènes (ou probablement pathogènes) observés dans les 28 autres gènes seront rapportés ci-dessous dans le résumé du rapport s'ils ont un impact clinique avéré dans le cadre d'une NMP. Pour la description de chaque mutation se référer au tableau des résultats ci-joint.</p> <p>-Présence dans l'oncogène CALR d'un variant pathogénique type 1 like (deletion de 52bp) p.(Leu367Thrfs*46) "gain de fonction" situé dans l'exon 9 d'intérêt. Ce variant est décrit dans la littérature dans le cadre des NMP et son impact clinique est avéré. En cas de myélobrose, la présence de CALR est associée à un pronostic plus favorable que les patients triple négatifs ou JAK2 muté ou MPL muté (Tefferi et al., BLOOD 2015, PMID 25037629).</p>	16
<p>CALR mutatie als merker voor MPN. CALR mutaties zijn mutueel exclusief met JAK2 en MPL mutaties en zijn geassocieerd met eerder gunstig klinisch verloop. Referenties: Tefferi A et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. Leukemia 2014.</p>	17

3.2. Interprétation du rapport individuel

En plus de ce rapport global, vous avez également reçu un rapport individuel. Ci-dessous vous trouverez des informations qui peuvent aider à interpréter ce rapport. La position de vos résultats quantitatifs est donnée en comparaison avec tous les résultats de tous les participants et toutes méthodes confondues.

Les informations suivantes sont reprises:

- Votre résultat (R)
- La médiane (MAF):
la valeur centrale des résultats fournis par tous les laboratoires, toutes méthodes confondues.
- L'écart-type global (SD):
mesure de la dispersion des résultats fournis par tous les laboratoires et toutes méthodes confondues.
- Le score Z:
la différence entre votre résultat et la médiane (exprimée en unités d'écart type):
 $Z = (R - MAF) / SD$.
Votre résultat est cité si $|Z| > 3$.
- L'interprétation graphique de la position de votre résultat (R) en comparaison avec tous les résultats de tous les participants, basée sur la méthode de Tukey, pour chaque paramètre et pour chaque échantillon analysé.

Ces paramètres vous donnent une indication approximative de la position de votre résultat (R) par rapport aux médianes (MAF).

Vous pouvez trouver plus de détails dans les 3 brochures qui sont disponibles sur notre site web à l'adresse suivante:

https://www.wiv-isp.be/QML/index_fr.htm

(Choisir « brochures » dans le menu proposé)

ou directement à l'adresse suivante:

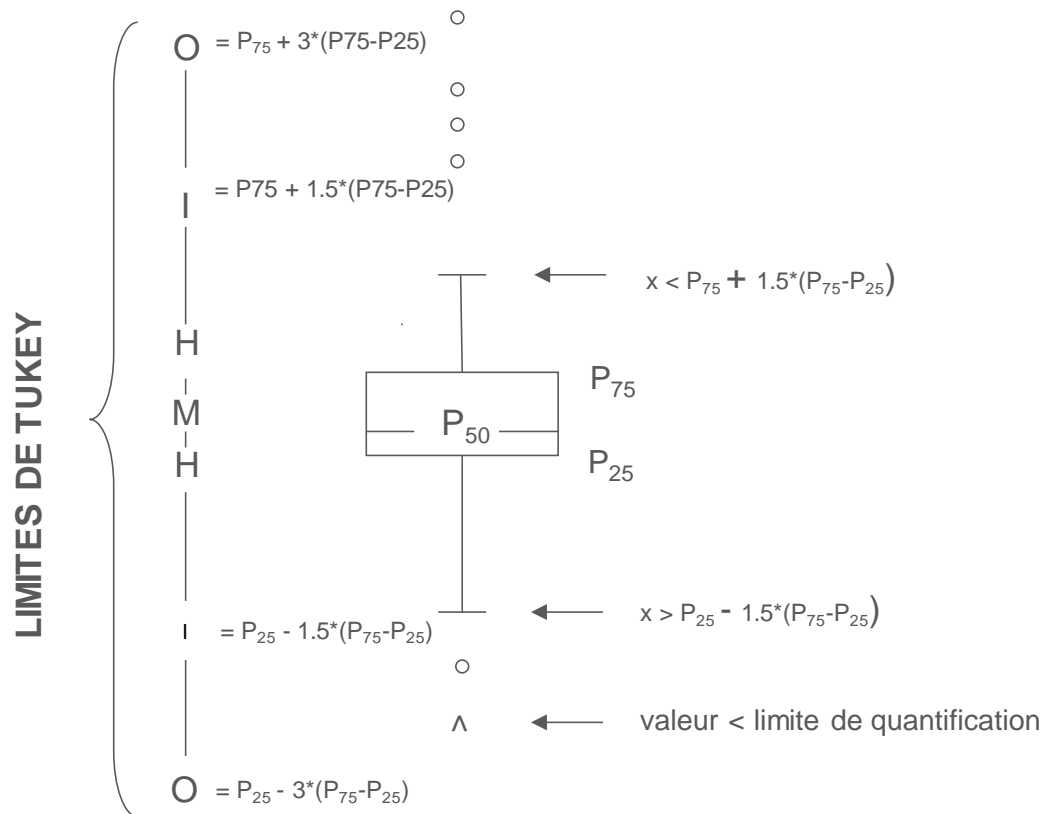
https://www.wiv-isp.be/QML/activities/external_quality/brochures/fr/brochures.htm

- 1) Brochure d'information sur les programmes d'évaluation externe de la qualité pour les laboratoires cliniques (Brochure d'information générale sur l'évaluation externe).
- 2) Brochure statistique (Procédure générale de calcul statistique mis au point par le professeur Albert).
- 3) Traitement des valeurs censurées (Procédure de calcul statistique appliquée aux valeurs censurées rédigée par le Professeur Albert).

Représentation graphique

A côté des tableaux de résultats, une représentation graphique en "boîte à moustaches" est parfois ajoutée. Elle reprend les éléments suivants :

- un rectangle qui va du percentile 25 (P_{25}) au percentile 75 (P_{75})
- une ligne centrale représente la médiane des résultats (P_{50})
- une ligne inférieure qui représente la plus petite valeur $x > P_{25} - 1.5 * (P_{75} - P_{25})$
- une ligne supérieure qui représente la plus grande valeur $x < P_{75} + 1.5 * (P_{75} - P_{25})$
- tous les points en dehors de cet intervalle sont représentés par un rond.



Limites correspondantes en cas de distribution normale

FIN

© Sciensano, Bruxelles 2021.

Ce rapport ne peut pas être reproduit, publié ou distribué sans l'accord de Sciensano. Les résultats individuels des laboratoires sont confidentiels. Ils ne sont transmis par Sciensano ni à des tiers, ni aux membres de la Commission, des comités d'experts ou du groupe de travail EEQ.