

**RISQUES BIOLOGIQUES POUR LA SANTE
QUALITE DES LABORATOIRES**

COMITE DES EXPERTS *AD HOC*

EVALUATION EXTERNE DE LA QUALITE

RAPPORT GLOBAL

Next Generation Sequencing (NGS)

Hémopathies malignes ADN

2023/2

Sciensano/EEQ NGS/15-FR

Risques biologiques pour la santé
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				
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: 11/09/2023, 05/10/2023.

Ce rapport a été discuté lors de la réunion du comité des experts *ad hoc* le: 29/09/2023.

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 du rapport:

Par Aline Antoniou, coordinateur d'enquête NGS

Date de publication : 13/11/2023

Tous les rapports sont également consultables sur notre site web:

<https://www.sciensano.be/fr/qualite-des-laboratoires>

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	5
1.1. Objectif de l'EEQ – 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	8
2.2. Aperçu des méthodes	8
2.3. Aperçu des résultats	12
2.3.1. NGS-2023-4	12
2.3.2. NGS-2023-5	18
2.3.3. NGS-2023-6	23
2.3.4. Taux de réussite des participants	23
2.3.5. Analyse des régions de la convention NGS non couvertes par les panels	27
3. ANNEXE	28
3.1. Régions de la convention NGS analysées	28
3.2. Aperçu des conclusions cliniques	32
3.2.1. NGS-2023-4	32
3.2.2. NGS-2023-5	38
3.2.3. NGS-2023-6	43
3.3. Interprétation du rapport individuel	47

1. INTRODUCTION

L'organisation des EEQ 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. 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>

1.1. Objectif de l'EEQ – hémopathies malignes

L'objectif de cette EEQ 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 tumoraux ont été fournis par la firme Discovery Life Science. L'ADN génomique des échantillons a été extrait à partir de BMMC ou de PBMC de patients AML. Les indications évaluées dans cet EQA ne correspondent pas toujours aux tumeurs d'origine des échantillons.

1.3. Matériel

Le matériel transmis lors de cette étude comprenait :

- 3 tubes contenant de l'ADN génomique (Volume: 20µl, Concentration: 15-50 ng/µl, elution buffer : H₂O) provenant de 3 échantillons différents avec les références suivantes: NGS-2023-4, NGS-2023-5 et NGS-2023-6.

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-2023-4: Leucémie aigüe myéloblastique (AML)

NGS-2023-5 : Syndromes myélodysplasiques avec excès de blastes-2 (MDS-EB2)

NGS-2023-6 : 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 dans le 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.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-2023-4	AML	<i>ASXL1</i> (exon 13 = dernier exon) <i>CEBPA</i> (exon 1 = entièrement) <i>DNMT3A</i> (exon 8-23) <i>FLT3</i> (exon 14, exon 15, exon 20-codon 835) <i>IDH1</i> (exon 4-hotspot) <i>IDH2</i> (exon 4-hotspot) <i>KIT</i> (exon 8, exon 10, exon 17) <i>NPM1</i> (exon 11-codon 288) <i>RUNX1</i> (exon 2-9 = entièrement) <i>TET2</i> (exon 3, exon 9-11) <i>TP53</i> (exon 2-11) <i>WT1</i> (exon 7, exon 9)
NGS-2023-5	MDS-EB2	<i>ASXL1</i> (exon 13 = dernier exon) <i>CEBPA</i> (exon 1 = entièrement) <i>DNMT3A</i> (exon 8-23) <i>EZH2</i> (exon 2-20 = entièrement) <i>FLT3</i> (exon 14, exon 15, exon 20-codon 835) <i>IDH1</i> (exon 4-hotspot) <i>IDH2</i> (exon 4-hotspot) <i>KIT</i> (exon 8, exon 10, exon 17) <i>NPM1</i> (exon 11-codon 288) <i>RUNX1</i> (exon 2-9 = entièrement) <i>SF3B1</i> (exon 14, exon 15) <i>SRSF2</i> (exon 1-codon 95) <i>TET2</i> (exon 3, exon 9-11) <i>TP53</i> (exon 2-11) <i>U2AF1</i> (exon 2-codon 34, exon 6-codon 157) <i>WT1</i> (exon 7, exon 9)
NGS-2023-6	PMF	<i>ASXL1</i> (exon 13 = dernier exon) <i>CALR</i> (exon 9) <i>EZH2</i> (exon 2-20 = entièrement) <i>IDH1</i> (exon 4-hotspot) <i>IDH2</i> (exon 4-hotspot) <i>JAK2</i> (exon 12-F537_I546, exon 14-codon 617) <i>MPL</i> (exon 10) <i>SF3B1</i> (exon 14, exon 15) <i>SRSF2</i> (exon 1-codon 95) <i>TET2</i> (exon 3, exon 9-11) <i>TP53</i> (exon 2-11) <i>U2AF1</i> (exon 2-codon 34, exon 6-codon 157)

Il avait été également demandé de se référer aux recommandations du ComPerMed et de MolecularDiagnostics.be sur l'interprétation des variants et le contenu des rapports cliniques NGS publiées sur le site de Belac :

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

Sur le site internet de réponses : <https://eqatoolkit.sciensano.be/NGS>, 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)
 - Justificatif de la classification Tier (choix multiple) (Nouveau)

- 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 vos résultats comparés aux résultats des 19 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 sont 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 les rapports et sont transmis à titre indicatif : pas de consensus. 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 sont classées en "résultat attendu" (en vert), "acceptable" (en jaune), "non-recommandé mais acceptable" (en orange), "non-acceptable" (en rouge) ou "non-évalué" (en gris). Ces catégories sont définies par un groupe d'experts en comparant les résultats du consensus des laboratoires aux résultats obtenus à l'aide des guidelines belges. Les justificatifs de classification Tier des laboratoires sont présentés dans un tableau.

Le contenu des conclusions générales rapportées par les laboratoires est classé par informations types reprises par au moins 2 laboratoires. Une analyse des régions de la convention NGS non couvertes par les panels a été réalisée et est documentée dans le rapport global et les rapports individuels des laboratoires concernés.

2. RESULTATS

2.1. Participation

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

Aperçu des participants

Région	N
Région flamande	14
Région bruxelloise	3
Région wallonne	2
Total	19

Laboratoire	N
Anatomie pathologique	1
Biologie Clinique	16
Génétique humaine	2
Total	19

2.2. Aperçu des méthodes

Q1. Quel génome de référence utilisez-vous pour l'analyse ?

Réponses	N
hg19/GRCh37	17
hg38/GRCh38	2

Remarques : 2 labos ont indiqué comme génome de référence hg18 mais le génome de référence utilisé pour les VCF files de ces 2 laboratoires est hg19/GRCh37.

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

Réponses	N
Illumina - MiSeq	9
Illumina - NovaSeq 6000	5
Illumina - NextSeq 550Dx	3
Illumina - NextSeq 550	2

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

Réponses	N
Custom panel, SeqCap EZ HyperCap, Roche	6
Custom panel, QIASeq, Qiagen	5
Custom panel, Haloplex, Agilent	1
Custom panel, TWIST, Biosciences	1
AmpliSeq Myeloid panel, Illumina	2
TruSight Myeloid Sequencing panel, Illumina	2
Archer VariantPlex Myeloid	1
Extended Myeloid Solution, Sophia Genetics	1

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

Réponses	N
Amplicon-based	10
Probe-based	9

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

Réponses	N
Paired-end	19

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

Réponses	N
74	1
100	1
150	9
151	1
200	1
340	5
Variable	1

Q7. Est-ce que votre méthode d'analyse utilise des UMI afin d'exclure les reads dupliqués?

Réponses	N
Non	14
Oui	5

Q8. Quels outils bio-informatiques sont utilisés pour l'analyse des données secondaires ? (alignement et variant calling)

Réponses	N
Open Source/in-house development	7
CLC Genomics Workbench, Qiagen	4
SeqNext, JSI medical systems	3
Local Run Manager, Illumina	2
Sophia DDM, Sophia Genetics	2
Archer DX software	1
MiSeq Reporter, Illumina	1

Remarques : Les outils bio-informatiques ont été utilisés en *open source* selon les combinaisons suivantes: 1) BWA, GATK UnifiedGenotyper, 2) bcbio, 3) BWA, VarDict 4) BWA.

Q9. Quels outils bio-informatiques sont utilisés pour l'analyse des données tertiaires ? (annotation des variants, filtres additionnels,...)

Réponses	N
Open source/in house development	10
SeqNext, JSI medical systems	4
Variant Studio Software, Illumina	3
CLC Genomics Workbench, Qiagen	2
Sophia DDM, Sophia Genetics	2
Archer DX software	1
QCI Interpret-Somatic Cancer, Qiagen	1
Manuellement dans différentes bases de données publiques	3

Remarques : Les outils bio-informatiques ont été utilisés en *open source* selon les combinaisons suivantes: 1) Annotar, 2) Alamut Visual Plus, 3) bcbio, 4) TransVar, 5) Pindel.

Q10. Pour les SNV et les indels, quelle est la limite de détection validée pour la fréquence allélique du variant (VAF %) pour les hémopathies malignes?

VAF	3	4	5
SNV	2	1	16
Indels	2	1	16

Q11. Pour les SNV et les indels, quel est le nombre minimal de reads contenant le variant accepté par votre méthode d'analyse (minimum variant coverage)?

reads	2	3	10	13	15	18	20	25
SNV	1	1	3	2	2	3	1	3
Indels	1	1	3	2	2	3	1	3

Remarques : Les réponses de 3 laboratoires n'ont pas été prises en compte parce qu'elles étaient identiques aux réponses de la question 12.

Q12. Pour les SNV et les indels, quel est le nombre de reads minimal accepté à une position donnée pour exclure la présence d'un variant?

reads	100	168	250	300	350	500	1000
SNV	2	1	2	3	3	7	1
Indels	2	1	2	3	3	7	1

Remarques : Cette valeur peut dépendre du variant et/ou de la VAF.

Q13. Quelles autres catégories de variants somatiques que les SNV et les indels sont détectées par votre méthode d'analyse NGS pour les hémopathies malignes sur ADN?

Réponses	N
Aucun autre type de variants	9
Indels longs	9
CNV	2
Autre	1

Q14. Quels types d'échantillons sont séquencés par votre laboratoire pour la détection de variants somatiques?

Réponses	N
Prélèvement de moelle	19
Sang	19
Tissu frais	6
Tissu paraffiné	3
Tissu congelé	2

Q15. 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	18
Dans certains cas, si suspicion de mutation germinale	1

Q16. Quelle est la quantité minimale d'ADN génomique requise par votre laboratoire pour réaliser l'analyse NGS sur hémopathies malignes?

Réponses	N
0-10 ng	3
11-50 ng	8
51-100 ng	4
>201 ng	4

Q17. Quelle est la concentration minimale d'ADN génomique requise par votre laboratoire pour réaliser l'analyse NGS sur hémopathies malignes? (ng/µl)

Réponses	N
0.8 ng/µl	1
1 ng/µl	4
3.3 ng/µl	1
5 ng/µl	3
6.5 ng/µl	1
7 ng/µl	4
8 ng/µl	1
10 ng/µl	3
20 ng/µl	1

Q18. Quelle est la méthode utilisée pour la quantification de l'ADN ?

Réponses	N
Qubit	15
NanoDrop	5
DropSens	4
Quantus	2

Q19. Quelles sont les guidelines utilisées pour l'interprétation des variants somatiques?

Réponses	N
BELAC 2-405-NGS Rev 3-2021	19
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)	16
National Comprehensive Cancer Network Guidelines	13
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)	13
World Health Organization guidelines	13
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)	12
European LeukemiaNet guidelines	11
ERIC Recommendations	8

2.3. Aperçu des résultats

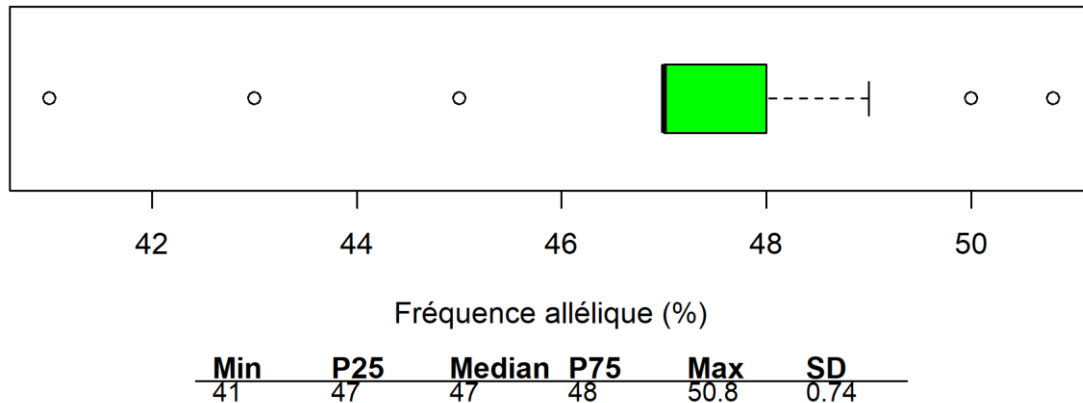
2.3.1. NGS-2023-4

Informations médicales Leucémie aigüe myéloblastique (AML)

Consensus des variants à rapporter

- [DNMT3A NM_175629.2; c.2644C>T; p.\(Arg882Cys\)](#)

DNMT3A NM_175629.2; c.2644C>T; p.(Arg882Cys)



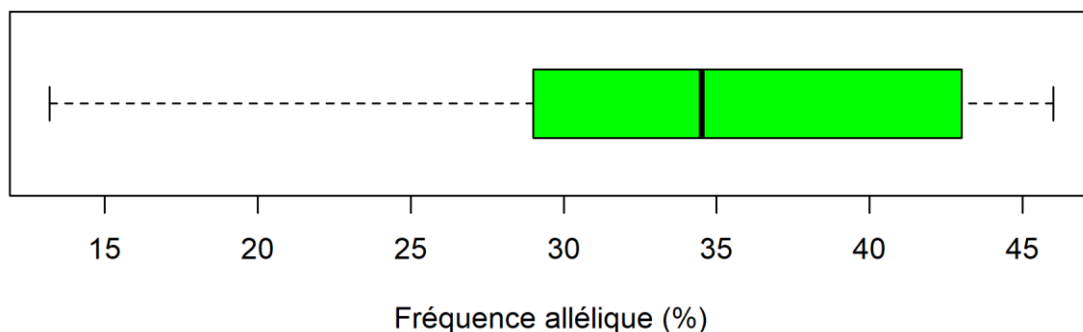
DNMT3A NM_175629.2 c.2644C>T p.(Arg882Cys) (Fréquence allélique médiane: 47 %)	
Identification du variant	N
Oui	19
Non	0
Classification biologique	N
Pathogénique	19
Total	19
Classification clinique	N
Tier I	15
Tier II	4
Total	19

Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant *DNMT3A* NM_175629.2; c.2644C>T; p.(Arg882Cys). 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 en raison du consensus des laboratoires. La classification de niveau II est considérée comme acceptable car la distinction entre les classifications Tier I et Tier II n'est pas clairement définie lorsque le variant n'a pas d'implication thérapeutique.

Justificatif de la classification Tier	N
Prognosis - Level B: Biomarkers of prognostic significance for a specific type of tumor based on well-powered studies with consensus from experts in the field	9
Diagnosis - Level B: Biomarkers of diagnostic significance for a specific type of tumor based on well-powered studies with consensus from experts in the field	4
Prognosis - Level A: Biomarkers included in professional guidelines as prognostic for a specific type of tumor	4
Diagnosis - Level A: Biomarkers included in professional guidelines as diagnostic for a specific type of tumor	3
Prognosis - Level C: Biomarkers of prognostic significance based on the results of multiple small studies	3
Diagnosis - Level C: Biomarkers of diagnostic significance based on the results of multiple small studies	2
Prognosis - Level D: Biomarkers that may assist disease prognosis themselves or along with other biomarkers based on small studies or a few case reports	2

- [FLT3 NM_004119.2; c.1757_1780dup; p.\(Asp593_Phe594insTyrAsnGluTyrPheTyrValAsp\)](#)

FLT3 NM_004119.2; c.1757_1780dup; p.(Asp593_Phe594insTyrAsnGluTyrPheTyrValAsp)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
13.2	29.5	34.5	43	46	10.01

FLT3 NM_004119.2 c.1757_1780dup p.(Asp593_Phe594insTyrAsnGluTyrPheTyrValAsp) (Fréquence allélique médiane: 34.5 %)	
Identification du variant	N
Oui	19
Non	0
Classification biologique	N
Pathogénique	18
Probablement pathogénique	1
Total	19
Classification clinique	N
Tier I	19
Total	19

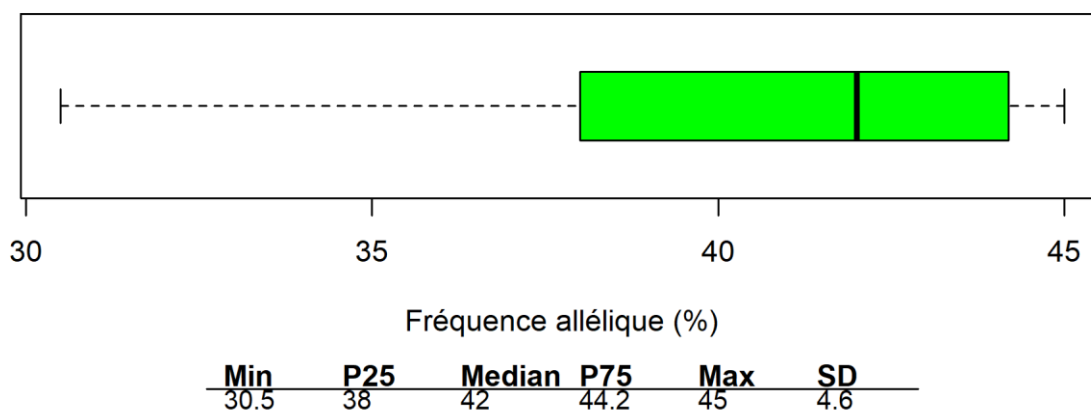
Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant *FLT3* NM_004119.2; c.1757_1780dup; p.(Asp593_Phe594insTyrAsnGluTyrPheTyrValAsp). Si la description de l'insertion est considérée comme trop longue par le laboratoire pour être décrite en détail, l'annotation du variant devrait être décrite selon la nomenclature HGVS de la manière suivante: p.(Asp593_Phe594insX[8]). Concernant les classifications biologiques, le résultat attendu pour ce variant est la classification pathogénique en raison du consensus des laboratoires. La classification probablement pathogénique est considérée comme acceptable puisque en accord avec les guidelines belges. Dans les guidelines belges, les duplications dans l'exon 14 sont présentes dans le tableau 'Annex 1 Consensus Pathogenic Variants (CPV) in the Convention genes of solid and hematological tumors v2'. L'impact des insertions peut être considéré comme

similaire aux duplications et devraient être ajoutées dans l'annexe 1 lors de la prochaine révision des guidelines. Concernant les classifications cliniques, le résultat attendu pour ce variant est la classification Tier I.

Justificatif de la classification Tier	N
Therapeutic - Level A1: Biomarkers that predict response or resistance to FDA-approved therapies for a specific type of tumor	18
Prognosis - Level A: Biomarkers included in professional guidelines as prognostic for a specific type of tumor	15
Diagnosis - Level A: Biomarkers included in professional guidelines as diagnostic for a specific type of tumor	2
Therapeutic - Level A2: Biomarkers included in professional guidelines that predict response or resistance to therapies for a specific type of tumor	2
Prognosis - Level B: Biomarkers of prognostic significance for a specific type of tumor based on well-powered studies with consensus from experts in the field	1

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

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



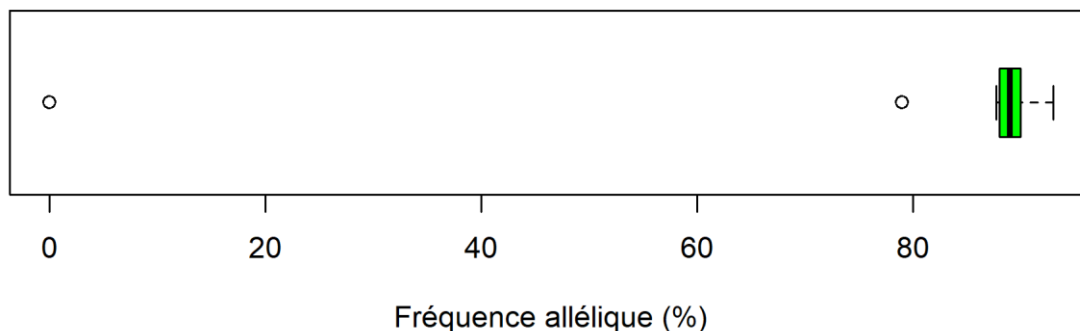
NPM1 NM_002520.6 c.860_863dup p.(Trp288Cysfs*12) (Fréquence allélique médiane: 42 %)	
Identification du variant	N
Oui	19
Non	0
Classification biologique	N
Pathogénique	19
Total	19
Classification clinique	N
Tier I	19
Total	19

Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant *NPM1* NM_002520.6; c.860_863dup; p.(Trp288Cysfs*12). 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.

Justificatif de la classification Tier	N
Prognosis - Level A: Biomarkers included in professional guidelines as prognostic for a specific type of tumor	15
Diagnosis - Level A: Biomarkers included in professional guidelines as diagnostic for a specific type of tumor	13
Prognosis - Level B: Biomarkers of prognostic significance for a specific type of tumor based on well-powered studies with consensus from experts in the field	1

- [WT1 NM_024426.5; c.1399C>T; p.\(Arg467Trp\)](#)

WT1 NM_024426.5; c.1399C>T; p.(Arg467Trp)



Min **P25** **Median** **P75** **Max** **SD**
 0 88 89 90 93 1.48

WT1 NM_024426.5 c.1399C>T p.(Arg467Trp) (Fréquence allélique médiane: 89%)	
Identification du variant	N
Oui : WT1 NM_024426.5; c.1399C>T; p.(Arg467Trp)	9
Oui : WT1 NM_024426.3 ou 4; c.1384C>T ; p.(Arg462Trp)	9
Oui : WT1 NM_024425.2; c.1333C>T ; p.(Arg445Trp)	1
Non	0
Classification biologique	N
Pathogénique	1
Probablement pathogénique	17
VUS	1
Total	19
Classification clinique	N
Tier I	7
Tier II	11
Tier III	1
Total	19

Commentaires: Pour cet échantillon, la réponse attendue est l'identification du variant *WT1* NM_024426.5; c.1399C>T; p.(Arg467Trp). 9 laboratoires ont rapporté à la place le variant c.1384C>T; p.(Arg462Trp) et 1 laboratoire le variant c.1333C>T; p.(Arg445Trp). Ces laboratoires ont utilisé des versions NM précédentes à celle spécifiée par la convention, respectivement les versions NM_024426.3 ou 4 et NM_024425.2. Ces réponses ont été considérées comme acceptables puisque le variant a été identifié correctement et que les versions des références NM ne seront plus imposées dans la prochaine révision de la convention NGS. Les gènes pour lesquels la version NM montre un impact sur l'annotation des variants seront listés et communiqués à l'ensemble des membres du ComPerMed. Concernant les classifications biologiques, le résultat attendu pour ce variant est la classification probablement pathogénique. La classification pathogénique est considérée comme non recommandée selon les guidelines belges mais acceptable puisque sans impact pour le suivi du patient. Dans les guidelines belges, ce variant n'est pas présent dans le tableau 'Annex 1 Consensus Pathogenic Variants (CPV) in the Convention genes of solid and hematological tumors v2' mais possède un score supérieur ou égal à 2 selon la table de scoring. La classification VUS est considérée comme non acceptable. Concernant les classifications cliniques, en l'absence de consensus et étant donné que la distinction entre les classifications Tier I et Tier II n'est pas clairement définie lorsque le variant n'a pas d'implication thérapeutique, les classifications Tier I et Tier II sont considérées comme acceptables. La classification Tier III est considérée comme non acceptable étant donné l'utilité pronostique de ce variant.

Justificatif de la classification Tier	N
Prognosis - Level C: Biomarkers of prognostic significance based on the results of multiple small studies	7
Prognosis - Level B: Biomarkers of prognostic significance for a specific type of tumor based on well-powered studies with consensus from experts in the field	6
Prognosis - Level D: Biomarkers that may assist disease prognosis themselves or along with other biomarkers based on small studies or a few case reports	3
Diagnosis - Level D: Biomarkers that may assist disease diagnosis themselves or along with other biomarkers based on small studies or a few case reports	2
Not observed at a significant allele frequency in the general or specific subpopulation databases, or pan-cancer or tumor-specific variant databases; No convincing published evidence of cancer association	1
Prognosis - Level A: Biomarkers included in professional guidelines as prognostic for a specific type of tumor	1

Consensus des variants à ne pas rapporter

- [IDH1 NM_005896.3; c.395G>A; p.\(Arg132His\)](#)

IDH1 NM_005896.3 c.395G>A p.(Arg132His) (Fréquence allélique médiane: 4.6 %)	
Identification du variant	N
Oui	1
Non	16
Classification biologique	N
Pathogénique	1
Total	1
Classification clinique	N
Tier I	1
Total	1

Commentaires: Dans cet échantillon, seul un laboratoire a identifié le variant *IDH1* NM_005896.3; c.395G>A; p.(Arg132His). 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.

Justificatif de la classification Tier	N
Prognosis - Level A: Biomarkers included in professional guidelines as prognostic for a specific type of tumor	1
Therapeutic - Level A1: Biomarkers that predict response or resistance to FDA-approved therapies for a specific type of tumor	1

Variants non évalués

- *FLT3* NM_004119.2; c.2600T>C; p.(Ile867Thr)

<i>FLT3</i> NM_004119.2 c.2600T>C p.(Ile867Thr) (Fréquence allélique médiane: 29%)	
Identification du variant	N
Oui	1
Non	18
Classification biologique	N
VUS	1
Total	1
Classification clinique	N
Tier III	1
Total	1

Commentaires: Dans cet échantillon, seul un laboratoire a identifié le variant *FLT3* NM_004119.2; c.2600T>C; p.(Ile867Thr). Ce variant est localisé dans l'exon 21 du gène *FLT3*, qui n'est pas inclus dans les régions requises de la convention NGS pour l'indication AML (uniquement exons 14, 15 et 20-codon 835). Pour cette raison, le variant n'est pas évalué. Les classifications biologiques et cliniques pour ce variant sont transmises à titre informatif.

Informations types	Informations spécifiques au cas 4 et reprises dans la conclusion générale par au moins 2 laboratoires	Laboratoires
Diagnostic	Variants récurrents dans les AML - Profil mutationnel compatible avec le diagnostic AML	14
	Classement AML ' <i>NPM1</i> muté de type A'	12
Pronostic	Variant <i>NPM1</i> de pronostic favorable en l'absence d'un variant <i>FLT3-ITD</i>	4
	Co-mutation <i>FLT3-ITD+NPM1</i> de pronostic intermédiaire-défavorable	13
	Combinaison des mutations <i>DNMT3A+NPM1+FLT3</i> (triple muté) de pronostic très défavorable	6
	Effet péjoratif potentiel sur le pronostic dû à la présence du variant <i>WT1</i>	11
	Effet péjoratif potentiel sur le pronostic dû à la présence du variant <i>DNMT3A</i>	4
	Présence du variant <i>WT1</i> de pronostic indéterminé	2
	Présence du variant <i>DNMT3A</i> de pronostic indéterminé	4
	Utilisation de <i>NPM1</i> et <i>WT1</i> comme marqueurs MRD	2
Traitement	Indication de sensibilité aux inhibiteurs tyrosine kinase <i>FLT3</i>	14
	Indication de sensibilité aux inhibiteurs tyrosine kinase <i>FLT3</i> en association avec une chimiothérapie	2
	Résistance à la chimiothérapie d'induction due à la présence des variants <i>FLT3+WT1</i>	2
Autres	Analyses complémentaires suggérées: caryotype, analyse germinale, paramètres hématologiques, etc.	7

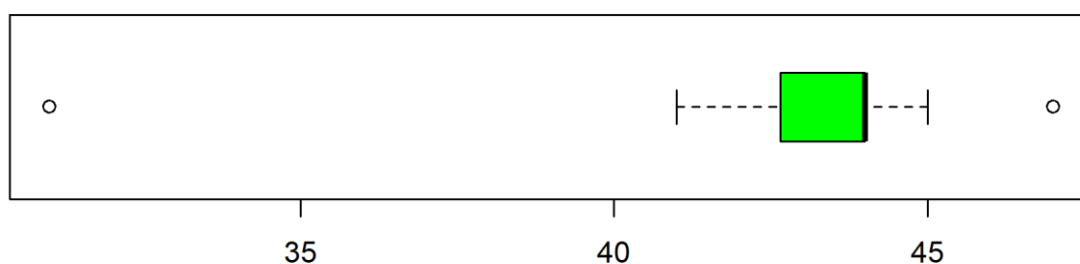
2.3.2. NGS-2023-5

Informations médicales Syndromes myélodysplasiques avec excès de blastes-2 (MDS-EB2)

Consensus des variants à rapporter

- [DNMT3A NM_175629.2; c.1969G>A; p.\(Val657Met\)](#)

DNMT3A NM_175629.2; c.1969G>A; p.(Val657Met)



Fréquence allélique (%)

Min	P25	Median	P75	Max	SD
31	42.83	44	44	47	0.87

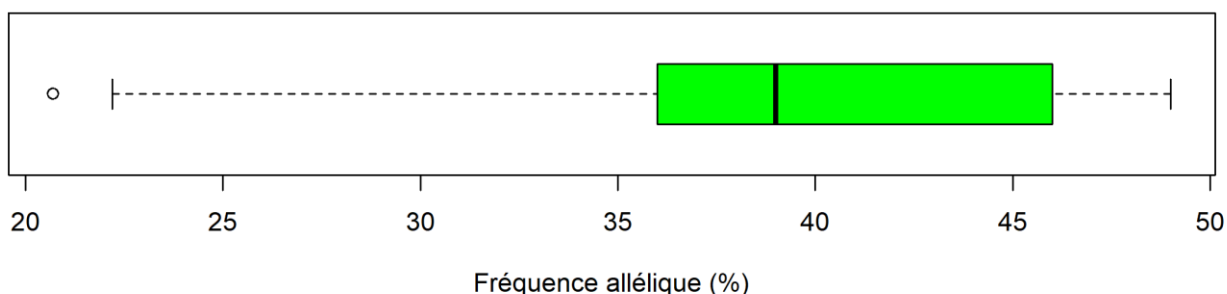
DNMT3A NM_175629.2 c.1969G>A p.(Val657Met) (Fréquence allélique médiane: 44 %)	
Identification du variant	N
Oui	16
Non	3
Classification biologique	N
Pathogénique	1
VUS	15
Total	16
Classification clinique	N
Tier I	1
Tier III	15
Total	16

Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant *DNMT3A* NM_175629.2; c.1969G>A; p.(Val657Met). 16 laboratoires ont rapporté ce variant, dont 1 laboratoire avec une annotation erronée pour le cDNA. L'annotation est décrite correctement dans le VCF du laboratoire concerné. Il s'agit probablement d'une erreur de retranscription. 3 laboratoires n'ont pas rapporté ce variant. Pour ces 3 laboratoires, le variant est présent dans leurs données brutes (fichiers VCF et BAM) avec une couverture élevée (entre 500 et 2500 reads). Concernant les classifications biologiques, le résultat attendu pour ce variant est la classification VUS. Dans les guidelines belges, selon la table de scoring, ce variant a un score inférieur à 2 (nombre d'entrées COSMIC inférieur à 5). La classification pathogénique est considérée comme non acceptable. Concernant les classifications cliniques, le résultat attendu pour ce variant est la classification Tier III. La classification Tier I est considérée comme non acceptable.

Justificatif de la classification Tier	N
Not observed at a significant allele frequency in the general or specific subpopulation databases, or pan-cancer or tumor-specific variant databases; No convincing published evidence of cancer association	15
Prognosis - Level A: Biomarkers included in professional guidelines as prognostic for a specific type of tumor	1

- [FLT3 NM_004119.2; c.1792_1793insGGTTTGATTTTCAGAGAATATG; p.\(Tyr597_Glu598insGlyPheAspPheArgGluTyr\)](#)

FLT3 NM_004119.2; c.1792_1793insGGTTTGATTTTCAGAGAATATG; p.(Tyr597_Glu598insGlyPheAspPheArgGluTyr)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
20.7	36.25	39	45.25	49	6.67

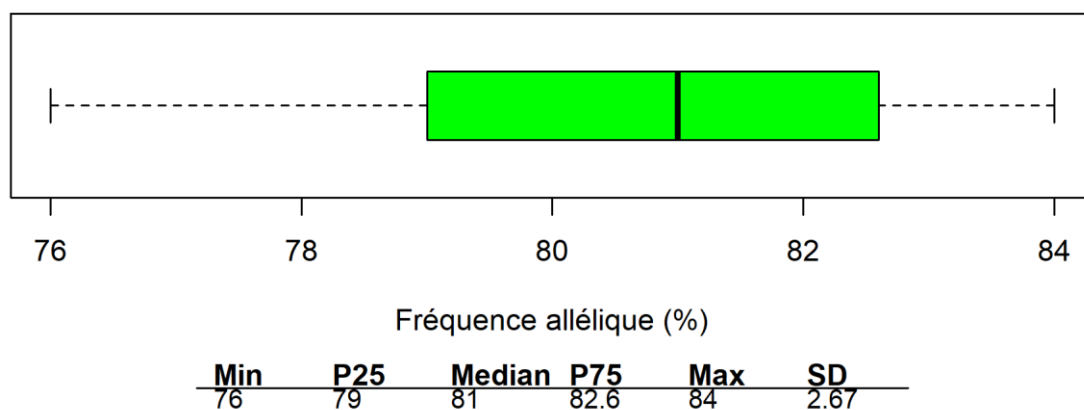
FLT3 NM_004119.2 c.1792_1793insGGTTTGATTTTCAGAGAATATG p.(Tyr597_Glu598insGlyPheAspPheArgGluTyr) (Fréquence allélique médiane: 39 %)	
Identification du variant	N
Oui	19
Non	0
Classification biologique	N
Pathogénique	17
Probablement pathogénique	1
VUS	1
Total	19
Classification clinique	N
Tier I	17
Tier II	2
Total	19

Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant *FLT3* NM_004119.2; c.1792_1793insGGTTTGATTTTCAGAGAATATG; p.(Tyr597_Glu598insGlyPheAspPheArgGluTyr). Si la description de l'insertion est considérée comme trop longue par le laboratoire pour être décrite en détail, l'annotation du variant devrait être décrite selon la nomenclature HGVS de la manière suivante: c.1792_1793insN[21]; p.(Tyr597_Glu598insX[7]). Concernant les classifications biologiques, le résultat attendu pour ce variant est la classification pathogénique en raison du consensus des laboratoires. La classification probablement pathogénique est considérée comme acceptable puisque en accord avec les guidelines belges. Dans les guidelines belges, les duplications dans l'exon 14 sont présentes dans le tableau 'Annex 1 Consensus Pathogenic Variants (CPV) in the Convention genes of solid and hematological tumors v2'. L'impact des insertions peut être considéré comme similaire aux duplications et devraient être ajoutées dans l'annexe 1 lors de la prochaine révision des guidelines. La classification VUS est considérée comme non acceptable. Concernant les classifications cliniques, le résultat attendu pour ce variant est la classification Tier I en raison du consensus des laboratoires. La classification Tier II est considérée comme acceptable puisque le choix de la classification Tier I est basé sur le prognostic.

Justificatif de la classification Tier	N
Prognosis - Level A: Biomarkers included in professional guidelines as prognostic for a specific type of tumor	14
Therapeutic - Level A1: Biomarkers that predict response or resistance to FDA-approved therapies for a specific type of tumor	11
Diagnosis - Level A: Biomarkers included in professional guidelines as diagnostic for a specific type of tumor	2
Prognosis - Level B: Biomarkers of prognostic significance for a specific type of tumor based on well-powered studies with consensus from experts in the field	2
Therapeutic - Level B: Biomarkers that predict response or resistance to therapies for a specific type of tumor based on well-powered studies with consensus from experts in the field	2
Prognosis - Level C: Biomarkers of prognostic significance based on the results of multiple small studies	1
Therapeutic - Level C2: Biomarkers that serve as inclusion criteria for clinical trials	1

- [RUNX1 NM_001754.4; c.485G>C; p.\(Arg162Thr\)](#)

RUNX1 NM_001754.4; c.485G>C; p.(Arg162Thr)



RUNX1 NM_001754.4 c.485G>C p.(Arg162Thr) (Fréquence allélique médiane: 81 %)	
Identification du variant	N
Oui	17
Non	2
Classification biologique	N
Pathogénique	1
Probablement pathogénique	4
VUS	12
Total	17
Classification clinique	N
Tier I	4
Tier II	1
Tier III	12
Total	17

Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant *RUNX1* NM_001754.4; c.485G>C; p.(Arg162Thr). 2 laboratoires n'ont pas rapporté ce variant. Pour ces 2 laboratoires, le variant est présent dans leurs données brutes (fichiers VCF et BAM) avec une couverture élevée (361 et 3074 reads). Les experts ont décidé de ne pas évaluer les classifications biologiques et cliniques de ce variant. L'algorithme dans sa forme actuelle ne tient pas compte de l'ensemble des bases de données et des publications existantes et ne permet pas de classer correctement ce variant. Les guidelines seront adaptées en conséquence. Données fournies par les experts pour classer le variant *RUNX1* comme probablement pathogénique :

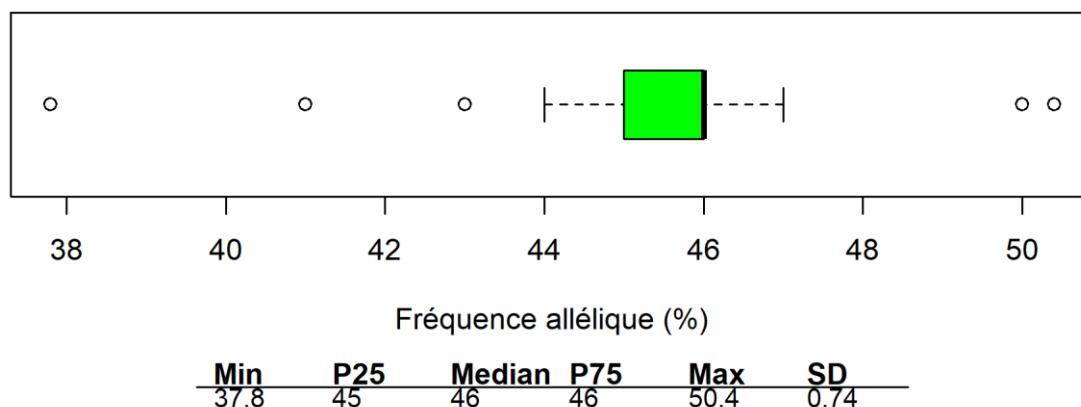
- Article of Kohlman et al. (Leukemia 2014, PMID: 24220272): twelve Arg162 variants (T/S/G/K) were reported in AML (corresponds to Arg135 with another NM number).

- Article Bera et al. (J of Hematology & Oncology 2019, PMID: 31640815): functional in-vitro study in which the variant was shown to promote leukemogenesis in 'ASXL1-leukemia's.
- Article of Bartfeld et al. (Structure 2002, PMID: 12377125): Arg135 makes direct contact to the DNA-backbone indicating it is an important residue for protein-DNA interactions.
- Mentioned as an AA mutated in Familial platelet disorder with associated myeloid malignancy (FPD/AML).
- VarSome germline classifier ranks RUNX1 variant as 'Pathogenic'.
- RUNX1 variant present in Mastermind with 7 entries.
- 5th most often AA affected in RUNX1.

Justificatif de la classification Tier	N
Not observed at a significant allele frequency in the general or specific subpopulation databases, or pan-cancer or tumor-specific variant databases; No convincing published evidence of cancer association	12
Prognosis - Level B: Biomarkers of prognostic significance for a specific type of tumor based on well-powered studies with consensus from experts in the field	3
Prognosis - Level A: Biomarkers included in professional guidelines as prognostic for a specific type of tumor	2
Diagnosis - Level B: Biomarkers of diagnostic significance for a specific type of tumor based on well-powered studies with consensus from experts in the field	1
Diagnosis - Level C: Biomarkers of diagnostic significance based on the results of multiple small studies	1
Prognosis - Level C: Biomarkers of prognostic significance based on the results of multiple small studies	1

- [U2AF1 NM_006758.2; c.101C>T; p.\(Ser34Phe\)](#)

U2AF1 NM_006758.2; c.101C>T; p.(Ser34Phe)



U2AF1 NM_006758.2 c.101C>T p.(Ser34Phe) (Fréquence allélique médiane: 46 %)	
Identification du variant	N
Oui	19
Non	0
Classification biologique	N
Pathogénique	19
Total	19
Classification clinique	N
Tier I	18
Tier II	1
Total	19

Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant *U2AF1* NM_006758.2; c.101C>T; p.(Ser34Phe). 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 en raison du consensus des

laboratoires. La classification de niveau II est considérée comme acceptable car la distinction entre les classifications Tier I et Tier II n'est pas clairement définie lorsque le variant n'a pas d'implication thérapeutique.

Justificatif de la classification Tier	N
Prognosis - Level A: Biomarkers included in professional guidelines as prognostic for a specific type of tumor	12
Diagnosis - Level A: Biomarkers included in professional guidelines as diagnostic for a specific type of tumor	8
Prognosis - Level B: Biomarkers of prognostic significance for a specific type of tumor based on well-powered studies with consensus from experts in the field	4
Diagnosis - Level B: Biomarkers of diagnostic significance for a specific type of tumor based on well-powered studies with consensus from experts in the field	2
Diagnosis - Level C: Biomarkers of diagnostic significance based on the results of multiple small studies	1
Prognosis - Level C: Biomarkers of prognostic significance based on the results of multiple small studies	1
Therapeutic - Level B: Biomarkers that predict response or resistance to therapies for a specific type of tumor based on well-powered studies with consensus from experts in the field	1

Informations types	Informations spécifiques au cas 5 et reprises dans la conclusion générale par au moins 2 laboratoires	Laboratoires
Diagnostic	Profil mutationnel compatible avec le diagnostic MDS	16
	Variants <i>FLT3-ITD</i> récurrents dans les AML- rares dans les MDS	8
	Classé comme MDS/AML avec mutation génétique liée à la myélodysplasie	5
Pronostic	Variants <i>U2AF1</i> de pronostic défavorable dans les MDS	14
	Augmentation du risque de transformation en AML liée à la présence du variant <i>U2AF1</i>	5
	Variants <i>FLT3-ITD</i> de pronostic défavorable dans les MDS	13
	Augmentation du risque de transformation en AML liée à la présence du variant <i>FLT3-ITD</i>	7
	<i>FLT3-ITD</i> et <i>U2AF1</i> présents dans calcul de scores de risque IPSS-M	4
Traitement	Indication de sensibilité aux inhibiteurs tyrosine kinase <i>FLT3</i>	10
Autres	Analyses complémentaires suggérées: caryotype, analyse germinale, paramètres hématologiques, etc.	2

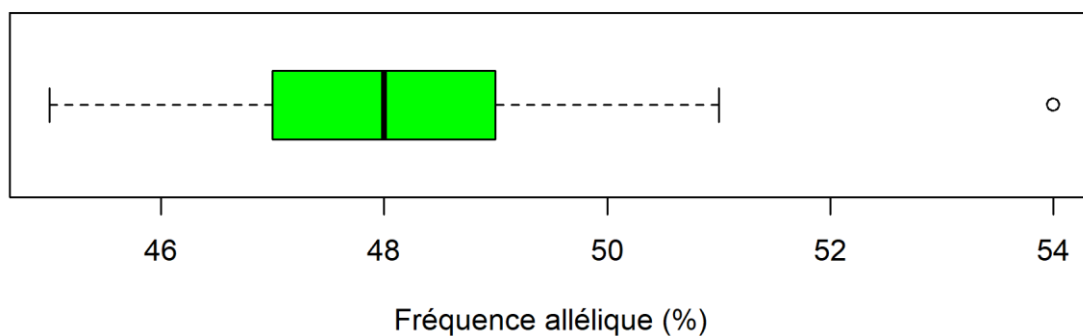
2.3.3. NGS-2023-6

Informations médicales Myélofibrose primitive (PMF)

Consensus des variants à rapporter

- [IDH2 NM_002168.2; c.419G>A; p.\(Arg140Gln\)](#)

IDH2 NM_002168.2; c.419G>A; p.(Arg140Gln)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
45	47	48	49	54	1.48

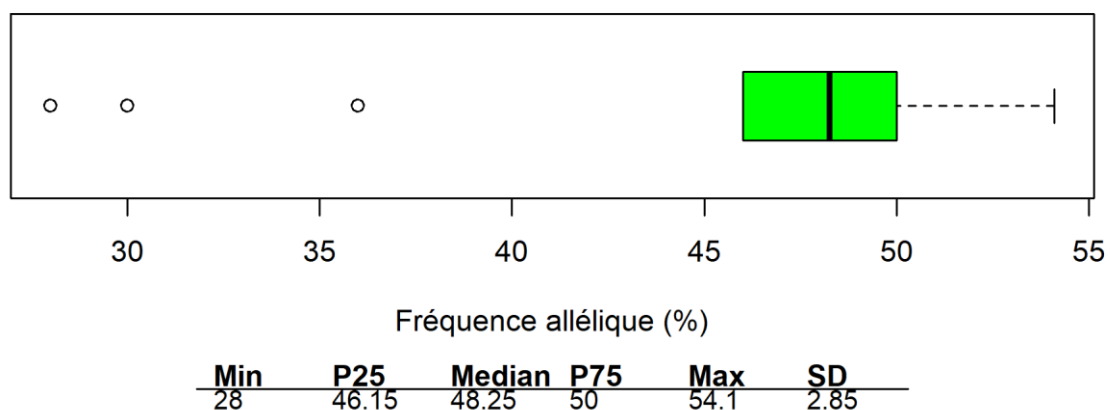
IDH2 NM_002168.2 c.419G>A p.(Arg140Gln) (Fréquence allélique médiane: 48 %)	
Identification du variant	N
Oui	19
Non	0
Classification biologique	N
Pathogénique	19
Total	19
Classification clinique	N
Tier I	18
Tier II	1
Total	19

Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant *IDH2* NM_002168.2; c.419G>A; p.(Arg140Gln). 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 en raison du consensus des laboratoires. La classification Tier II est considérée comme acceptable puisque le choix de la classification Tier I est basé sur le pronostic.

Justificatif de la classification Tier	N
Prognosis - Level A: Biomarkers included in professional guidelines as prognostic for a specific type of tumor	14
Diagnosis - Level A: Biomarkers included in professional guidelines as diagnostic for a specific type of tumor	10
Therapeutic - Level A1: Biomarkers that predict response or resistance to FDA-approved therapies for a specific type of tumor	3
Prognosis - Level B: Biomarkers of prognostic significance for a specific type of tumor based on well-powered studies with consensus from experts in the field	2
Therapeutic - Level B: Biomarkers that predict response or resistance to therapies for a specific type of tumor based on well-powered studies with consensus from experts in the field	2
Diagnosis - Level B: Biomarkers of diagnostic significance for a specific type of tumor based on well-powered studies with consensus from experts in the field	1
Diagnosis - Level C: Biomarkers of diagnostic significance based on the results of multiple small studies	1
Prognosis - Level C: Biomarkers of prognostic significance based on the results of multiple small studies	1
Therapeutic - Level A2: Biomarkers included in professional guidelines that predict response or resistance to therapies for a specific type of tumor	1
Therapeutic - Level C2: Biomarkers that serve as inclusion criteria for clinical trials	1

- [SRSF2 NM_003016.4: c.284C>T; p.\(Pro95Leu\)](#)

SRSF2 NM_003016.4; c.284C>T; p.(Pro95Leu)



SRSF2 NM_003016.4 c.284C>T p.(Pro95Leu) (Fréquence allélique médiane: 48.25 %)	
Identification du variant	N
Oui	18
Non	1
Classification biologique	N
Pathogénique	18
Total	18
Classification clinique	N
Tier I	18
Total	18

Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant *SRSF2* NM_003016.4; c.284C>T; p.(Pro95Leu). 1 laboratoire n'a pas rapporté ce variant. Pour ce laboratoire, ce variant est présent dans leurs données brutes (fichiers VCF et BAM) avec une couverture élevée (6153 reads) et est mentionné dans la conclusion clinique. Il s'agit d'une erreur humaine lors de l'introduction des résultats sur le site web. 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.

Justificatif de la classification Tier	N
Prognosis - Level A: Biomarkers included in professional guidelines as prognostic for a specific type of tumor	14
Diagnosis - Level A: Biomarkers included in professional guidelines as diagnostic for a specific type of tumor	9
Prognosis - Level B: Biomarkers of prognostic significance for a specific type of tumor based on well-powered studies with consensus from experts in the field	3
Diagnosis - Level B: Biomarkers of diagnostic significance for a specific type of tumor based on well-powered studies with consensus from experts in the field	2

Informations types	Informations spécifiques au cas 6 et reprises dans la conclusion générale par au moins 2 laboratoires	Laboratoires
Diagnostic	Profil mutationnel compatible avec le diagnostic PMF	15
	PMF triple négatif (<i>JAK2/CALR/MPL</i> -wild type)	10
	Variants <i>IDH2</i> rares dans les PMF	4
	La présence des variants <i>SRSF2</i> et <i>IDH2</i> indique une hématopoïèse clonale	3
Pronostic	<i>SRSF2</i> et <i>IDH2</i> 'High Risk mutations' (HRM) dans les PMF-pronostic défavorable	18
	PMF triples négatifs (<i>JAK2/CALR/MPL</i> -wild type) associés à un pronostic défavorable	3
	Modèles pronostiques intégrés des PMF: Scores de risque MIPSS70 et GIPSS	5
Traitement	Indication de la sensibilité aux inhibiteurs d' <i>IDH2</i>	7

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
10/10 (100%)	15
9/10 (90%)	2
8/10 (80%)	2
Taux de réussite total: 184/190 (96,84%)	

*Les résultats «acceptables» sont considérés comme réussis.

Dans l'échantillon NGS-2023-4, un laboratoire a rapporté le variant *FLT3* NM_004119.2; c.2600T>C; p.(Ile867Thr) et a été classé dans la catégorie des variants non évalués. Ce variant ne fait pas partie des régions requises par la convention NGS.

Consensus des variants à ne pas rapporter

Dans l'échantillon NGS-2023-4, un laboratoire a rapporté le variant *IDH1* NM_005896.3; c.395G>A; p.(Arg132His). Ce variant est considéré comme un faux positif.

Classifications biologiques et cliniques

Taux de réussite des participants pour les classifications pour le consensus des variants à rapporter *	N
Classifications biologiques	
9/9, 8/8, 7/7 (100%)	16
8/9 (88.9%)	3
Taux de réussite total - classifications biologiques : 164/167(98.2%)	
Classifications cliniques	
9/9, 8/8, 7/7 (100%)	17
8/9 (88.9%)	2
Taux de réussite total - classifications cliniques : 165/167 (98.8%)	

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

2.3.5. Analyse des régions de la convention NGS non couvertes par les panels

Echantillon	Nombre de laboratoires couvrant toutes les régions de la convention
NGS-2022-4 (AML)	15
NGS-2022-5 (MDS)	15
NGS-2022-6 (PMF)	16

L'analyse a été réalisée sur les BAM files transmis par les laboratoires, uniquement pour les régions requises par la convention NGS depuis le 1er janvier 2022 pour chaque indication évaluée lors de l'EEQ (voir Annexe 3.1. "Régions de la convention analysées"). Un seuil de 50 reads a été utilisé pour déterminer si la position était couverte ou non par le panel.

4 laboratoires utilisent des panels ne couvrant pas la totalité des régions exigées dans la convention NGS. Nous invitons les laboratoires à mettre à jour leurs panels d'analyse selon les exigences de la convention INAMI après chaque révision. Ces résultats ne sont pas évalués.

Laboratoire	Echantillon	Longueur en pb non couverte par le panel du laboratoire
Lab 1	NGS-2023-4 (AML)	654
	NGS-2023-5 (MDS)	51
Lab 2	NGS-2023-4 (AML)	83
	NGS-2023-5 (MDS)	75
	NGS-2023-6 (PMF)	75
Lab 3	NGS-2023-4 (AML)	462
	NGS-2023-5 (MDS)	546
	NGS-2023-6 (PMF)	84
Lab 4	NGS-2023-4 (AML)	462
	NGS-2023-5 (MDS)	546
	NGS-2023-6 (PMF)	84

3. ANNEXE

3.1. Régions de la convention NGS analysées (Référence GRCh37)

Gene	Exon	Codon	Chr	Start	End	Conditions
ASXL1	13	all	20	31022235	31025142	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
CEBPA	1	all	19	33792244	33793320	Acute myeloid leukemia
DNMT3A	8	all	2	25470460	25470618	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
DNMT3A	9	all	2	25469920	25470027	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
DNMT3A	10	all	2	25469489	25469645	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
DNMT3A	11	all	2	25469029	25469178	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
DNMT3A	12	all	2	25468889	25468933	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
DNMT3A	13	all	2	25468122	25468201	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
DNMT3A	14	all	2	25467409	25467521	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
DNMT3A	15	all	2	25467024	25467207	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
DNMT3A	16	all	2	25466767	25466851	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
DNMT3A	17	all	2	25464431	25464576	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
DNMT3A	18	all	2	25463509	25463599	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
DNMT3A	19	all	2	25463171	25463319	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
DNMT3A	20	all	2	25461999	25462084	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
DNMT3A	21	all	2	25459805	25459874	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
DNMT3A	22	all	2	25458576	25458694	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
DNMT3A	23	all	2	25457147	25457289	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
FLT3	14	all	13	28608218	28608352	Acute myeloid leukemia
FLT3	15	all	13	28608024	28608129	Acute myeloid leukemia
FLT3	20	835	13	28592640	28592642	Acute myeloid leukemia
IDH1	4	132	2	209113111	209113113	Acute myeloid leukemia, Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
IDH2	4	140	15	90631933	90631935	Acute myeloid leukemia, Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
IDH2	4	172	15	90631837	90631839	Acute myeloid leukemia, Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
KIT	8	all	4	55589750	55589865	Acute myeloid leukemia
KIT	10	all	4	55593384	55593490	Acute myeloid leukemia
KIT	17	all	4	55599236	55599358	Acute myeloid leukemia

<i>NPM1</i>	11	288	5	170837546	170837548	Acute myeloid leukemia
<i>RUNX1</i>	2	all	21	36421139	36421197	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>RUNX1</i>	3	all	21	36265222	36265260	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>RUNX1</i>	4	all	21	36259140	36259393	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>RUNX1</i>	5	all	21	36252854	36253010	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>RUNX1</i>	6	all	21	36231771	36231875	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>RUNX1</i>	7	all	21	36206707	36206898	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>RUNX1</i>	8	all	21	36171598	36171759	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>RUNX1</i>	9	all	21	36164432	36164907	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>TET2</i>	3	all	4	106155051	106158501	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TET2</i>	9	all	4	106190767	106190904	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TET2</i>	10	all	4	106193720	106194075	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TET2</i>	11	all	4	106196206	106197675	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TP53</i>	2	all	17	7579839	7579913	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TP53</i>	3	all	17	7579700	7579721	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TP53</i>	4	all	17	7579312	7579590	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TP53</i>	5	all	17	7578371	7578554	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TP53</i>	6	all	17	7578177	7578289	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TP53</i>	7	all	17	7577499	7577608	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TP53</i>	8	all	17	7577019	7577155	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TP53</i>	9	all	17	7576853	7576926	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis

TP53	10	all	17	7573927	7574033	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
TP53	11	all	17	7572926	7573008	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
WT1	7	all	11	32417803	32417954	Acute myeloid leukemia
WT1	9	all	11	32413517	32413611	Acute myeloid leukemia
EZH2	2	all	7	148544274	148544391	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
EZH2	3	all	7	148543562	148543690	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
EZH2	4	all	7	148529726	148529842	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
EZH2	5	all	7	148526820	148526940	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
EZH2	6	all	7	148525832	148525972	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
EZH2	7	all	7	148524256	148524358	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
EZH2	8	all	7	148523546	148523724	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
EZH2	9	all	7	148516688	148516779	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
EZH2	10	all	7	148514969	148515209	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
EZH2	11	all	7	148514314	148514483	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
EZH2	12	all	7	148513776	148513870	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
EZH2	13	all	7	148512598	148512638	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
EZH2	14	all	7	148512006	148512131	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
EZH2	15	all	7	148511051	148511229	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
EZH2	16	all	7	148508717	148508812	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
EZH2	17	all	7	148507425	148507506	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
EZH2	18	all	7	148506402	148506482	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis

<i>EZH2</i>	19	all	7	148506163	148506247	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>EZH2</i>	20	all	7	148504737	148504798	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>SF3B1</i>	14	all	2	198267280	198267550	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>SF3B1</i>	15	all	2	198266709	198266854	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>SRSF2</i>	1	95	17	74732958	74732960	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>U2AF1</i>	2	34	21	44524455	44524457	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>U2AF1</i>	6	157	21	44514776	44514778	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>CALR</i>	9	all	19	13054527	13054728	Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>JAK2</i>	12	537-546	9	5070020	5070049	Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>JAK2</i>	14	617	9	5073770	5073772	Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>MPL</i>	10	all	1	43814934	43815031	Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis

3.2. Aperçu des conclusions cliniques

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

3.2.1. NGS-2023-4

<p>Aanwezigheid van pathogene DNMT3A variant geassocieerd met MDS (8%), de novo AML (15-26%) en MPN (5-10%) als pre-JAK2 event.</p> <p>Aanwezigheid van pathogene FLT3 ITD variant geassocieerd met AML (22-37%), indien zonder NPM1 variant geassocieerd met slechtere prognose.</p> <p>Aanwezigheid van significant klinisch belangrijke 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 WT1 variant geassocieerd met AML (14%) en MDS en een slechtere prognose (King-Underwood L. et al., Blood, 1998, Volume 91, Issue 8, p 2961-2968).</p>	1
<p>Met next generation sequencing werden 4 varianten gevonden in DNMT3A, FLT3 (FLT3-ITD), NPM1 en WT1.</p> <p>Volgens de WHO en ICC 2022 kan deze AML geklasseerd worden als AML met gemuteerd NPM1 (Khoury et al., Leukemia 2022; Arber et al. Blood 2022).</p> <p>De aanwezigheid van FLT3-ITD in dit type AML is geassocieerd met een eerder ongunstige prognose (risk stratification intermediate volgens Döhner et al., Blood 2022).</p> <p>De combinatie van mutaties in DNMT3A, NPM1 en FLT3-ITD is geassocieerd met een bijzonder laag overleving (Papaemmanuil et al NEJM 2016).</p> <p>Mutaties in WT1 zijn beschreven in AML en zijn ook geassocieerd met een ongunstige prognose (WHO 2017).</p>	2
<p>Varianten in NPM1 zijn een vaak voorkomende genetische afwijking in AML waarbij ze voorkomen in ongeveer 1/3 van de patiënten. De aanwezigheid van een NPM1 variant resulteert in de classificatie "AML met NPM1 mutatie" volgens WHO 2022 . In deze entiteit wordt over het algemeen een goede respons op inductietherapie gezien. De prognose is evenwel afhankelijk van het gelijktijdig aanwezig zijn van overige mutaties zoals FLT3-ITD zoals in deze casus, waarbij deze laatste de prognose negatief beïnvloedt. De aanwezigheid van een FLT3 variant rechtvaardigt therapie met FLT3-inhibitoren.</p> <p>Varianten in DNMT3A zijn vaak voorkomend bij AML (ongeveer 20-25% van de gevallen), waarbij ze geassocieerd zijn met een verminderde prognose. Varianten in DNMT3A komen evenwel ook voor in een normale oudere populatie.</p> <p>Naast de reeds gekende overexpressie van het WT1 gen in AML, zijn er eveneens somatische varianten beschreven in 6-15% van de de novo AML patiënten. Varianten in het WT1 gen komen vaak voor in combinatie met FLT3-ITD varianten en zijn geassocieerd met een verminderde overleving en resistentie aan inductie chemotherapie.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Arber et al. Blood 2022;140:1200-1228 2. Khoury et al. Leukemia 2022;36:1703-1719 3. Duncavage et al. Blood 2022; 140(21):2228–2247 4. Döhner et al. Blood 2005;106:3740-6 5. Falini et al. N Engl J Med 2005;352:254-66 6. Thiede et al. Blood 2006;107:4011-20 7. Daver et al. Leukemia 2019;33:299-312 8. Döhner et al. Blood 2017;129:424-47 9. Rampal et al. Haematologica 2016;101:672-9 	3
<p>De gevonden varianten in de genen WT1, FLT3-ITD, DNMT3A en NPM1 (type A) zijn recurrent in de context van AML. De aanwezigheid van een FLT3-ITD variant wordt geassocieerd met een intermediaire prognose volgens ELN richtlijnen. (Döhner et al. Blood 2022; 140(12):1345-1377)</p>	4

<p>Concluse: Er worden 3 pathogene varianten gevonden in de genen FLT3, DNMT3A en NPM1 en 1 vermoedelijke pathogene variant in het WT1 gen. De gevonden varianten zijn recurrent in de context van AML. Het mutationeel profiel is compatibel met de diagnose van AML.</p> <p>Cytogenetische bevindingen spelen een belangrijke rol in classificatie van risico categorie (prognose).</p> <p>De gedetecteerde variant (ITD) in FLT3 (in juxtamembrane domain) wordt geassocieerd met een intermediaire prognose volgens de 2022 ELN richtlijnen (indien geen aanwezigheid van 'adverse risk' cytogenetica), onafhankelijk van de allelische ratio of gelijktijdige aanwezigheid van een NPM1 variant. De aanwezigheid van FLT3-ITD in AML is geassocieerd met een sensitiviteit voor de FLT3 tyrosine kinase inhibitoren (zoals midostaurine en gilteritinib).</p> <p>De prognostische betekenis van WT varianten bij AML moet nog verder uitgeklaard worden. Volgens Pan et al. wordt de aanwezigheid van WT1 varianten in de groep van AML met intermediaire prognose geassocieerd met een minder gunstige prognose (onafhankelijke risicofactor voor (post-transplantatie) herhal).</p> <p>De subgroep van AML met gelijktijdige aanwezigheid van NPM1, FLT3-ITD en DNMT3A varianten ("triple-mutated" AML) werd geassocieerd met een zeer ongunstige prognose (resistentie aan FLT3 inhibitor AC220 (quizartinib), verhoogde gevoeligheid aan ibrutinub) (Swerdlow et al, WHO 2017; Bezerra et al. Blood 2020), maar deze conclusie vergt meer onderzoek.</p> <p>Varianten in NPM1 en overexpressie van WT1 kunnen als MRD merker gebruikt worden.</p> <p>(ref. Swerdlow et al. Döhner et al. Blood 2022, 129:1136-1152; Stone et al. NEJM 2017; Perl et al. NEJM 2019; Pan et al. Blood 2022 140: 3216-3217; Onate et al. Blood 2022 8;6(3):882-890; Bezerra et al. Blood 2020 (135)11:870-875)</p>	5
<p>Sur les 41 gènes séquencés, seuls les 12 gènes cibles suivants ont été interprétés dans le cadre d'une Leucémie aigüe myéloblastique (AML): ASXL1, CEBPa, DNMT3A, FLT3, IDH1, IDH2, KIT, NPM1, RUNX1, TET2, TP53, WT1. Les variants sont classés biologiquement selon le principe de classification recommandé par Sciensano et Belac.</p> <p>Pour la description de chaque mutation se référer au tableau des résultats ci-joint.</p> <p>-Présence dans le gène NPM1 du variant pathogénique c.860_863dup p.(Trp288Cysfs*12) mutation de type A (la plus fréquente ~72%). Dans le cadre des AML, les mutations dans le gène NPM1, au niveau de l'exon 11 codon 288, sont d'intérêt diagnostic et pronostic (rapporté par le Compermed ?Diag1 et Prog 1). Pour info : Les mutations dans le gène NPM1 ne confèrent un pronostic favorable que pour les AML à caryotype normal et FLT3- ITD négatif (Dohner, Blood 2022, PMID: 35797463).</p> <p>Présence dans l'oncogène IDH1 du variant pathogénique c.395G>A p.(Arg132His). L'impact pronostic de cette mutation n'est pas clairement décrit. Pour information, les mutations dans IDH1 peuvent faire l'objet d'une thérapie ciblée (Ivosidenib) (FDA; NCCN AML.V2.2022) (Intérêt pronostic et thérapeutique rapporté par le Compermed Prog2A, Ther2B).</p> <p>-Présence dans l'oncogène FLT3 d'un variant pathogénique de type ITD c.1757_1780dup p.(Asp593_Phe594ins8) : "insertion in frame" , située dans l'exon 14. Les variants FLT3-ITD sont observés dans 25% des AML (NCCN AML v2 2022). Pour info : Les cas FLT3-ITD avec NPM1 muté ou non muté, sans autre mutation à pronostic défavorable sont classifiés en pronostic intermédiaire. Les patients FLT3 muté peuvent bénéficier d'une thérapeutique ciblée (NCCN AML v2 2022) (Intérêt thérapeutique rapporté par le Compermed T1).</p> <p>Présence dans le gène suppresseur de tumeur DNMT3A du variant pathogénique c.2644C>T p.(Arg882Cys). Les mutations dans DNMT3A dont les variants R882 sont les plus fréquents, sont observées dans 18% à 22% des AML (rapporté par le Compermed ?Diag 2A et Prog2A) (NCCN AML v2 2022). L'impact pronostique n'est pas clairement défini, il est dépendant du type de variant DNMT3A (non-R882 ou R882), de l'âge du patient, du caryotype et des associations avec d'autres mutations (NPM1, FLT3 ITD).</p> <p>Présence dans le gène suppresseur de tumeur WT1 d'une mutation missense c.1399C>T p.(Arg467Trp) décrite dans la littérature dans un contexte de pathologie héréditaire (Denys-Drash syndrome, Wilms tumor, Meacham syndrom, and diffuse mesangial sclerosis). Cette mutation est classifiée en VUS selon le principe de classification recommandé par Sciensano et Belac dans le cadre onco somatique. Cependant ce variant est classifié comme pathogénique selon la classification ACMG (PMID:23715653, PMID:1327525, PMID:1338906, PMID:17853480, PMID:9529364, PMID:1655284, PMID:29320783, PMID:11278460, PMID:9590178). Cette mutation pourrait être d'origine héréditaire.</p>	6

<p>Pour info : Si des investigations complémentaires sont nécessaires pour confirmer ou infirmer la présence germinale d'une mutation, elles doivent être réalisées sur un prélèvement non envahi. Il est important d'effectuer les tests génétiques sur des cellules contenant de l'ADN germinale indemne de contamination par des cellules malignes comme par exemple une biopsie de peau, des follicules capillaires ou des coupures d'ongles (les prélèvements médullaires et sanguins ainsi que les frottis buccaux sont à éviter en cas d'hémopathies myéloïdes et/ou de formes leucémiques d'hémopathies lymphoïdes), (Dupriez ; Louvain Médical 2018).</p> <p>-Présence dans le gène FLT3 d'un variant c.2600T>C p.(Ile867Thr)de signification biologique et donc clinique indéterminée.</p>	
<p>Presence of NPM1, WT1, DNMT3A variants as well as an internal tandem duplication of FLT3 (FLT3(ITD))</p> <p>NPM1 variants are most frequent molecular events in acute myeloid leukemia (AML). They are usual associated with a favorable prognosis; however in the presence of an association of FLT3(ITD) and DNMT3A variant negate the supposed positive impact of the NPM1 mutation.* This negative effect is further enhanced by the presence of an additional WT1 variant.**</p> <p>To note, FLT3(ITD) can be targeted by specific inhibitors (Midostaurin).</p> <p>IN CONCLUSION, this patient presents an AML of poor prognosis which could benefit from targeted FLT3 inhibitors.</p> <p>*Unified classification and risk-stratification in Acute Myeloid Leukemia. Yanis Tazi et al. Nat Commun. 2022</p>	7
<p>Varianten in de genen FLT3, NPM1 (type A), DNMT3A en WT1 zijn recurrent in de context van AML. De combinatie van een variant in NPM1 en een FLT3-ITD variant wordt geassocieerd met een intermediaire prognose volgens ELN richtlijnen (Ref: Döhner et al., Blood 2022; 140:1345-1377). Door de aanwezigheid van een FLT3-ITD variant kan een "doelgerichte" therapie gebruikt worden.</p>	8
<p>Volgens de ELN 2022 classificatie heeft deze patiënt een intermediaire prognose (FLT3-ITD en NPM1 comutatie)(PMID: 35797463; tabel 6)</p> <p>Er werd een DNMT3A (NM_175629.2(DNMT3A):c.2644C>T (p.(Arg882Cys)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 23. Er werd een NPM1 (NM_002520.6(NPM1):c.860_863dup (p.(Trp288Cysfs*12)) pathogene frameshift variant geïdentificeerd in exon 11. Er werd een FLT3 (NM_004119.2(FLT3):c.1757_1780dup (p.(Asp593_Phe594insTyrAsnGluTyrPheTyrValAsp)) pathogene in-frame variant geïdentificeerd in exon 14. Er werd een WT1 (NM_024426.4(WT1):c.1384C>T (p.(Arg462Trp)) vermoedelijk pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 9. De aanwezigheid van dit type varianten in AML heeft significant klinisch belang (tier I). Het samen voorkomen van een NPM1 en een FLT3-ITD leidt tot intermediaire prognose in AML. FLT3-ITD is bovendien geassocieerd met verhoogde gevoeligheid aan FLT3 tyrosine kinase inhibitoren zoals gilteritinib en midostaurine (FDA approved, PMID: 30651634 , 28644114, 31700594, 31665578).</p> <p>Er werden geen andere (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in de onderzochte genen ASXL1, CEBPA, DNMT3A, FLT3, IDH1, IDH2, KIT, NPM1, RUNX1, TET2, TP53, WT1.</p>	9
<p>FLT3-ITD en NPM1 mutaties komen voor bij respectievelijk 25% en 30% van de AML patienten. Volgens ICC2022 (PMID: 35767897) en WHO2022 (PMID: 35732831) classificatie behoort deze AML tot het type "AML met NPM1 mutatie". Volgens de ELN 2022 aanbeveling behoort AML met NPM1 en FLT3-ITD, onafhankelijk van de allelische ratio en zonder aanwezigheid van andere hoog risico cytogenetische afwijkingen, tot de prognostisch intermediaire groep (PMID: 35797463). Gerichte therapie ovv FLT3 inhibitie is mogelijk.</p> <p>DNMT3A mutaties komen voor bij ongeveer 20% van de AML patiënten. Ook bij gezonde oudere personen worden mutaties van het DNMT3A gen waargenomen (Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential CHIP: 10% op de leeftijd van 80j). Mutaties in dit gen zijn prognostisch ongunstig en kunnen in zeldzame gevallen aangeboren zijn (genetisch consult aangewezen). (PMID 29321554, 26660431, 35767897)</p> <p>Aanwezigheid van DNMT3A, NPM1 én FLT3-ITD mutatie zou een unieke AML subset vormen, prognostisch heel ongunstig volgens sommige studies. Intensieve therapie is wenselijk voor curatie. (PMID: 34376373, 31977039, 34376373, 25281355)</p> <p>WT1 mutaties komen voor bij ongeveer 10% van de AML patiënten, en meer frequent bij jongere personen. WT1 mutaties komen frequent samen voor met FLT3 varianten. Mutaties komen meest frequent voor in exon 7 en 9, die coderen voor het DNA bindend zinc finger domein van het eiwit. Het WT1 gen speelt een rol in dezelfde epigenetische pathway als TET2 en IDH1/2. Mutaties in deze genen zijn mutueel exclusief. De aanwezigheid van WT1 mutatie is geassocieerd met een slechte</p>	10

<p>prognose, die nog meer uitgesproken is bij FLT3 co-mutatie, en resistentie aan chemotherapie. (PMID: 31467532, 32188030, 34700049)</p>	
<p>Er werden drie pathogene varianten met een significant klinisch belang (Tier I) geïdentificeerd: DNMT3A c.2644C>T p.(Arg882Cys), NPM1 c.860_863dup p.(Trp288Cysfs*12) en een FLT3 interne tandem duplicatie (FLT3-ITD; FLT3 c.1757_1780dup p.(Asp593_Phe594insTyrAsnGluTyrPheTyrValAsp)). Daarnaast werd een vermoedelijk pathogene variant met een mogelijk klinisch belang (Tier II) geïdentificeerd: WT1 c.1399C>T p.(Arg467Trp).</p> <p>De aanwezigheid van een NPM1 mutatie definieert een aparte diagnostische entiteit in de WHO-classificatie van acute myeloïde leukemie (i.e., AML met NPM1 mutatie) [1], evenals in de ICC-classificatie van AML (i.e., AML met gemuteerd NPM1) [2, 3]. NPM1 varianten komen voor in 28-35 % en FLT3-ITD varianten in 25-30 % van de gevallen van AML [4]. De combinatie van een NPM1 mutatie met een FLT3-ITD heeft een prognostische waarde en doet deze patiënt in een groep met intermediair risico vallen (te correleren met de cytogenetische bevindingen: classificatie onder voorbehoud van afwezigheid van prognostisch ongunstige cytogenetische afwijkingen) [4]. Daarnaast is de detectie van een FLT3-ITD relevant voor de behandelingskeuze, aangezien de aanwezigheid van een FLT3-ITD geassocieerd is met gevoeligheid voor FLT3 inhibitoren [4].</p> <p>Mutaties in DNMT3A worden in AML aangetroffen met een frequentie van 18-22 % [4]. Over de prognostische betekenis van DNMT3A mutaties in AML bestaan er tegenstrijdige data [4], maar specifiek voor mutaties t.h.v. aminozuur Arg882 is er evidentie van associatie met een slechtere prognose [5, 6]. Ook is er beperkte evidentie dat het gecombineerd voorkomen van een DNMT3A p.Arg882 mutatie met een NPM1 mutatie en een FLT3-ITD geassocieerd is met een slechtere prognose in vergelijking met AML patiënten die in slechts één of twee van deze drie genen een mutatie hebben [6, 7].</p> <p>Mutaties in WT1 komen voor in 6-15 % van de gevallen van AML [8] en zouden geassocieerd kunnen zijn met een minder goede prognose [9-12], al zijn er ook studies die geen prognostische impact weerhouden [13].</p> <p>Referenties: 1. PMID 35732831 2. PMID 35767897 3. PMID 36264379 4. NCCN guidelines: acute myeloid leukemia, version 3.2023 5. PMID 27149454 6. PMID 36610002 7. PMID 25281355 8. PMID 27252512 9. PMID 18559874 10. PMID 18591546 11. PMID 19536888 12. PMID 20368469 13. PMID 19221039</p>	11
<p>NGS toont aanwezigheid aan van varianten in de genen DNMT3A, FLT3, NPM1 en WT1:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) De gekende, consensus pathogene missens variant Arg882Cys in het DNMT3A gen (VAF 50%) 2) Een consensus pathogene, typische interne tandem duplicatie (ITD) in het FLT3 gen (VAF 29%) 3) De gekende consensus pathogene variant p.(Trp288Cysfs*12) in het NPM1 gen (VAF 45%): de variant is een subtype A 4bp insertie variant. 4) Een vermoedelijk pathogene missens variant (Arg467Trp) in het WT1 gen (VAF 90%): De hoge VAF is suggestief voor (cn)LOH. <p>Er konden geen varianten met VAF >5% teruggevonden worden in de andere bij AML klinisch belangrijke genen (ASXL1, CEBPA, IDH1/2, KIT, RUNX1, TET2 en TP53 (opmerking: grote insertie/deletie varianten zoals bij FLT3 of CEBPA kunnen gemist worden, voor FLT3 en CEBPA zie daarom ook resultaten fragment analyse)</p> <p>Besluit: AML met gemuteerde NPM1 is een afzonderlijke WHO (Khoury et al. Leukemia 2022) alsook 2022-ICC entiteit (Arber et al., Blood 2022).</p> <p>Gezien de concomitante FLT3-ITD, behoort deze AML met gemuteerd NPM1 tot de intermediaire risico groep in de 2022 ELN guideline (Döhner et al., Blood 2022) op voorwaarde dat er geen</p>	12

<p>ongunstige cytogenetische afwijkingen (te correleren met karyotype).</p> <p>Therapeutisch relevante varianten: gezien de FLT3-ITD mutatie komt de patiënt in principe in aanmerking voor behandeling met Type I kinase inhibitor midostaurin, in combinatie met chemotherapie (EMA, FDA) waarbij een betere algemene overleving wordt verwacht (Stone et al., NEJM, 2017). FLT3-ITD varianten zijn ook gevoelig aan Type II kinase inhibitoren zoals quizartinib (zie review Antar et al., Leukemia 2020).</p>	
<p>Er werden drie pathogene varianten geïdentificeerd met een significant klinisch belang in de context van AML (Tier I): NPM1 c.860_863dup p.(Trp288Cysfs*12), DNMT3A c.2644C>T p.(Arg882Cys) en een FLT3 interne tandem duplicatie (FLT3-ITD) c.1757_1780dup p.(Asp593_Phe594insTyrAsnGluTyrPheTyrValAsp). Daarnaast werd een vermoedelijk pathogene variant met mogelijk klinisch belang geïdentificeerd: WT1 c.1399C>T p.(Arg467Trp).</p> <p>De aanwezigheid van een NPM1 mutatie definieert een aparte diagnostische entiteit in de WHO-classificatie van AML [1]. NPM1 varianten komen voor in 28-35 % van de gevallen van AML en zijn geassocieerd met een gunstige prognose [2]. Wanneer een NPM1 mutatie samen voorkomt met een FLT3-ITD mutatie, komt de patiënt in de "intermediate risk" categorie terecht [2]. FLT3-ITD mutaties komen voor in 30 % van de gevallen van AML. De aanwezigheid van een FLT3-ITD mutatie is geassocieerd met verhoogde gevoeligheid voor FLT3 inhibitoren [2].</p> <p>Mutaties in DNMT3A worden in AML aangetroffen met een frequentie van 18-22% [2]. Over de prognostische betekenis van DNMT3A mutaties in AML bestaan er tegenstrijdige data [2], maar specifiek voor mutaties t.h.v. aminozuur Arg882 is er evidentie van associatie met een ongunstige prognose [3]. Binnen AML met gemuteerd NPM1 is er een ongunstige prognose in combinatie met een DNMT3A p.Arg882 mutatie [4, 5]. Tevens te correleren met cytogenetisch onderzoek.</p> <p>Mutaties in WT1 zijn eveneens recurrent in AML en zouden geassocieerd kunnen zijn met een minder goede prognose [6], al zijn er ook studies die geen prognostische impact weerhouden [7, 8].</p> <p>[1] PMID 35732831 [2] NCCN guidelines: acute myeloid leukemia, version 3.2023 [3] PMID 27149454 [4] PMID 25281355 [5] PMID 29079128 [6] https://www.compermed.be/nl/workflows/acute-myeloid-leukemia [7] PMID 2725251 [8] PMID 19221039</p>	13
<p>NPM1 hotspot variant gedetecteerd. NPM1-gemuteerd AML betreft een aparte entiteit in de WHO classificatie.</p> <p>(Vermoedelijk) pathogene mutaties in DNMT3A en WT1 gedetecteerd. Mutatieprofiel indicatief voor de novo AML (Lindsley et al. Blood 2015) (Hsin-An Hou et al. Bood 2010).</p> <p>(Vermoedelijk) pathogene FLT3 mutatie gedetecteerd. FLT3 (hotspot)mutatie indicatief voor de novo AML en voor behandeling met de multikinase inhibitor gilteritinib of midostaurin in combinatie met chemotherapie (Levis et al. Blood 2017) (Perl et al. NEJM 2019) (Stone et al. NEJM 2017) (Lindsley et al. Blood 2015) (Hsin-An Hou et al. Bood 2010).</p> <p>Geassocieerde therapeutische opties Afwijking Medicatie Gevoelig / Resistent OncoKB Level FLT3 p. (Asp593_Phe594insTyrAsnGluTyrPheTyrValAsp) Gilteritinib Gevoelig 1 FLT3 p. (Asp593_Phe594insTyrAsnGluTyrPheTyrValAsp) Midostaurin + High Dose Chemotherapy Gevoelig 1 NPM1 p.(Trp288Cysfs*12) SNDX-5613 (Menin inhibitor) Gevoelig 3</p>	14
<p>Er worden vier varianten gedetecteerd, in WT1, DNMT3A, NPM1 en FLT3, die passen bij de diagnose van AML.</p> <p>WT1 mutaties zijn gecorreleerd met een slechtere RR en OS in vergelijking met patiënten zonder WT1 mutatie (Arber et al., Blood 2016). Ze worden frequent gedetecteerd in combinatie met een FLT3-ITD, zoals ook in dit staal. Bij patiënten in de RATIFY trial had de aanwezigheid van een additionele WT1 mutatie een negatieve impact op de prognose. Een additionele NPM1 mutatie heeft echter wel nog steeds een gunstige invloed op de OS en lijkt dus het effect van de WT1 mutaties teniet te doen (Jahn et al., Leukemia 2022).</p> <p>De associatie NPM1mut/DNMT3Amut/FLT3-ITD komt in 6% van de AML gevallen voor. De impact van een bijkomende mutatie in DNMT3A op de prognose in de NPM1mut/FLT3-ITD blijkt controversieel. In de recente studie van Onate et al., Blood Adv 2022, weliswaar met beperkt aantal patiënten, bleef de OS van de NPM1mut/FLT3-ITDlow groep vergelijkbaar met de NPM1mut/FLT3-WT AML groep, ongeacht de DNMT3A status! Wel werd aangetoond dat de patiënten met een gemuteerde NPM1 en bijkomend een DNMT3A mutatie, een hoger niveau aan gemuteerde NPM1 transcripten na inductie en 1e consolidatie (MRD) hebben, ongeacht de FLT3-ITD allelic ratio.</p>	15

<p>Er was echter geen duidelijke impact op de OS bij patiënten met een FLT3-ITDlow maar er werden echter meer alloSCT uitgevoerd, waardoor dit een gunstige impact kan hebben op de finale prognose. Hier werd echter ook nog geen gebruik gemaakt van FLT3i, die ook een impact kunnen hebben op de prognose.</p> <p>De impact van de combinatie DNMT3A / NPM1 / FLT3-ITD op de prognose in de tijd van FLT3i en alloSCT is dus nog niet volledig duidelijk. AML patiënten met NPM1mut/DNMT3Amut/FLT3low kunnen op heden in de favorable risk groep worden geklasseerd met een nauwlettende MRD follow-up om snel moleculair herhal op te sporen!</p>	
<p>Les LMA avec mutations FLT3-ITD et NPM1 sont classées en risque favorable ou intermédiaire, pronostic non influencé par la mutation DNMT3A. Par contre, la mutation WT1 dans l'exon 9 est de mauvais pronostic dans la catégorie des LMA de risque intermédiaire.</p>	16
<p>Diagnostic: AML avec mutation NPM1c+ (ICD-O: 9877/3); Pronostic: intermédiaire selon l'ELN 2022 (NPM1c+ FLT3-ITD-); Prédiction: indication EMA/FDA pour inhibiteur de TK (Midostaurine; gilterinib)</p> <p>A l'heure actuelle l'impact pronostic des mutations acquises du gène DNMT3A, la p.(Arg882Cys) en particulier, demeure sujet à controverse (NCCN Guidelines, AML, v2.2022). Il en va de même pour les variants somatiques du gène WT1. Pour cette raison, l'ELN n'a pas retenu ces deux gènes dans ses critères de catégorisation du risque (ELN 2022).</p> <p>Plus de détails sur l'impact diagnostic et/ou pronostic des variants de ce gènes sont disponibles sous : https://www.compermed.be/en/workflows/acute-myeloid-leukemia</p>	17
<p>Met NGS werd een NPM1 mutatie gedetecteerd passend bij de diagnose van een AML met NPM1 mutatie.</p> <p>Daarnaast ook de detectie van een FLT3 ITD mutatie. Dit resultaat is prognostisch ongunstig en predictief voor goede respons op FLT3-inhibitie therapie.</p> <p>Verder ook nog detectie van mutaties in DNMT3A en WT1 wat mogelijks een negatief effect heeft op de prognose.</p>	18
<p>Varianten in NPM1, FLT3, DNMT3A en WT1 zijn recurrent bij AML. Aanwezigheid van pathogene hotspotmutaties c.860_863dup in NPM1, c.2644C>T in DNMT3A, en c.1757_1780dup in FLT3.</p> <p>NPM1-gemuteerde AML presenteert zich vaak met een normaal karyotype (te correleren met cytogenetisch onderzoek!).</p> <p>FLT3 ITD (internal tandem duplication) mutaties, zoals de gedetecteerde pathogene variant c.1757_1780dup, worden vaak teruggevonden bij NPM1-gemuteerde AML. Indien klinisch geïndiceerd, kan de patiënt in aanmerking komen voor doelgerichte therapie met FLT3-inhibitoren (gilteritinib).</p> <p>De aanwezigheid van pathogene varianten in zowel NPM1, FLT3, én DNMT3A wordt geassocieerd met een uiterst slechte prognose (slechte overleving en hoge kans op herhal).</p> <p>De klinische/prognostische betekenis van de gevonden variant c.1384C>T in WT1 is tot op heden nog niet gekend, maar over het algemeen worden WT1 mutaties bij een normaal karyotype als prognostisch ongunstig beschouwd.</p> <p>Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.</p>	19

3.2.2. NGS-2023-5

<p>Aanwezigheid van pathogene FLT3 ITD variant geassocieerd met AML (22-37%), indien zonder NPM1 variant geassocieerd met slechtere prognose. Aanwezigheid van pathogene U2AF1 variant, geassocieerd met MDS (5%) en secundaire AML.</p>	1
<p>Met next generation sequencing werden 2 varianten gevonden in FLT3 (FLT3-ITD) en U2AF1. Mutaties in U2AF1 en FLT3 zijn beschreven in MDS en zijn geassocieerd met een ongunstige prognose (Bernard et al., NEJM 2022; Greenberg et al., JNCCN 2013). Als meer dan 10% blast, kan volgens de WHO en ICC 2022 deze MDS geklasseerd worden als MDS/AML met myelodysplasia-related gene mutation (Khoury et al., Leukemia 2022; Arber et al. Blood 2022).</p>	2
<p>Varianten in U2AF1 zijn frequent voorkomend bij MDS, waarbij ze beschreven zijn in ongeveer 10% van de patiënten. Ze worden geassocieerd met afwijkingen van karyotype, lager thrombocytenaantal en een slechtere prognose in vergelijking met U2AF1 wildtype patiënten. De aanwezigheid van varianten in o.a. U2AF1 geeft aanleiding tot klassificatie in de entiteit "MDS/AML met myelodysplasie-gerelateerde gen mutaties" volgens International Consensus Classification 2022.</p> <p>Varianten in FLT3 komen in een minderheid van de patiënten met MDS voor (<1%). Hierbij ziet men vaak een associatie met een hoger blastenaantal bij presentatie en snellere evolutie naar AML. Bovendien blijken ze ook in MDS prognostisch ongunstig.</p> <p>Referenties: 1. Arber et al. Blood 2022;140:1200-1228 2. Khoury et al. Leukemia 2022;36:1703-1719 3. Bernard et al. NEJM Evid 2022; 1(7):1-14 4. Bejar et al. Haematologica 2014;99:956-64 5. Daver et al. Am. J. Hematol. 2013;88:56-9</p>	3
<p>Varianten in de genen FLT3 en U2AF1 zijn recurrent in de context van MDS. Het gen U2AF1 is opgenomen in de IPSS-M (Bernard et al. NEJM Evidence 2022;1(7)).</p>	4
<p>Conclusie: Er worden 2 pathogene varianten gevonden in de genen FLT3 en U2AF1. Varianten in U2AF1 zijn zeer recurrent in de context van MDS en worden geassocieerd met een ongunstige prognose. Varianten (ITD) in FLT3 zijn minder frequent aanwezig in de context van MDS, zijn geassocieerd met een ongunstige prognose en een verhoogd risico op leukemische evolutie.</p> <p>Beide genen zijn vervat in het prognostische model voor MDS: IPSS-M.</p> <p>Therapie: indicatie voor gevoeligheid aan FLT3 tyrosine kinase inhibitoren (zoals midostaurine en gilteritinib) (in geval van 'high risk' MDS)</p> <p>(Bernard et al. NEJM 2022;1(7); Swaminathan et al. EJHaem 2023 4(1):165-173; Li et al. J Int Med Res 2020 48(3), Kennedy and Ebert. J clin Oncol 2017 35:968-974).</p>	5
<p>Sur les 41 gènes séquencés, les 17 gènes cibles suivants ont été interprétés dans le cadre d'un MDS EB2 (avec excès de blastes) : ASXL1, BCOR, CEBPA, DNMT3A, EZH2, FLT3, IDH1, IDH2, KIT, NPM1, RUNX1, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF1, WT1. *Les variants sont classés biologiquement selon le principe de classification recommandé par Sciensano et Belac. Pour la description de chaque mutation se référer au tableau des résultats ci-joint.</p> <p>-Présence dans l'oncogène U2AF1 du variant pathogénique c.101C>T, p.(Ser34Phe) . Les mutations dans U2AF1 sont d'intérêt diagnostique et pronostic dans la cadre des MDS avec excès de blastes. Elles sont observées avec une incidence de ~8- 10% et associées à un pronostic défavorable (NCCN MDS v1.2023) (rapporté par le Compermed Diag 1, Prog).</p> <p>-Présence dans l'oncogène FLT3 d'un variant probablement pathogénique c.485G>C, p.(Tyr597_Glu598insGlyPheAspPheArgGluTyr): "insertion in frame", située dans l'exon 14 d'intérêt. Les mutations dans FLT3 au niveau de l'exon 14 sont d'intérêt pronostic et thérapeutique dans la cadre des MDS avec excès de blastes (rapporté par le Compermed). Elles sont associées à un pronostic défavorable (NCCN MDS v1-2023).</p> <p>-Présence dans le gène suppresseur de tumeur RUNX1 d'une mutation « missense » c.485G>C, p.(Arg162Thr) : Cette mutation est classifiée en VUS selon le principe de classification recommandé par Sciensano et Belac dans le cadre onco somatique. Cependant ce variant est décrit comme pathogénique dans plusieurs articles (PMID:12217689, PMID:11327761, PMID:22201794, PMID:12807882, PMID:11276260, PMID:17290219, PMID:31640815). RUNX1 fait partie des gènes de prédisposition héréditaire aux hémopathies</p>	6

<p>malignes, une investigation de son éventuel rôle dans le cadre onco germinal est souhaitable.</p> <p>-Présence dans le gène DNMT3A c.1969G>A, p.(Val657Met) : d'un variant de signification biologique et donc clinique indéterminée.</p>	
<p>Presence of RUNX1, U2AF1 as well as an internal tandem duplication of FLT3 (FLT3(ITD))</p> <p>U2AF1 variants are present in 8-12% of Myelodysplastic Syndromes (MDS) and are associated with a poor prognosis and an increased risk of transformation toward Acute Myeloid Leukemia.*/** RUNX1 variants are present in 10-15% of MDS and are also associated with a poor prognosis and an increased risk of relapse following stem-cell transplant.*/** FLT3(ITD) are rare (<5%) in MDS but are assumed to carry a pejorative impact on prognosis and an increased risk of transformation toward Acute Myeloid Leukemia **</p> <p>IN CONCLUSION the profile of this patient is compatible with a MDS of poor prognosis. This profile can be evaluated through the IPSS-M Risk Calculator***</p> <p>*NCCN Guidelines Version 1.2023, Myelodysplastic Syndromes **Molecular International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes, Elsa Bernard, et al. NEJM Evidence 2022 *** https://mds-risk-model.com/</p>	7
<p>Variante in de genen FLT3 (type ITD) en U2AF1 zijn recurrent in de context van MDS. De aanwezigheid van een FLT3 variant wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (IPSS-M). Het U2AF1 gen is opgenomen in de IPSS-M (main effect) (Ref: Bernard et al, NEJM Evidence 2022) en in ELN richtlijnen. Volgens ICC 2022 en ELN 2022 passend bij de entiteit MDS/AML with myelodysplasia-related gene mutations (Ref: Arber et al., Blood 2022; 140:1200-1228 en Döhner et al., Blood 2022; 140:1345-1377). Door de aanwezigheid van een variant in het RUNX1 gen in >50% van de allelen, kan een constitutionele origine niet uitgesloten worden.</p>	8
<p>Er werd een FLT3 (NM_004119.2(FLT3):c.1792_1793insGGTTTGATTTTCAGAGAATATG (p.(Tyr597_Glu598insGlyPheAspPheArgGluTyr)) pathogene in-frame variant geïdentificeerd in exon 14. De aanwezigheid van dit type FLT3-ITD variant in MDS heeft significant klinisch belang (tier I) aangezien deze geassocieerd zijn met ongunstige prognose en hogere kans op transformatie naar AML (PMID: 21173125; NCCN guidelines MDS V1.2023).</p> <p>Er werd een U2AF1 (NM_006758.2(U2AF1):c.101C>T (p.(Ser34Phe)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 2. De aanwezigheid van deze specifieke variant bij MDS is van significant klinisch belang (tier I) vermits deze mogelijks is geassocieerd met een slechtere prognose en een hoger risico voor snelle transformatie naar AML (NCCN guidelines v1 2023, PMID: 22158538, 31754743). Bovendien leidt deze mogelijks tot een verlaagde response naar lenalidomide (PMID: 30152885).</p> <p>Er werden geen andere (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in de onderzochte genen ASXL1, CEBPA, DNMT3A, EZH2, FLT3, IDH1, IDH2, KIT, NPM1, RUNX1, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF1.</p> <p>Daarnaast werden ook 2 varianten met ongekende biologische en klinische betekenis geïdentificeerd, cfr tabel.</p>	9
<p>FLT3 mutaties worden zeer zeldzaam (<1-2%) waargenomen bij MDS, incl. MDS-EB2 (WHO2016)/ MDS-IB2 (WHO2022)/ MDS/AML (ICC2022). De aanwezigheid van FLT3-ITD bij MDS is geassocieerd met een snelle evolutie naar AML. Aangezien FLT3-ITD mutaties frequent voorkomen bij AML (ongeveer 25% van de patiënten) is re-evaluatie van de diagnose en strikte follow-up aanbevolen. Gerichte therapie o/v FLT3 inhibitie is mogelijk. (PMID: 23115106, 34540199)</p> <p>U2AF1 splicing factor mutaties komen frequent voor bij MDS (10-15%) en vnl bij hoog-risico MDS. U2AF1 mutaties zijn sterk gerelateerd aan de ontwikkeling van hematologische maligniteiten met uitgesproken MDS componenten en zijn hierbij dus van diagnostisch belang. U2AF1 mutaties zijn geassocieerd zijn met dysplastische kenmerken in de drie hematologische cellijnen en een slechtere prognose. (PMID: 30691686, 30670442, 33117717, 31124956)</p>	10

<p>Er werden twee pathogene varianten met een significant klinisch belang (Tier I) geïdentificeerd: U2AF1 c.101C>T p.(Ser34Phe) en een FLT3 interne tandem duplicatie (FLT3-ITD; FLT3 c.1792_1793insGGTTTGATTCAGAGAATATG p.(Tyr597_Glu598insGlyPheAspPheArgGluTyr)).</p> <p>Mutaties in U2AF1 en FLT3 komen voor in resp. 8-12 % en 1-6 % van de gevallen van myelodysplastisch syndroom (MDS) en zijn geassocieerd met een ongunstige prognose [1-3].</p> <p>Net zoals bij acute myeloïde leukemie is er ook in hoog-risico MDS evidentie dat de aanwezigheid van een FLT3-ITD geassocieerd is met gevoeligheid voor FLT3 inhibitoren [4, 5].</p> <p>De detectie van een U2AF1 mutatie heeft tevens een betekenis voor de diagnostische subclassificatie van deze patiënt. Indien de opgegeven diagnose “MDS-EB2” gebaseerd is op een percentage blasten groter dan of gelijk aan 10 %, dan doet volgens de ICC-classificatie de aanwezigheid van een U2AF1 mutatie de patiënt immers vallen in de categorie “MDS/AML met myelodysplasie-gerelateerde genmutaties” [6, 7].</p> <p>Daarnaast werden twee varianten van onduidelijke betekenis (VUS) gedetecteerd: DNMT3A c.1969G>A p.(Val657Met) en RUNX1 c.485G>C p.(Arg162Thr). Aan deze varianten kunnen momenteel geen klinische implicaties gekoppeld worden (Tier III: ongekende klinische betekenis).</p> <p>Referenties: 1. NCCN guidelines: myelodysplastic syndromes, version 1.2023 2. PMID 35092883 3. https://evidence.nejm.org/doi/10.1056/EVIDoa2200008 4. PMID 34551341 5. PMID 36819163 6. PMID 35767897 7. PMID 36264379</p>	11
<p>NGS toont aanwezigheid aan van varianten in de genen DNMT3A, FLT3, RUNX1 en U2AF1:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Een consensus pathogene, in-frame insertie variant (ITD-like) in het FLT3 gen (VAF 42%) 2) De gekende, consensus pathogene missens variant Ser34Phe in het U2AF1 gen (VAF 47%) 3) Een vermoedelijk pathogene missens variant (Arg162Thr) in het RUNX1 gen (82% VAF): De hoge VAF is suggestief voor (cn)LOH. Opmerking: de variant werd slechts één maal gerapporteerd in COSMIC en één maal in cBioPortal, maar wel meerdere keren in de studie van Kohlmann et al. (Leukemia 2014) alsook in de functionele studie van Bera et al. (J of Hematology & Oncology). 4) Een missens variant-met-onbekende-betekenis in het DNMT3A gen (44% VAF): het effect van de variant op de eiwit functie is niet duidelijk waardoor er ook geen evaluatie kan gemaakt worden i.v.m. de klinische impact van deze variant. Opmerking: de variant komt in een heel laag percentage voor in de bevolking (<0,1%). Gezien de VAF (rond 50%) kan er niet uitgesloten worden dat deze variant een weinig voorkomend aangeboren polymorfisme is. <p>Er konden geen varianten met VAF >5% teruggevonden worden in de andere bij MDS-EB2 klinisch belangrijke genen (ASXL1, CEBPA, EZH2, IDH1/2, KIT, NPM1, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53 en WT1 (opmerking: grote insertie-/deletie varianten zoals bij FLT3 of CEBPA worden gemist, voor FLT3 en CEBPA zie daarom ook resultaten fragment analyse).</p> <p>Besluit: NGS profiel overeenkomend met aanwezigheid van MDS-IB2 (WHO). Indien geen AML-definiërende afwijkingen aanwezig zijn ook passend bij ‘MDS/AML with myelodysplasia-related gene mutations’ (ICC 2022).</p> <p>In MDS zijn varianten in FLT3, RUNX1 en U2AF1 geassocieerd met een ongunstige prognose (NCCN guideline v 1.2023 en IPSS-M (Bernard et al., NEJM 2022)).</p> <p>In AML zorgt aanwezigheid van een FLT3-ITD variant voor classificatie in de intermediaire risico groep (ELN 2022). Echter, door de aanwezigheid van de U2AF1 en RUNX1 variant en onder voorbehoud van afwezigheid van gunstige genetische merkers, wordt het risico verhoogd naar de ongunstige groep.</p> <p>Therapeutisch relevante mutatie: in AML is de FLT3-ITD mutatie is actionable met Type I kinase inhibitor midostaurin, in combinatie met chemotherapie. FLT3-ITD varianten zijn ook gevoelig aan Type II kinase inhibitoren zoals quizartinib (zie review Antar et al., Leukemia 2020). Midostaurin is EMA/FDA-goedgekeurd enkel voor AML. Indien de MDS-IB2 in casu wordt beschouwd als MDS/AML conform ICC2022, kan midostaurin in dit geval een optie zijn.</p> <p>RUNX1 varianten kunnen ook voorkomen als aangeboren varianten met predispositie voor de ontwikkeling van hematologische maligniteiten tot gevolg. Verder genetisch onderzoek en counseling van familieleden is mogelijk aangewezen.</p>	12

<p>Er werden twee pathogene varianten geïdentificeerd met significant klinisch belang (Tier I): U2AF1 c.101C>T p.(Ser34Phe) en een FLT3 interne tandem duplicatie (FLT3-ITD) c.1792_1793insGGTTTGATTCAGAGAATATG p.(Tyr597_Glu598insGlyPheAspPheArgGluTyr).</p> <p>Mutaties in U2AF1 komen voor in 8-12% van de gevallen van MDS en zijn geassocieerd met een ongunstige prognose [1]. Mutaties in FLT3 zijn in MDS tevens geassocieerd met een ongunstige prognose [1]. De aanwezigheid van een FLT3-ITD mutatie is geassocieerd met verhoogde gevoeligheid voor FLT3 inhibitoren [2, 3].</p> <p>[1] NCCN guidelines: myelodysplastic syndromes, version 1.2023. [2] PMID: 35732831 [3] PMID: 35767897</p>	13
<p>(Vermoedelijk) pathogene U2AF1 variant gedetecteerd. U2AF1 mutatie als dysplastische merker.</p> <p>FLT3-ITD (21bp) gedetecteerd. Indicatief voor behandeling met de multikinase inhibitor gilteritinib of midostaurin in combinatie met chemotherapie bij AML (Levis et al. Blood 2017) (Perl et al. NEJM 2019) (Stone et al. NEJM 2017).</p>	14
<p>Er worden drie klinisch relevante varianten gedetecteerd, in RUNX1, U2AF1 en FLT3, die passen bij de diagnose van MDS-EB2.</p> <p>Er wordt een vermoedelijk pathogene mutatie in RUNX1 gedetecteerd aan een hoge frequentie. Dit kan wijzen op de aanwezigheid van een aangeboren mutatie. RUNX1 mutaties die in de germline aanwezig zijn, zijn geassocieerd met familial platelet disorder with predisposition to myeloid malignancies (FPDMM). Bij deze families komen het vaakst MDS en AML voor, maar bij 25% van de families worden ook lymfoïde aandoeningen gerapporteerd, meestal T-ALL maar ook verschillende types NHL zoals DLBCL, CLL, SLL, HCL en lymfosarcoom (Brown et al., Sem Hem 2017). Deze analyse kan geen onderscheid maken tussen een verworven of aangeboren mutatie. Genetisch consult kan overwogen worden indien relevant. Somatische mutaties in RUNX1 komen voor bij 10-15% van de patiënten met MDS en zijn gecorreleerd met een slechte prognose (NCCN MDS guidelines 1.2020) en een sterke thrombopenie (Pine et al., Leuk Lymph 2020), ongeacht de IPSS-R klasse.</p> <p>Mutaties in U2AF1 komen voor bij 8-12% van de patiënten met MDS en zijn volgens de NCCN 1.2020 MDS guidelines gecorreleerd met een slechte prognose. Er moet echter een onderscheid gemaakt worden tussen mutaties in S34 (zoals hier gedetecteerd) of in Q157, waarbij vooral voor deze laatste een negatieve impact op prognose aangetoond is. Additioneel blijkt ook de VAF waaraan de mutatie aanwezig is een impact te spelen op de prognose, waarbij enkel VAF > 40% gecorreleerd is met een slechte prognose (Wang et al., Sci Rep 2020). Gezien de S34 variant is de impact op prognose dus niet zo duidelijk.</p> <p>FLT3 mutaties zijn zeldzaam in MDS maar zijn geassocieerd met een ongunstige prognose (NCCN MDS guidelines 1.2020). Mutaties in FLT3 zijn bij patiënten > 40 jaar die geen TP53 mutatie hebben en een SCT krijgen, geassocieerd met een kortere OS gezien een hoger risico op herval (Lindsley et al., NEJM 2017). Dit effect wordt niet gezien indien een myeloablatieve conditioning gebruikt wordt voor de SCT. FLT3-ITD mutaties kunnen eventueel aanleiding geven tot doelgerichte behandeling met FLT3i.</p>	15
<p>Les mutations de DNMT3A, RUNX1 et U2AF1 dans les MDS sont associées à un pronostic et une progression de la maladie défavorable. La mutation FLT3-ITD pourrait être la cible d'une thérapie ciblée (comme dans le cadre d'une LMA).</p>	16
<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, plus rarement dans les LMMC. La prévalence est de 20-30% dans les SMD, d'U2AF1 dans 8-12% des cas. On considère les porteurs à risque plus élevé de transformation leucémique et de survie globale réduite (Patel et al, SOHO 2017; NCCN Guidelines MDS v2.2017 Greenberg et al. Jan 2017).</p> <p>Les mutations missense d'U2AF2 (codons S34, Q157) sont associées à un caractère de mauvais pronostic dans les (MDS) (categorise 2A).</p> <p>La prévalence des mutations de RUNX1 dans les SMD est de 10-15%. On note une association avec un caractère de mauvais pronostic (Patel et al., Clinical Lymphoma, Myeloma & leukemia July 2017; NCCN Guidelines version 2,2019). Une association avec le phénotype de SMD-MLD-EB est fréquemment relevée (Cazzola et al., Blood 2013).</p> <p>Présence d'une mutation de type "insertion" dans l'exon 14 du gène FLT3. Cette mutation ne correspond pas tout à fait aux ITD est rencontrée dans 15-20 % des LMA, indépendamment du type FAB et plus rarement décrite des stades avancés de SMD (AREB). Néanmoins, le cadre de lecture de la protéine étant respecté, le variant devrait répondre à un traitement ciblé via inhibiteurs de tyrosine kinase de type : Midostaurine/Sorafenib/Quizartinib. L'indication de la Midostaurin.</p>	17

<p>La prévalence des mutations de DNMT3A est comprise entre 12-18% des MDS (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology MDS version 2:2017).</p> <p>Les mutations peuvent être de type non sens, frameshift ou affecter les sites d'épissages. Les mutations faux sens affectent en général le codon R882. Votre patient présente un variant récurrent rare décrit sous la référence COSMIC (COSM6984137).</p> <p>Sur base du logigramme d'annotation ComPerMed celui-ci doit être considéré comme un variant de signification indéterminée ("VUS").</p> <p>Le groupe de travail international sur le pronostic des SMD a identifié six gènes de mauvais risque en termes d'OS (TP53; CBL; EZH2; RUNX1; U2AF1 et ASXL1)(Ball et. Al 2022).</p>	
<p>Met NGS werd een U2AF1 mutatie gedetecteerd, wat past bij de diagnose van een MDS en prognostisch eerder ongunstig zou zijn.</p> <p>Er werd ook een FLT3 ITD mutatie gedetecteerd. Dit resultaat is prognostisch ongunstig en zou predictief kunnen zijn voor goede respons op FLT3-inhibitie therapie. (cfr. lopende klinische studies; reeds standard-of-care voor AML).</p> <p>Mutatieprofiel mogelijks geassocieerd met snelle transformatie naar AML. DD: MDS-EB2 - AML.</p>	18
<p>Varianten in het gen U2AF1 zijn recurrent in de context van MDS. De prognostische betekenis van de hotspotmutatie c.101C>T (p.(Ser34Phe)) in U2AF1 in de context van MDS is momenteel nog onduidelijk (Swerdlow et al. WHO 2017).</p> <p>Daarnaast aanwezigheid van de variant c.1792_1793ins21 (p.(Tyr597_Glu598insGlyPheAspPheArgGluTyr)) in FLT3. Varianten in FLT3 komen minder frequent voor in MDS-EB en zijn geassocieerd met een snelle progressie naar AML en een ongunstige prognose. In AML komen FLT3-ITD varianten in aanmerking voor behandeling met FLT3 inhibitoren. De klinische bruikbaarheid van deze inhibitoren in MDS is echter niet gekend.</p> <p>De klinische en biologische betekenis van de gevonden varianten c.485G>C in RUNX1 en c.1969G>A in DNMT3A is tot op heden niet gekend (VUS, Variants of Unknown Significance).</p> <p>Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.</p>	19

3.2.3. NGS-2023-6

<p>Aanwezigheid van pathogene IDH2 R140 variant, geassocieerd met AML (15-20%) en goede prognose. Aanwezigheid van een pathogene SRSF2 variant: frequentie 15-20% bij primaire myelofibroze, associatie met slechte prognose.</p>	1
<p>Met next generation sequencing werden varianten gevonden in IDH2 en SRSF2. Er werd geen mutaties gevonden in JAK2, CALR en MPL. Echter PMF kunnen ook triple negatieve zijn. SRSF2 en IDH2 mutaties zijn "High Risk mutations" (HRM) in PMF (Tefferi et al., JCO 2018).</p> <p>NB: Er werd ook varainten gevonden in FLT3 (FLT3-ITD) en RUNX1. De mutatie profiel past hier niet volledig met de diagnose van PMF (geen mutaties gevonden in JAK2, CALR en MPL, en mutaties in SRSF2, FLT3 en RUNX1 zullen beter passen in het kader van MDS; MDS/MPN). Te correleren met pathologie, cytologie en flow cytometrie voor definitief diagnose.</p>	2
<p>Er worden geen klinisch relevante varianten teruggevonden in de driver genen JAK2, CALR, noch MPL. Er worden wel varianten aangetroffen in genen die belangrijk zijn bij myeloïde aandoeningen en aldus de clonale basis van de ziekte aantonen, waaronder SRSF2 en IDH2.</p> <p>SRSF2 varianten komen in mindere mate voor bij de entiteit PMF. Ze zijn geassocieerd met een minder gunstige prognose. Varianten in IDH2 zijn in de literatuur beschreven voor te komen bij PMF, zij het in beperkte mate. Hun aanwezigheid blijkt een negatieve impact te hebben op de prognose.</p> <p>Referenties: 1. Arber et al. Blood 2022;140:1200-1228 2. Barbui et al. Blood Cancer J 2015;5:e337</p>	3
<p>De gevonden varianten in IDH2 en SRSF2 zijn recurrent in de context van primaire myelofibroze en zijn geassocieerd met een minder gunstige prognose (Tefferi et al. Am J Hematol. 2021;96:145–162).</p>	4
<p>Conclusie: Er wordt geen 'driver' variant gevonden in de onderzochte exonen van de genen JAK2, CALR en MPL. Er worden 2 pathogene varianten gedetecteerd in de genen IDH2 en SRSF2. De aanwezigheid van een variant in de genen SRSF2 en IDH2 geldt als een majeur criterium voor de diagnose van primaire myelofibroze (PMF). Varianten in SRSF2 en IDH2 zijn recurrent in de context van myeloïde aandoeningen, maar komen minder frequent voor in de context van myeloproliferatieve neoplasieën (MPN). Binnen MPN komen deze varianten meer frequent voor bij PMF en zijn geassocieerd met een ongunstigere prognose.</p> <p>Prognose: Triple negatieve (JAK2/CALR/MPL-wild type) PMF zijn geassocieerd met een minder gunstige prognose.</p> <p>Geïntegreerde prognostische modellen voor PMF: MIPSS70+ en GIPSS risicoscores: MIPSS70+: - Varianten in SRSF2 en IDH2 worden als 'high molecular risk' (HMR) varianten beschouwd en de aanwezigheid van 2 of meer HMR varianten: 3 punten. Afwzigheid van CALR type 1 variant (1 punt). GIPSS: - Aanwezigheid van SRSF2 variant (1 punt). - Afwezigheid van CALR type 1 variant (1 punt).</p> <p>Therapie: Indicatie voor gevoeligheid aan IDH2 inhibitoren (in geval van leukemische transformatie (post-MPN AML))</p> <p>(ref. Khoury et al. Leukemia (2022) 36:1703-1719; Grinfeld et al. NEJM (2018) 379(15):1416-1430; Swerdlow et al. WHO 2017; Bartels et al. Leukemia (2019) 34(5):1364-1372; Patel et al. Blood, 2015;126(6):790-7; Tefferi A et al. Leukemia (2018);32(7):1631; Tefferi. AJH 2021;96:145-162)</p>	5
<p>Sur les 41 gènes séquencés, seuls les 12 gènes cibles suivants ont été interprétés dans le cadre d'une MPN : ASXL1, CALR, EZH2, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF1.</p> <p>Les variants sont classés biologiquement selon le principe de classification recommandé par Sciensano et Belac.</p> <p>Pour la description de chaque mutation se référer au tableau des résultats ci-joint.</p> <p>-Présence dans l'oncogène SRSF2 du variant pathogénique c.284C>T, p.(Pro95Leu). Les mutations dans SRSF2, au niveau de l'exon 1 codon 95, sont d'intérêt diagnostique et pronostique dans les</p>	6

<p>MPN (rapporté par le COMPERMED Diag1 et Prog1). Elles sont associées à un pronostic défavorable en terme de survie globale (NCCN MPN v3.2022).</p> <p>-Présence dans l'oncogène IDH2 du variant pathogénique c.419G>A, p.(Arg140Gln). Les mutations dans IDH2 au niveau de l'exon 4 (hotspot) sont d'intérêt diagnostique, pronostique et thérapeutique dans les MPN (validé par le COMPERMED Diag1, Prog1 et Ther 2B). Elles sont associées à un pronostic défavorable en terme de survie globale et de transformation leucémique. Également associées à une résistance au PEG-interferon alfa-2a (NCCN MPN v3.2022).</p>	
<p>Presence of SRSF2 and IDH2 variants. Absence of JAK2, CALR or MPL variants.</p> <p>SRSF2 variants are present in 15-20% of Primary Myelofibrosis (PMF) and are associated with poor prognosis (High Risk mutation according to the MIPSS70+ v2 Score*) IDH2 variants are rare in PMF (>5%) and are also associated with poor prognosis (High Risk mutation according to the MIPSS70+ Score*)</p> <p>The absence of JAK2/CALR/MPL mutations is described in +-10% of PMF and is considered to be of poorer prognosis than PMF carrying JAK2/CALR/MPL variants (although only the absence of CALR type 1 mutation is included in the MIPSS70+ v2 Score*)</p> <p>IN CONCLUSION the profile of this patient is compatible with a PMF of poor prognosis. This profile can be evaluated through the MIPSS70+ v2 Score.**</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 **http://www.mipss70score.it</p>	7
<p>Variante in de genen SRSF2 en IDH2 zijn recurrent in de context van myeloïde aandoeningen, waaronder MPN, type myelofibrose. Afwezigheid van "driver" varianten in JAK2, CALR en MPL. In de context van myelofibrose worden varianten in IDH2 en SRSF2 geassocieerd met een hoog moleculair risico profiel (Ref: Tefferi et al., Blood 2014. 124(16):2507-2513; Shammo and Stein, 2016 ASH Educ. Program: 552-560). GIPSS score voor de varianten: 2 (Ref: Tefferi et al., Leukemia (2018) 32:1631-1642). De aanwezigheid van de IDH2-variant kan gebruikt worden ikv "doelgerichte" therapie.</p>	8
<p>Er werd een IDH2 (NM_002168.3(IDH2):c.419G>A (p.(Arg140Gln))) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 4. Er werd een SRSF2 (NM_003016.4(SRSF2):c.284C>T (p.(Pro95Leu))) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 1. De aanwezigheid van deze varianten in PMF hebben significant klinisch belang (tier I) aangezien deze geassocieerd zijn met een ongunstige prognose (NCCN guidelines v2 2023; PMID: 30275952; PMID: 23619563).</p> <p>Er werden geen andere (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in de onderzochte genen ASXL1, CALR, EZH2, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF1.</p>	9
<p>IDH1/2 genen zijn belangrijk bij het proces van DNA methylatie. Mutaties in IDH1/2 komen voor bij ongeveer 4% van de PMF, worden beschouwd als één van de non-driver mutaties in MPN en zijn geassocieerd met een ongunstige prognose en leukemische evolutie. Bij blastenfase van MPN worden IDH mutaties waargenomen in ongeveer 20% van de patiënten. (PMID: 22968464, 23619563, 33197049)</p> <p>SRSF2 is een component van het RNA spliceosoom, waarbij disfunctie van dit gen defecten in alternative splicing veroorzaken. Mutaties in het SFRS2 gen komen voor bij ongeveer 15-20% van de PMF, worden beschouwd als één van de non-driver mutaties in MPN en zijn geassocieerd met een ongunstige prognose. (PMID: 33197049, 29296803, 32573691)</p> <p>Mutaties in het IDH2 en SRSF2 gen worden tevens mee in rekening gebracht als prognostisch ongunstige factor bij de berekening van GIPSS (enkel SRSF2)/MIPS70/MIPS70+v2 risico score. (PMID 29226763)</p>	10

<p>Er werden twee pathogene varianten met een significant klinisch belang (Tier I) geïdentificeerd: IDH2 c.419G>A p.(Arg140Gln) en SRSF2 c.284C>T p.(Pro95Leu).</p> <p>Zowel IDH2 mutaties als SRSF2 mutaties zijn recurrent in primaire myelofibrose (PMF). De aanwezigheid van deze mutaties wijst op een klonale hematopoëse en vormt een majeur WHO-criterium voor de diagnose van PMF [1]. Het voorkomen van deze mutaties is in PMF geassocieerd met een minder gunstige prognose (associatie van IDH2 mutaties met een verminderde leukemievrije overleving evenals met een verminderde progressievrije overleving na hematopoëtische stamceltransplantatie; associatie van SRSF2 mutaties met een verminderde leukemievrije overleving en een verminderde globale overleving) [2]. Er is evidentie dat het simultaan voorkomen van beide mutaties een additief ongunstig prognostisch effect heeft (lagere overleving in vergelijking met PMF patiënten die slechts één van beide mutaties hebben) [3]. De identificatie van deze mutaties kan eventueel een argument zijn in het beslissingsproces om al dan niet tot een allogene stamceltransplantatie over te gaan [2, 4]. De aanwezigheid van een IDH2 mutatie is geassocieerd met gevoeligheid voor IDH2 inhibitoren: dit is geen standaardtherapie voor PMF, maar kan eventueel relevant zijn in de context van een klinische studie of een “compassionate use” programma [2, 5, 6].</p> <p>Referenties: 1. PMID 35732831 2. NCCN guidelines: myeloproliferative neoplasms, version 1.2023 3. PMID 24549259 4. PMID 28389256 5. PMID 32358888 6. https://clinicaltrials.gov/search?term=NCT04281498</p>	11
<p>NGS toont aanwezigheid aan van varianten in de genen IDH2 en SRSF2:</p> <p>1) De gekende, consensus pathogene missens variant Arg140Gln in het IDH2 gen (VAF 48%) 2) De gekende, consensus pathogene missens variant Pro95Leu in het SRSF2 gen (VAF 30%)</p> <p>Er konden geen varianten met VAF >5% teruggevonden worden in de andere bij PMF klinisch belangrijke genen (ASXL1, CALR, EZH2, IDH1, JAK2, MPL, SF3B1, TET2, TP53 en U2AF1 (opmerking: grote insertie/deletie varianten kunnen gemist worden.)</p> <p>Besluit: Bij deze patiënt met PMF werden geen typische JAK2/CALR/MPL varianten teruggevonden. Ongeveer 10-15% van de PMF patiënten zijn triple-negatief voor de meest voorkomende JAK2/CALR/MPL varianten (Tefferi and Barbui, Am J Hematology 2017 en Klampfl et al., NEJM 2013). Bij deze triple-negatieve patiënten worden soms in deze genen non-canonical varianten teruggevonden (Grinfeld et al. NEJM 2018). Deze laatste worden niet allemaal opgepikt met dit NGS panel.</p> <p>Anderzijds werden een IDH2 en SRSF2 variant teruggevonden. Varianten in deze genen zijn een ‘Major’ diagnostisch criterium voor PMF (WHO en ICC 2022) en zijn ‘High-Molecular-Risk’ varianten in verschillende prognostische PMF modellen (Guglielmelli et al., JCO 2018; Tefferi et al., JCO 2018 en Tefferi et al., Leukemia 2018).</p> <p>Therapeutisch relevante mutaties: IDH2 inhibitor enasidenib in combinatie met ruxolitinib worden momenteel onderzocht bij chronic phase PMF (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04281498) maar interim resultaten werden nog niet bekend gemaakt.</p>	12
<p>Er werden twee pathogene varianten met significant klinisch belang geïdentificeerd (Tier I): IDH2 c.419G>A p.(Arg140Gln) en SRSF2 c.284C>T p.(Pro95Leu). De aanwezigheid van deze varianten wijst op een klonale hematopoëse.</p> <p>Varianten in IDH2 en SRSF2 zijn recurrent in primaire myelofibrose en worden gezien als “high-molecular risk” (HMR) mutaties. Mutaties in deze genen in PMF zijn predictief voor een leukemische transformatie en zijn geassocieerd met een verminderde globale overleving en verminderde leukemievrije overleving. [1] De IDH2-inhibitor enasidenib wordt momenteel uitvoerig getest in IDH2-gemuteerde MPN [2].</p> <p>[1] NCCN guidelines myeloproliferative neoplasms, version 1.2023. [2] ClinicalTrials.gov: NCT04603001, NCT01915498, NCT04092179</p>	13
<p>Klinisch-relevante wildtype genen: JAK2, CALR, MPL.</p> <p>Pathogene mutatie gedetecteerd in IDH2 en SRSF2. In JAK2/CALR/MPL triple negatieve PMF patienten worden IDH2 mutaties beschreven als merker voor PMF. (Rumi et al., Int J Mol Scie 2020 The Genetic Basis of Primary Myelofibrosis and Its Clinical Relevance). Mutatieprofiel indicatief voor eerder ongunstig klinisch verloop en snellere leukemische progressie (Lasho et al., blood 2012. SRSF2 mutations in primary myelofibrosis: significant clustering with IDH2 mutations and independent association with inferior overall and leukemia-free survival)</p>	14

(Vannucchi et al., Leukemia 2013. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis) Klinisch te correleren.	
Er worden twee varianten gedetecteerd, in IDH2 en SRSF2, die passen bij de diagnose van PMF. Er wordt geen mutatie in een van de drie klassieke driver genen (JAK2, MPL of CALR) gedetecteerd in dit staal, wat kan passen bij een triple-negative myelofibroze. Deze vertonen een intermediaire prognose (Rozovski et al., Haematologica 2017) IDH2 mutaties komen niet zo frequent voor bij myelofibroze (<5%), maar zijn wel gecorreleerd met een slechtere prognose (Tefferi, Am J Hematol 2020). SRSF2 mutaties komen frequent voor bij myelofibroze (17%) en zijn ook gecorreleerd met een slechte prognose (Tefferi, Am J Hematol 2020).	15
La mutation du gène IDH2 permet l'approche d'un traitement ciblé. Par contre, la mutation du gène SRSF2, souvent associée avec une mutation des gènes IDH1/2, est de pronostic défavorable.	16
Les deux mutations identifiées sont considérées de mauvais risque ("HRM"), selon Vannuchi et al., Leukemia 2013). Ces mutations sont à prendre en compte dans le calcul des risques pronostiques selon le modèle MIPSS70/MIPSS70+v2.0 ou GIPSS.	17
Met NGS werd een IDH2 mutatie gedetecteerd. Dit resultaat zou predictief kunnen zijn voor goede respons op IDH-inhibitie therapie (cfr. lopende klinische studies). Daarnaast werd ook een SRSF2 mutatie gedetecteerd. Deze klonale markers zouden de diagnose van een PMF kunnen bevestigen. Te correleren met het morfologisch onderzoek (eg. fibrose op botboor?). Er werd geen JAK2, MPL of CALR mutatie gedetecteerd, suggestief voor triple-negatieve vorm van PMF. Prognostisch eerder ongunstig mutatieprofiel.	18
Er werden GEEN varianten gedetecteerd in de genen CALR, MPL, of JAK2. Het betreft dus een triple-negatieve PMF, wat geassocieerd wordt met een minder gunstige prognose. Wél aanwezigheid van pathogene hotspotmutaties in de genen IDH2 en SRSF2. Deze mutaties zijn recurrent bij myeloproliferatieve neoplasmata (MPNs), waaronder PMF. SRSF2 en IDH2 mutaties worden frequent samen teruggevonden (co-occurrence). De aanwezigheid van de hotspotmutaties c.284C>T in SRSF2 en c.419G>A in IDH2 wordt geassocieerd met een slechte prognose (hoog risico op leukemische transformatie en slechte overall survival). Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.	19

3.3. 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:

2. Votre résultat (R)
3. La médiane (MAF):
la valeur centrale des résultats fournis par tous les laboratoires, toutes méthodes confondues.
4. L'écart-type global (SD):
mesure de la dispersion des résultats fournis par tous les laboratoires et toutes méthodes confondues.
- 1) 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 **IZI > 3**.
- 2) 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 brochures qui sont disponibles sur notre site web à l'adresse suivante:

<https://www.sciensano.be/fr/evaluation-externe-de-la-qualite/sante-clinique-eeq-biologie-clinique>

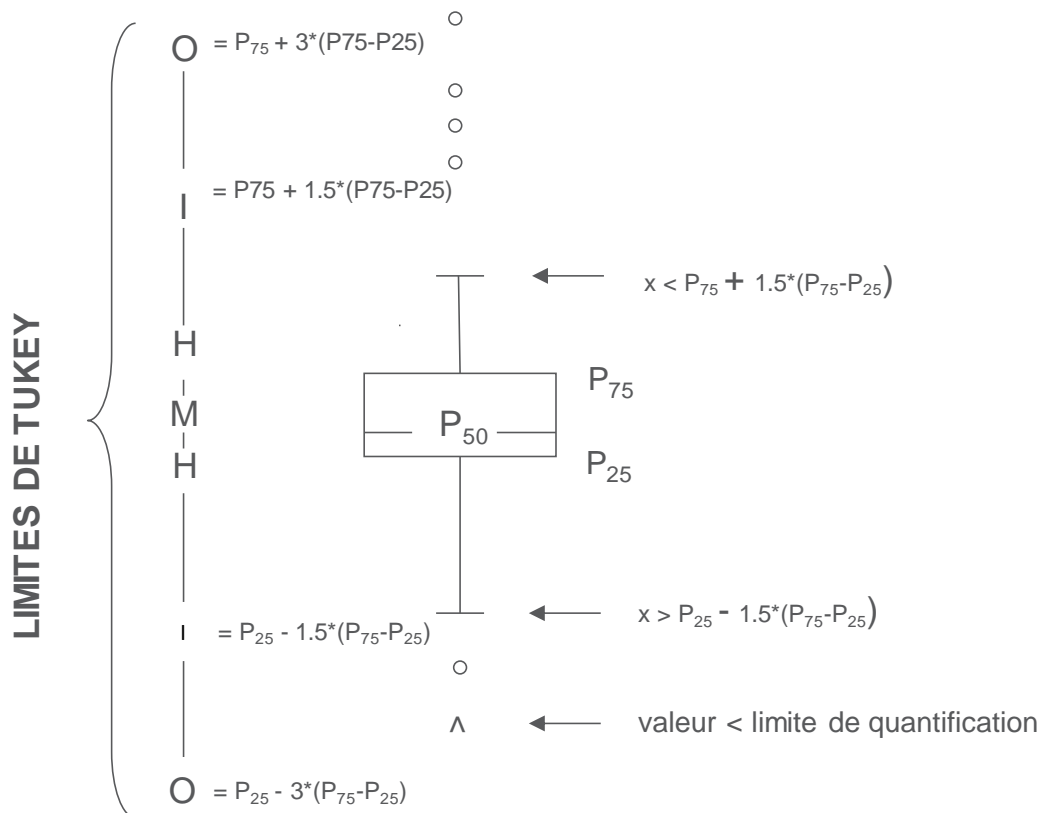
- Brochure d'information générale EEQ
- Méthodes statistiques appliquées à l'EEQ
- Traitement des valeurs censurées

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 2023.

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.