

**BIOLOGISCHE GEZONDHEIDSRISICO'S
KWALITEIT VAN LABORATORIA**

AD HOC EXPERTENCOMITE

**DEFINITIEF GLOBAAL RAPPORT
Next Generation Sequencing (NGS)**

Hematologische maligniteiten DNA

2022/2

Verbeterde versie

Sciensano/NGS EKE/12-NL-VV2

Biologische gezondheidsrisico's
Kwaliteit van laboratoria
J. Wytsmanstraat, 14
1050 Brussel | België

www.sciensano.be

AD HOC EXPERTENCOMITE

Sciensano				
Secretariaat		TEL:	02/642.55.22	FAX: 02/642.56.45
Aline Antoniou	Enquêtecoördinator	TEL:	02/642.55.27	
		e-mail:	Aline.Antoniou@sciensano.be	
Vanessa Ghislain	Vervanger enquêtecoördinator	TEL:	02/642.52.08	
		e-mail:	Vanessa.Ghislain@sciensano.be	
Experten	Instelling			
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			

De voorlopige versies van dit rapport werden voorgelegd aan de experten op: 28/09/2022, 19/10/2022, 07/11/2022.

Dit rapport werd besproken in de vergadering van het *ad hoc* expertencomité van: 17/10/2022.

Verantwoordelijkheden:

Het *ad hoc* expertencomité werd voor advies geraadpleegd over de inhoud van het globaal rapport, de interpretatie van de resultaten, de evaluatiecriteria en de organisatie van de volgende evaluaties. De verantwoordelijkheid voor de selectie van de gebruikte stalen en het definitieve ontwerp van de studie wordt door de dienst Kwaliteit van laboratoria van Sciensano genomen.

De wijzigingen aangebracht in het verbeterde rapport zijn in blauw weergegeven.

p25-29: Analyse van regio's van de NGS overeenkomst die niet door de panels worden gedekt; Bijlage: Regio's van de NGS overeenkomst geanalyseerd.

Na de wijzigingen in het script voor het genereren van niet gecoverde regio's in december 2022, die leidden tot een eerste erratum, zijn er twee fouten in de resultaten geslopen. Ten eerste omvatten de rapporten alleen regio's met een lage maar niet-nul coverage, waardoor regio's zonder gealigneerde reads werden uitgesloten. Daarnaast waren de genomische coördinaten die werden gebruikt om de te bestrijken regio's in het TERT-gen te definiëren onjuist. Deze fouten zijn gecorrigeerd in 2023 en we maken van deze gelegenheid gebruik om de resultaten van EQA-2022-2, die zorgvuldig met de hand zijn gecontroleerd, bij te werken.

Dit rapport vervangt de vorige versie van het globaal rapport (verbeterde versie) van 09/12/2022.

Autorisatie van het rapport:

Door Aline Antoniou, enquêtecoördinator van de NGS

Publicatiedatum : 13/11/2023

Alle rapporten zijn tevens te raadplegen op onze website:
<https://www.sciensano.be/nl/kwaliteit-van-laboratoria>

INHOUDSTAFEL

1. INLEIDING.....	5
1.1. Doel van de EKE – hematologische maligniteiten.....	5
1.2. Uitbestede activiteit	5
1.3. Materiaal	5
1.4. Vraag	5
1.5. Evaluatiecriteria	7
2. RESULTATEN.....	8
2.1. Deelname	8
2.2. Overzicht van de methoden.....	8
2.3. Overzicht van de resultaten.....	12
2.3.1. NGS-2022-4	12
2.3.2. NGS-2022-5	15
2.3.3. NGS-2022-6	19
2.3.4. Slaagpercentage van de deelnemers.....	24
2.3.5. Analyse van regio's van de NGS overeenkomst die niet door de panels worden gedekt	25
3. BIJLAGE	26
3.1. Regio's van de NGS overeenkomst geanalyseerd	26
3.2. Overzicht van de klinische conclusies	30
3.2.1. NGS-2022-4	30
3.2.2. NGS-2022-5	34
3.2.3. NGS-2022-6	38
3.3. Interpretatie van het individueel rapport	43

1. INLEIDING

De organisatie van EKE maakt deel uit van het nationale proefproject voor de invoering van de NGS-technologie in onze gezondheidszorg, dat begon in januari 2016. Alle informatie over het NGS-proefproject is te vinden in het NGS Roadbook:

https://www.compermed.be/docs/Roadbook%20PersMed%20NGS%20NL_0.pdf

1.1. Doel van de EKE – hematologische maligniteiten

Deze EKE heeft als doel de stand van zaken na te gaan betreffende de wijze waarop somatische varianten in de hematologische maligniteiten worden gedetecteerd, geselecteerd en gerapporteerd in het patiënten rapport.

1.2. Uitbestede activiteit

De genomische DNA-stalen werden geproduceerd door de firma SeraCare en werden verdeeld door de firma Sopachem.

1.3. Materiaal

Het materiaal voor deze studie bestond uit:

- 3 tubes genomisch DNA (Volume: 12µl, Concentratie: ongeveer 35 ng/µl), afkomstig van 3 verschillende stalen met de volgende referentie: NGS-2022-4, NGS-2022-5 en NGS-2022-6.

De stalen werden voor de homogeniteit en de stabiliteit door de leverancier gevalideerd.

1.4. Vraag

De stalen moesten geanalyseerd worden volgens de in het laboratorium geldende procedures voor de volgende maligniteiten:

NGS-2022-4: Acute myeloïde leukemie (AML)

NGS-2022-5: Myelodysplastisch syndroom (MDS)

NGS-2022-6: Primaire myelofibrose (PMF)

Voor elk staal werd er gevraagd om alle varianten die volgens de geldende procedures van het laboratorium zouden worden gerapporteerd in het klinisch rapport van de patiënt, door te geven, maar enkel voor die regio's die zijn beschreven in de NGS overeenkomst en volgens de ComPerMed workflows (dus niet de andere eventueel geïdentificeerde varianten) :

<https://www.inami.fgov.be/nl/professionals/verzorgingsinstellingen/laboratoria/Paginas/oncologie-terugbetaling-moleculair-biologische-ngs.aspx>

<https://www.compermed.be/nl/workflows#/>

Er werd gevraagd om de varianten die identiek aanwezig zijn in de 3 stalen NIET te rapporteren, zoals bijvoorbeeld de variant *DNMT3A*; NM_175629.2; c.2732G>A; p.(Cys911Tyr). Dit zijn varianten gerelateerd aan de genetische background van de cellijn, die wordt gebruikt om de stalen te produceren, en worden niet geëvalueerd.

staal	tumor	genen
NGS-2022-4	AML	<i>ASXL1</i> (exon 13 = laatste exon) <i>CEBPA</i> (exon 1 = volledig) <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 = volledig) <i>TET2</i> (exon 3, exon 9-11) <i>TP53</i> (exon 2-11) <i>WT1</i> (exon 7, exon 9)
NGS-2022-5	MDS	<i>ASXL1</i> (exon 13 = laatste exon) <i>DNMT3A</i> (exon 8-23) <i>EZH2</i> (exon 2-20 = volledig) <i>RUNX1</i> (exon 2-9 = volledig) <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)
NGS-2022-6	PMF	<i>ASXL1</i> (exon 13 = laatste exon) <i>CALR</i> (exon 9) <i>EZH2</i> (exon 2-20 = volledig) <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)

Er werd ook gevraagd om de aanbevelingen van ComPerMed en van MolecularDiagnostics.be over de interpretatie van varianten en de inhoud van klinische rapporten van NGS te raadplegen die gepubliceerd werden op de website van BELAC:

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

Op de antwoordwebsite: <https://eqatoolkit.sciensano.be/NGS> werd er aan de deelnemers gevraagd:

- De vragenlijst met betrekking tot de analysemethode in te vullen.
- De gevraagde parameters in te voeren voor elke geïdentificeerde en in het klinisch rapport gerapporteerde variant:
 - Naam van het gen en het bijhorend NM nummer (dropdown menu)
 - Referentie nomenclatuur van de coderende DNA sequentie volgens HGVSn: <http://varnomen.hgvs.org/>
 - Referentie nomenclatuur van de proteïne sequentie volgens HGVS_p: <http://varnomen.hgvs.org/>
 - Allelfrequentie
 - Biologische classificatie (dropdown menu)
 - Klinische classificatie (dropdown menu)
- Een algemene conclusie te schrijven voor elke klinische casus in de vorm van een vrije tekst.
- Er werd aan de deelnemers gevraagd om via de hen toegestuurde belnet-link de ruwe data (FASTQ, BAM, BAI en VCF bestanden) door te sturen voor elk staal, de BED file(s) met de regio's die het gebruikte panel bevat en de bestanden met de posities en sequenties van de primers die gebruikt werden bij de aanrijkmethode (MANIFEST, BED, ...).

1.5. Evaluatiecriteria

Dit rapport bevat uw resultaten in vergelijking met de resultaten van de 19 deelnemende laboratoria. Voor de identificatie van de varianten, zijn de evaluatiecriteria gebaseerd op de consensus van de laboratoria met een drempelwaarde van 2/3 van de deelnemers.

In detail zijn de evaluatiecriteria:

1/ De identificatie van alle varianten gerapporteerd door ten minste 2/3 van de deelnemers, aanwezig in de 3 stalen: consensus voor de te rapporteren varianten. De mediane waarden van de allfrequenties die de laboratoria voor deze varianten rapporteerden, worden enkel ter informatie weergegeven, net zoals de SD-waarden.

2/ De afwezigheid van de varianten gerapporteerd door minder dan 1/3 van de deelnemers, voor de 3 stalen: consensus voor de niet te rapporteren varianten.

Opmerkingen: De varianten gerapporteerd door 1/3 tot 2/3 van de laboratoria worden ook gedetailleerd beschreven in de rapporten en worden enkel ter informatie weergegeven: geen consensus. De varianten gelinkt aan de genetische achtergrond van de stalen en aanwezig in de 3 stalen worden ook niet geëvalueerd. Een variant met een consensus die door de laboratoria werd gevonden, kan niet worden geëvalueerd indien de groep van experts deze consensus niet valideert.

Wat betreft de biologische en klinische interpretaties, voor de consensus voor de te-rapporteren varianten, worden de antwoorden van de laboratoria gerangschikt als 'verwacht resultaat' (in groen), 'aanvaardbaar resultaat' (in geel), 'niet-aanbevolen maar aanvaardbaar' (in oranje), 'niet aanvaardbaar resultaat' (in rood) of 'niet geëvalueerd resultaat' (in grijs). Deze categorieën worden door een groep van experts gedefinieerd door de resultaten van de consensus van de laboratoria te vergelijken met de resultaten die werden verkregen met behulp van de Belgische richtlijnen.

De inhoud van de algemene conclusies die door de laboratoria werden gerapporteerd, wordt geclassificeerd op basis van standaardinformatie die door ten minste twee laboratoria werd vermeld. Er is een analyse van regio's van de NGS overeenkomst die niet door de panels worden gedekt en deze wordt in het globaal rapport en in de individuele rapporten van de betrokken laboratoria gedocumenteerd.

2. RESULTATEN

2.1. Deelname

19 Belgische laboratoria werden opgenomen in de analyse van de resultaten.

Overzicht van de deelnemers

Regio	N
Vlaams Gewest	14
Brussels Hoofdstedelijk Gewest	3
Waals Gewest	2
Totaal	19

Laboratorium	N
Pathologische anatomie	1
Klinische biologie	16
Humane genetica	2
Totaal	19

2.2. Overzicht van de methoden

Q1. Welk referentiegenoom gebruikt u voor de analyse?

Antwoorden	N
hg19/GRCh37	16
hg38/GRCh38	3

Opmerkingen: 2 laboratoria gaven hg18 aan als referentiegenoom, maar het referentiegenoom dat voor de BAM files van deze 2 laboratoria wordt gebruikt is hg38/GRCh38.

Q2. Welke sequencer gebruikt u voor NGS analyses van hematologische maligniteiten (firma en platform)?

Antwoorden	N
Illumina - MiSeq	9
Illumina - NextSeq 550	3
Illumina - NextSeq 550Dx	3
Illumina - NovaSeq 6000	2
Illumina - MiSeqDx	1
Illumina - NextSeq2000	1

Q3. Welke genpanels worden gebruikt voor NGS analyses op DNA voor hematologische maligniteiten (naam van commerciële en / of custom kits)?

Antwoorden	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
Myeloid Solution (MYS), Sophia Genetics	1

Q4. Welke aanrijkingstrategie wordt gebruikt voor NGS analyses op DNA voor hematologische maligniteiten?

Antwoorden	N
Amplicon-based	10
Probe-based	9

Q5. Is/zijn uw methode(s) single of paired-end?

Antwoorden	N
Paired-end	19

Q6. Wat is de lengte van de reads gegenereerd door uw methode?

Antwoorden	N
74	1
100	1
150-151	9
250	1
340	5
Variabel	2

Q7. Gebruikt uw methode UMI om duplicate reads uit te sluiten?

Antwoorden	N
Ja	14
Neen	5

Q8. Welke bioinformatica software wordt gebruikt voor de secundaire data analyse? (alignment en variant calling)

Antwoorden	N
Open Source/in-house development	8
CLC Genomics Workbench, Qiagen	4
SeqNext, JSI medical systems	3
MiSeq Reporter, Illumina	2
Sophia DDM, Sophia Genetics	2
Archer DX software	1
Local Run Manager, Illumina	1

Opmerkingen: De bio-informatica tools zijn in *open source* gebruikt met de volgende combinaties: 1) BWA, GATK UnifiedGenotyper, 2) bcbio, 3) BWA, VarDict, ITDseek, PINDEL, 4) BWA.

Q9. Welke bioinformatica software wordt gebruikt voor de tertiaire data analyse? (variant annotaties, extra filters,...)

Antwoorden	N
Open source/in house development	8
CLC Genomics Workbench, Qiagen	4
SeqNext, JSI medical systems	4
Variant Studio Software, Illumina	3
Andere	2
Sophia DDM, Sophia Genetics	2
Archer DX software	1
QCI Interpret-Somatic Cancer, Qiagen	1

Opmerkingen: De bio-informatica tools zijn in *open source* gebruikt met de volgende combinaties: 1) Annovar, 2) bcbio, 3) TransVar, 4) handmatig in verschillende openbare databases.

Q10. Wat is de gevalideerde detectielimiet van de allelfrequentie van SNV en indel varianten (VAF%) in hematologische maligniteiten?

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

Q11. Wat is voor SNV en indels het minimale aantal reads van de variant die door uw analysemethode wordt geaccepteerd (minimum variant coverage)?

reads	3	4	10	15	25	30	100	300	500
SNV	1	1	3	2	2	1	1	2	5
Indels	1	1	3	2	2	1	1	2	5

Opmerkingen: De grote variatie in de antwoorden wijst op een mogelijk gebrek aan begrip van de vraag voor sommige deelnemers.

Q12. Wat is voor SNV en indels het minimale aantal reads dat op een bepaalde positie wordt geaccepteerd om de aanwezigheid van een variant uit te sluiten?

reads	25	50	168	250	300	500	1000
SNV	1	1	1	1	5	9	1
Indels	1	1	1	1	5	9	1

Opmerkingen: De grote variatie in de antwoorden wijst op een mogelijk gebrek aan begrip van de vraag voor sommige deelnemers.

Q13. Welke andere categorieën van somatische varianten dan SNV en indels worden gedetecteerd door uw NGS methode voor hematologische maligniteiten op DNA?

Antwoorden	N
Geen andere type varianten	11
Indels longs	8
Chromosomale aberraties	1
Internal Tandem Duplication	1

Q14. Welk type staal wordt in uw laboratorium gesequeneerd voor het opsporen van somatische varianten?

Antwoorden	N
Beenmerg	19
Bloed	19
Vers weefsel	5
Paraffineweefsel	4
Vriesmateriaal	2

Q15. Wanneer u, in de routine, somatische varianten in hematologische maligniteiten opspoot op DNA, sequeneert u dan een normaal staal van dezelfde patiënt in parallel met het tumorstaal?

Antwoorden	N
Neen	17
In sommige gevallen, bij verdenking van kiembaanmutatie	2

Q16. Wat is de minimum hoeveelheid genomisch DNA vereist in uw laboratorium voor het uitvoeren van een NGS analyse op hematologische maligniteiten?

Antwoorden	N
0-10 ng	3
11-50 ng	8
51-100 ng	3
101-200 ng	1
>201 ng	4

Q17. Wat is de minimum concentratie genomisch DNA vereist in uw laboratorium voor het uitvoeren van een NGS analyse op hematologische maligniteiten? (ng/µl)

Antwoorden	N
0,8 ng/µl	1
1 ng/µl	3
3,3 ng/µl	1
5 ng/µl	4
6,5 ng/µl	1
7 ng/µl	4
9 ng/µl	1
10 ng/µl	3
20 ng/µl	1

Q18. Welke methode wordt gebruikt voor de kwantificatie van DNA?

Antwoorden	N
Qubit	12
DropSens	4
NanoDrop	3
Quantus	2

Q19. Welke richtlijnen worden gebruikt voor de interpretatie van de somatische varianten?

Antwoorden	N
BELAC 2-405-NGS Rev 3-2021	18
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)	17
World Health Organization guidelines	15
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)	14
National Comprehensive Cancer Network Guidelines	11
European LeukemiaNet guidelines	10
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)	9
ERIC Recommendations	1

2.3. Overzicht van de resultaten

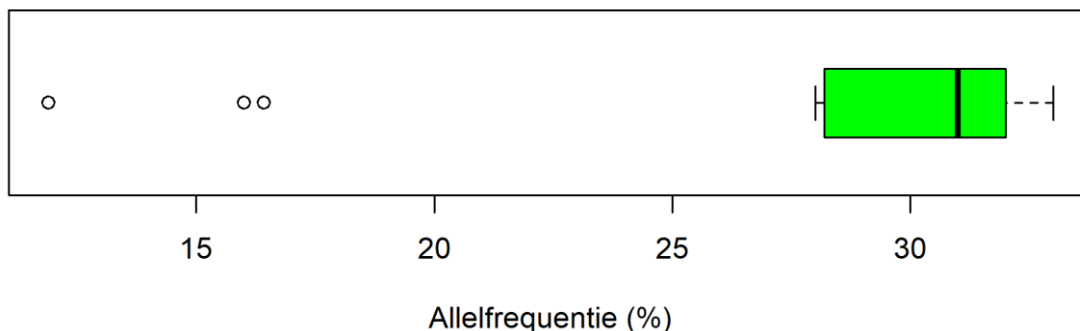
2.3.1. NGS-2022-4

Medische informatie Acute myeloïde leukemie (AML)

Consensus voor de te rapporteren varianten

- [TP53 NM_000546.5; c.818G>A; p.\(Arg273His\)](#)

TP53 NM_000546.5; c.818G>A; p.(Arg273His)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
11.9	28.2	31	32	33	2.82

TP53 NM_000546.5 c.818G>A p.(Arg273His) (Mediaan allelfrequentie: 31 %)	
Identificatie van de variant	N
Ja	19
Neen	0
Biologische classificatie	N
Pathogeen	18
Vermoedelijk pathogeen	1
Totaal	19
Klinische classificatie	N
Tier I: Significant klinisch belang	17
Tier II: Mogelijk klinisch belang	2
Totaal	19

Opmerkingen: Voor dit staal is de bereikte consensus de identificatie van de variant *TP53* NM_000546.5; c.818G>A; p.(Arg273His). Voor de biologische classificatie is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie pathogeen. De classificatie vermoedelijk pathogeen wordt beschouwd als niet aanbevolen volgens de Belgische richtlijnen maar aanvaardbaar omdat dit geen invloed heeft op de follow-up van de patiënt. In de Belgische richtlijnen staat deze variant in de tabel 'Annex 1 Consensus Pathogenic Variants (CPV) in the Convention genes of solid and hematological tumors v2'. Voor de klinische classificatie is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie Tier I vanwege de consensus van de laboratoria. De classificatie Tier II wordt als aanvaardbaar beschouwd, omdat het onderscheid tussen de classificaties Tier I en Tier II niet duidelijk gedefinieerd is wanneer de variant geen therapeutische implicatie heeft.

Niet geëvalueerd varianten

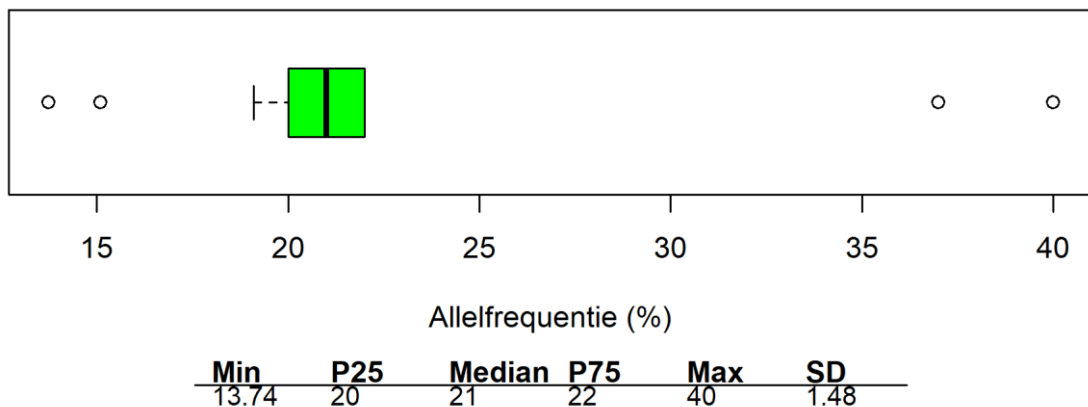
- *DNMT3A* NM_175629.2; c.2732G>A; p.(Cys911Tyr)

<i>DNMT3A</i> NM_175629.2 c.2732G>A p.(Cys911Tyr) (Mediaan allelfrequentie: 49 %)	
Identificatie van de variant	N
Ja	1
Neen	18
Biologische classificatie	N
VUS	1
Totaal	1
Klinische classificatie	N
Tier III: Ongekende klinische betekenis	1
Totaal	1

Opmerkingen: De variant *DNMT3A* NM_175629.2; c.2732G>A; p.(Cys911Tyr) is gelinkt aan de genetische achtergrond van de cellijn die werd gebruikt voor de productie van de stalen en is aanwezig in alle 3 de stalen. Om deze reden wordt deze variant niet geëvalueerd. Ter herinnering, in de begeleidende brief van de stalen werd gevraagd de varianten die identiek aanwezig zijn in de 3 stalen niet te rapporteren, zoals de variant *DNMT3A*. Biologische en klinische classificaties voor deze variant worden ter informatie gegeven. De biologische en klinische classificatie door de experts gevalideerd, zijn dus de classificaties VUS en Tier III.

- *KIT* NM_000222.2; c.1679_1680delinsAG; p.(Val560Glu)

***KIT* NM_000222.2; c.1679_1680delinsAG; p.(Val560Glu)**



<i>KIT</i> NM_000222.2 c.1679_1680delinsAG p.(Val560Glu) (Mediaan allelfrequentie: 21 %)	
Identificatie van de variant	N
Ja	11
Neen	8
Biologische classificatie	N
Pathogeen	4
Vermoedelijk pathogeen	5
VUS	2
Totaal	11
Klinische classificatie	N
Tier I: Significant klinisch belang	5
Tier II: Mogelijk klinisch belang	4
Tier III: Ongekende klinische betekenis	2
Totaal	11

Opmerkingen: De variant *KIT* NM_000222.2; c.1679_1680delinsAG; p.(Val560Glu) werd gerapporteerd door 11 laboratoria. Deze variant bevindt zich in exon 11 van het gen *KIT*, dit is geen vereiste regio volgens de NGS overeenkomst voor de indicatie AML (enkel exonen 8, 10 en 17). Om deze reden en bij gebrek aan een consensus van de laboratoria wordt de variant niet geëvalueerd. Experts raden echter aan deze variant te rapporteren als deze in de klinische praktijk wordt geïdentificeerd. Biologische en klinische classificaties voor deze variant worden ter informatie gegeven. De biologische en klinische classificatie door de experts gevalideerd, zijn dus de classificaties vermoedelijk pathoogeen en Tier I-II.

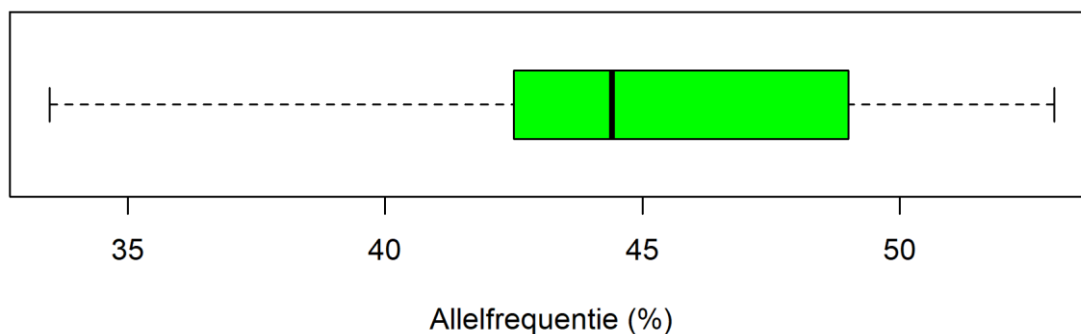
Analyse van de conclusies

Standaardinformatie	Specifieke informatie van casus 4 en opgenomen in de algemene conclusie door tenminste 2 laboratoria	Laboratoria
Diagnose	<i>TP53</i> varianten recurrent in AML	13
	<i>TP53</i> variant vaker geassocieerd met een complex karyotype in AML	12
	<i>KIT</i> varianten recurrent in AML- vaker voorkomen in CBF-AML - vaak geassocieerd met t(8;12) en inv(16)	7
Prognose	<i>TP53</i> varianten met een ongunstige prognose in AML	17
	<i>KIT</i> varianten met een (mogelijk) ongunstige prognose in AML met inv(16) of t(8;21)	7
Therapie	Indicatie voor gevoeligheid voor gerichte therapie gelinkt door de aanwezigheid van de <i>TP53</i> variant	5
	Klinische studies voor AML patiënten met <i>KIT</i> varianten	3
Informatie over de geteste genen	In AML context worden <i>KIT</i> varianten meestal beschreven in de exonen 8, 10 en 17	3
	<i>KIT</i> varianten in exon 11 slecht beschreven in AML	4
Andere	Voorgestelde aanvullende analyses: karyotype, germline testing, hematologische parameters, etc.	6

Medische informatie | Myelodysplastisch syndroom (MDS)

Consensus voor de te rapporteren varianten

- [TP53 NM_000546.5; c.546_547insAC; p.\(Ser183Thrfs*65\)](#)

TP53 NM_000546.5; c.546_547insAC; p.(Ser183Thrfs*65)

Min	P25	Median	P75	Max	SD
33.48	42.5	44.4	49	53	4.82

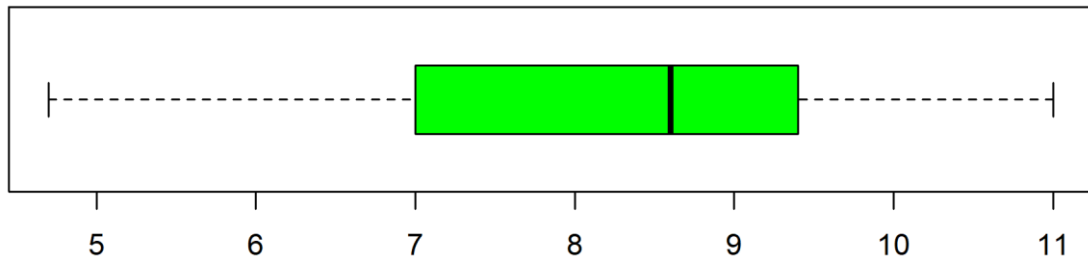
TP53 NM_000546.5 c.546_547insAC p.(Ser183Thrfs*65) (Mediaan allelfrequentie: 44.4 %)	
Identificatie van de variant	N
Ja	19
Neen	0
Biologische classificatie	N
Vermoedelijk pathogeen	18
VUS	1
Totaal	19
Klinische classificatie	N
Tier I: Significant klinisch belang	11
Tier II: Mogelijk klinisch belang	7
Tier III: Ongekende klinische betekenis	1
Totaal	19

Opmerkingen: Voor dit staal is de bereikte consensus de identificatie van de variant *TP53* NM_000546.5; c.546_547insAC; p.(Ser183Thrfs*65). Betreffende eiwitreferenties: de nomenclatuur p.(Ser183ThrfsTer65), gerapporteerd door één laboratorium, wordt niet aanbevolen volgens de Belgische richtlijnen. Voor de biologische classificatie is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie vermoedelijk pathogeen. De classificatie VUS wordt als niet aanvaardbaar beschouwd. In de Belgische richtlijnen: een Loss-of-Function (LoF) van het type frameshift in een Tumor Suppressor (TS) gen is geclassificeerd als vermoedelijk pathogeen. Voor de klinische classificaties, worden de classificaties Tier I en Tier II als aanvaardbaar beschouwd, aangezien er geen consensus van de laboratoria bestaat en het onderscheid tussen de classificaties Tier I en Tier II niet duidelijk gedefinieerd is wanneer de variant geen therapeutische implicaties heeft. De classificatie Tier III wordt als niet-aanvaardbaar beschouwd gezien het prognostische nut van deze variant.

Niet geëvalueerd varianten

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

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



Min **P25** **Median** **P75** **Max** **SD**
4.7 7.3 8.6 9.35 11 1.52

ASXL1 NM_015338.5 c.1934dup p.(Gly646Trpfs*12) (Mediaan allelfrequentie: 8.6 %)	
Identificatie van de variant	N
Ja	10
Neen	9
Biologische classificatie	N
Vermoedelijk pathogeen	10
Totaal	10
Klinische classificatie	N
Tier I: Significant klinisch belang	8
Tier II: Mogelijk klinisch belang	2
Totaal	10

Opmerkingen: De variant *ASXL1* NM_015338.5; c.1934dup; p.(Gly646Trpfs*12) werd gerapporteerd door 10 laboratoria. 9 laboratoria hebben deze variant niet gerapporteerd, ondanks de aanwezigheid ervan in hun ruwe data: voor 6 laboratoria, in VCF en BAM files; voor 3 laboratoria, alleen in BAM files. De mediane allelfrequentie is 8,6%. De laboratoria die de variant niet gerapporteerd hebben, legden een detectielimiet tussen 2 en 5% vast voor SNV en indels. De allelfrequentie van de variant ligt dus boven hun detectielimiet. De variant c.1934dup is echter aanwezig in een polyG stretch van het gen *ASXL1* en vormt het onderwerp van een uitzondering in de Belgische richtlijnen: 'The c.1934dup in the polyG stretch of *ASXL1* is 'Likely Pathogenic' only if the variant allele frequency (VAF) is significantly higher than that obtained for the polyG stutter error, which is method specific' (Exceptions to the workflow v2, blz. 29). Laboratoria die deze variant niet hebben gerapporteerd, vragen wij om in hun procedures hun detectielimiet voor polyN streken opnieuw te evalueren, aangezien het een 'true' positief resultaat is (indien de VAF hoger is dan de threshold van het labo). Bij gebrek aan een consensus van de laboratoria wordt de variant hier niet geëvalueerd. Betreffende DNA referenties: de nomenclatuur c.1934dupG, gerapporteerd door 4 laboratoria, wordt niet aanbevolen volgens de HGVS richtlijnen. Deze beschrijving is langer, bevat overbodige informatie en verhoogt de kans op fouten. Biologische en klinische classificaties voor deze variant worden ter informatie gegeven. De biologische en klinische classificatie door de experts gevalideerd, zijn dus de classificaties vermoedelijk pathogeen en Tier I-II.

Aanwezigheid of afwezigheid van variant *ASXL1* NM_015338.5; c.1934dup; p.(Gly646Trpfs*12) in de deelnemersgegevens:

Reference genome according to the laboratory	Reported	In BED	VCF allele frequency	In BAM	Discordance between the reference genome according to the laboratory and the reference genome in the raw files
hg19/GRCh37	No	Yes	/	Yes	
hg19/GRCh37	Yes	Yes	4.96	Yes	
hg19/GRCh37	No	Yes	8.78	Yes	
hg19/GRCh37	No	Yes	6.1	Yes	
hg19/GRCh37	No	Yes	5.7	Yes	
hg19/GRCh37	No	Yes	/	Yes	
hg19/GRCh37	Yes	Yes	11	/	No BAM sent
hg19/GRCh37	No	Yes	5.8	Yes	
hg19/GRCh37	Yes	Yes	7.1	Yes	
hg19/GRCh37	No	Yes	/	Yes	
hg19/GRCh37	Yes	Yes	16.3	Yes	
hg19/GRCh37	Yes	Yes	10.11	Yes	
hg19/GRCh37	Yes	Yes	11.3	Yes	
hg18	Yes	Yes	6.08	Yes	Reference genome in BAM = hg38 Reference genome in BED = hg38
hg38/GRCh38	Yes	Yes	/	Yes	
hg18	No	No	/	Yes	Reference genome in BAM = hg38 Reference genome in BED = hg19 (it only targets exon 11/13)
hg19/GRCh37	Yes	Yes	10.33	Yes	
hg19/GRCh37	No	Yes	9.4	Yes	
hg19/GRCh37	Yes	Yes	7.91	Yes	

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

<i>DNMT3A</i> NM_175629.2 c.2732G>A p.(Cys911Tyr) (Mediaan allelfrequentie: 51 %)	
Identificatie van de variant	N
Ja	1
Neen	18
Biologische classificatie	N
VUS	1
Totaal	1
Klinische classificatie	N
Tier III: Ongekende klinische betekenis	1
Totaal	1

Opmerkingen: De variant *DNMT3A* NM_175629.2; c.2732G>A; p.(Cys911Tyr) is gelinkt aan de genetische achtergrond van de cellijn die werd gebruikt voor de productie van de stalen en is aanwezig in alle 3 de stalen. Om deze reden wordt deze variant niet geëvalueerd. Ter herinnering, in de begeleidende brief van de stalen werd gevraagd de varianten die identiek aanwezig zijn in de 3 stalen niet te rapporteren, zoals de variant *DNMT3A*. Biologische en klinische classificaties voor deze variant worden ter informatie gegeven. De biologische en klinische classificatie door de experts gevalideerd, zijn dus de classificaties VUS en Tier III.

Analyse van de conclusies

Standaardinformatie	Specifieke informatie van casus 5 en opgenomen in de algemene conclusie door tenminste 2 laboratoria	Laboratoria
Diagnose	<i>TP53</i> varianten recurrent in MDS	13
	<i>TP53</i> varianten vaker geassocieerd met een complex karyotype in MDS, geassocieerd met het karyotype del(5 of 7q)	11
	<i>ASXL1</i> varianten recurrent in MDS	7
Prognose	<i>TP53</i> varianten met een ongunstige prognose in MDS	17
	Toename risico op transformatie naar AML gelinkt met <i>TP53</i> variant	2
	Verminderde respons op lenalidomide gelinkt met <i>TP53</i> variant	4
	Toename risico op transformatie naar AML gelinkt met <i>ASXL1</i> variant	2
	<i>ASXL1</i> varianten met een ongunstige prognose in MDS	8
Therapie	Klinische studies voor MDS patiënten met <i>TP53</i> varianten	2
Andere	Voorgestelde aanvullende analyses: karyotype, germline testing, hematologische parameters, etc.	7

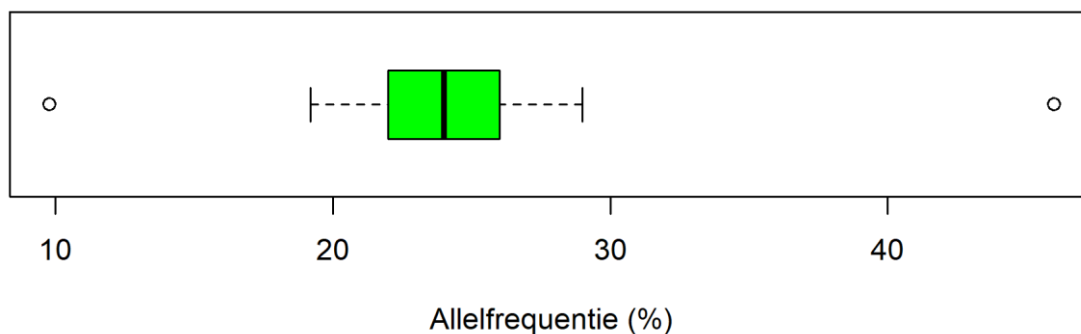
2.3.3. NGS-2022-6

Medische informatie Primaire myelofibrose (PMF)

Consensus voor de te rapporteren varianten

- [JAK2 NM_004972.3; c.1849G>T; p.\(Val617Phe\)](#)

JAK2 NM_004972.3; c.1849G>T; p.(Val617Phe)



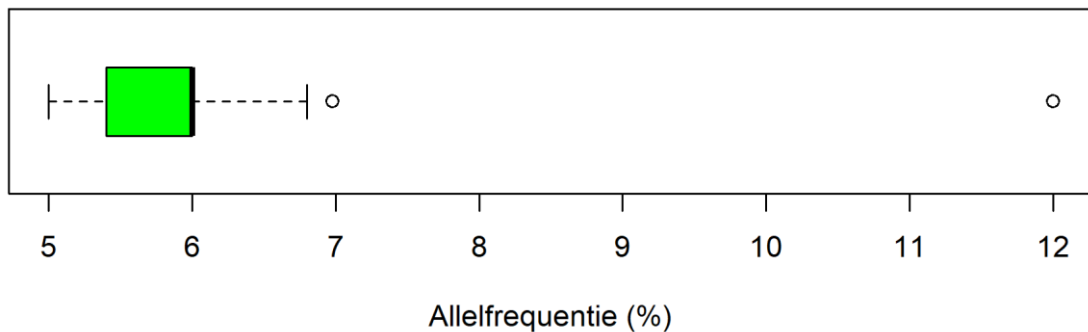
Min	P25	Median	P75	Max	SD
9.79	22	24	26	46	2.97

JAK2 NM_004972.3 c.1849G>T p.(Val617Phe) (Mediaan allelfrequentie: 24 %)	
Identificatie van de variant	N
Ja	19
Neen	0
Biologische classificatie	N
Pathogeen	19
Totaal	19
Klinische classificatie	N
Tier I: Significant klinisch belang	19
Totaal	19

Opmerkingen: Voor dit staal is de bereikte consensus de identificatie van de variant *JAK2* NM_004972.3; c.1849G>T; p.(Val617Phe). Voor de biologische classificatie is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie pathogeen. Voor de klinische classificatie is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie Tier I.

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

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



Min	P25	Median	P75	Max	SD
5	5.4	6	6	12	0.44

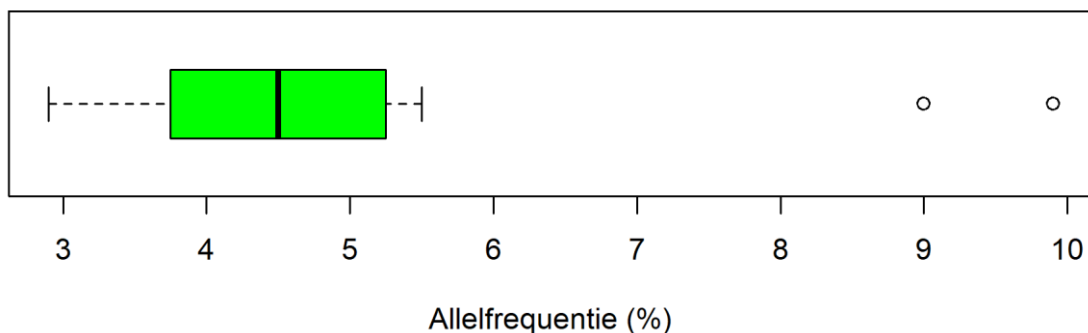
SF3B1 NM_012433.3 c.2098A>G p.(Lys700Glu) (Mediaan allelfrequentie: 6 %)	
Identificatie van de variant	N
Ja	19
Neen	0
Biologische classificatie	N
Pathogeen	19
Totaal	19
Klinische classificatie	N
Tier I: Significant klinisch belang	16
Tier II: Mogelijk klinisch belang	3
Totaal	19

Opmerkingen: Voor dit staal is de bereikte consensus de identificatie van de variant *SF3B1* NM_012433.3; c.2098A>G; p.(Lys700Glu). Voor de biologische classificatie, is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie pathogeen. Voor de klinische classificatie is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie Tier I vanwege de consensus van de laboratoria. De classificatie Tier II wordt als aanvaardbaar beschouwd, omdat het onderscheid tussen de classificaties Tier I en Tier II niet duidelijk gedefinieerd is wanneer de variant geen therapeutische implicatie heeft.

Niet geëvalueerd varianten

- [ASXL1 NM_015338.5; c.1900_1922del; p.\(Glu635Argfs*15\)](#)

ASXL1 NM_015338.5; c.1900_1922del; p.(Glu635Argfs*15)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
2.9	3.75	4.5	5.25	9.9	1.11

ASXL1 NM_015338.5 c.1900_1922del p.(Glu635Argfs*15) (Mediaan allelfrequentie: 4.5 %)	
Identificatie van de variant	N
Ja	11
Neen	8
Biologische classificatie	N
Vermoedelijk pathogeen	11
Totaal	11
Klinische classificatie	N
Tier I: Significant klinisch belang	9
Tier II: Mogelijk klinisch belang	2
Totaal	11

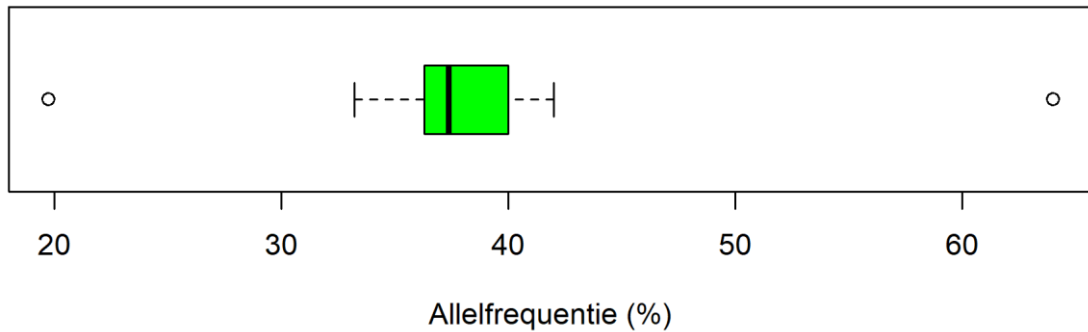
Opmerkingen: De variant ASXL1 NM_015338.5; c.1900_1922del; p.(Glu635Argfs*15) werd gerapporteerd door 11 laboratoria. 8 laboratoria hebben deze variant niet gerapporteerd. Voor 6 laboratoria is de variant aanwezig in hun ruwe data: voor 5 laboratoria, in VCF en BAM files; voor 1 laboratorium alleen in BAM files. Voor 2 laboratoria is de variant niet aanwezig in hun ruwe data. De mediane allelfrequentie is 4,5%. De laboratoria die de variant niet gerapporteerd, hebben, legden een detectielimiet van 5% vast voor SNV en indels. De allelfrequentie van de mutatie ligt onder hun detectielimiet. Bij gebrek aan een consensus van de laboratoria wordt de variant niet geëvalueerd. Betreffende eiwitreferenties: de nomenclatuur p.(Ser183ThrfsTer65), gerapporteerd door één laboratorium, wordt niet aanbevolen volgens de Belgische richtlijnen. Biologische en klinische classificaties voor deze variant worden ter informatie gegeven. De biologische en klinische classificatie door de experts gevalideerd, zijn dus de classificaties vermoedelijk pathogeen en Tier I-II.

Aanwezigheid of afwezigheid van variant ASXL1 NM_015338.5; c.1900_1922del; p.(Glu635Argfs*15) in de deelnemersgegevens:

Reference genome according to the laboratory	Reported	In BED	VCF allele frequency	In BAM	Discordance between the reference genome according to the laboratory and the reference genome in the raw files
hg19/GRCh37	Yes	Yes	11.08	Yes	
hg19/GRCh37	Yes	Yes	3	Yes	
hg19/GRCh37	No	Yes	1.51	Yes	
hg19/GRCh37	No	Yes	2.22	Yes	
hg19/GRCh37	No	Yes	3.3	Yes	
hg19/GRCh37	Yes	Yes	5.46	Yes	
hg19/GRCh37	Yes	Yes	6	/	No BAM sent
hg19/GRCh37	No	Yes	3.6	Yes	
hg19/GRCh37	No	Yes	/	/	
hg19/GRCh37	Yes	Yes	4	Yes	
hg19/GRCh37	Yes	Yes	4.53	Yes	
hg19/GRCh37	Yes	Yes	8.55	Yes	
hg19/GRCh37	Yes	Yes	4.05	Yes	
hg18	No	Yes	/	/	Reference genome in BAM = hg38 Reference genome in BED = hg38
hg38/GRCh38	Yes	Yes	3.46	Yes	
hg18	No	No	/	Yes	Reference genome in BAM = hg38 Reference genome in BED = hg19 (it only targets exon 11/13)
hg19/GRCh37	Yes	Yes	5.28	Yes	
hg19/GRCh37	Yes	Yes	4.23	Yes	
hg19/GRCh37	No	Yes	3.3	Yes	

- SF3B1 NM_012433.3; c.2225G>A; p.(Gly742Asp)

SF3B1 NM_012433.3; c.2225G>A; p.(Gly742Asp)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
19.74	36.65	37.35	39.5	64	2.11

SF3B1 NM_012433.3 c.2225G>A p.(Gly742Asp) (Mediaan allelfrequentie: 37.35 %)	
Identificatie van de variant	N
Ja	12
Neen	7
Biologische classificatie	N
Pathogeen	12
Totaal	12
Klinische classificatie	N
Tier I: Significant klinisch belang	10
Tier II: Mogelijk klinisch belang	2
Totaal	12

Opmerkingen: De variant *SF3B1* NM_012433.3; c.2225G>A; p.(Gly742Asp) werd gerapporteerd door 12 laboratoria. Deze variant bevindt zich in exon 16 van het gen *SF3B1*, dit is geen vereiste regio volgens de NGS overeenkomst voor de indicatie PMF (enkel exonen 14 en 15). Om deze reden en bij gebrek aan een consensus van de laboratoria wordt de variant niet geëvalueerd. Experts raden echter aan deze variant te rapporteren als deze in de klinische praktijk wordt geïdentificeerd. Biologische en klinische classificaties voor deze variant worden ter informatie gegeven. De biologische en klinische classificatie door de experts gevalideerd, zijn dus de classificaties pathogeen en Tier I-II.

Analyse van de conclusies

Standaardinformatie	Specifieke informatie van casus 6 en opgenomen in de algemene conclusie door tenminste 2 laboratoria	Laboratoria
Diagnose	<i>JAK2</i> variant recurrent in MPN type PMF, PV en ET - Mutationeel profiel compatibel met een MPN diagnose - aanwezigheid van <i>JAK2</i> variant, majeur WHO-criterium voor de diagnose van MPN	17
	<i>ASXL1</i> varianten recurrent in PMF	6
	<i>SF3B1</i> varianten recurrent in PMF	14
	<i>SF3B1</i> varianten worden vaak geassocieerd met de aanwezigheid van ring sideroblasten (MDS-RS)	3
Prognose	In PMF, <i>JAK2</i> variant met gunstiger prognose dan triple-negatieve maar minder gunstig dan CALR varianten - intermediaire prognose	12
	In PMF, <i>ASXL1</i> variant met een ongunstige prognose, vooral bij CARL negatief patiënten	10
	<i>SF3B1</i> variant met een ongunstige prognose	2
	<i>SF3B1</i> variant zonder duidelijke prognostisch betekenis	6
Therapie	Indicatie voor gevoeligheid aan <i>JAK2</i> inhibitoren (Ruxolitinib)	3

2.3.4. Slaagpercentage van de deelnemers

Consensus voor de te rapporteren varianten

Slaagpercentage gebaseerd op consensus voor de te rapporteren varianten	N
4/4 (100%)	19
Totaal slaagpercentage: 76/76 (100%)	

Bij gebrek aan een consensus van de laboratoria zijn 4 varianten in deze EKE niet beoordeeld: 2 varianten maken geen deel uit van de door de NGS overeenkomst vereiste regio's (genen *KIT* en *SF3B1*) en 2 varianten hadden een mediane allelfrequentie van 8,6% en 4,5% (gen *ASXL1*).

Consensus voor de niet te rapporteren varianten

Geen enkele variant werd gerapporteerd door minder dan een derde van de deelnemers (false positive). Eén laboratorium hield zich niet aan de instructie om geen varianten te rapporteren die verband houden met de genetische achtergrond van het staal en rapporteerde de variant *DNMT3A* NM_175629.2; c.2732G>A; p.(Cys911Tyr) voor de stalen NGS-2022-4 en NGS-2022-5.

Biologische en klinische classificaties

Slaagpercentage van deelnemers voor de classificaties voor de consensus voor de te rapporteren varianten	N
Biologische classificaties*	
4/4 (100%)	18
2/3 (75%)	1
Totaal slaagpercentage: - biologische classificaties : 75/76 (98,68%)	
Klinische classificaties *	
4/4 (100%)	18
3/4 (75%)	1
Totaal slaagpercentage: - klinische classificaties : 75/76 (98,68%)	

* De resultaten 'aanvaardbaar' worden als succesvol beschouwd.

2.3.5. Analyse van regio's van de NGS overeenkomst die niet door de panels worden gedekt

Staal	Aantal laboratoria dat alle regio's van de overeenkomst dekt
NGS-2022-4 (AML)	13
NGS-2022-5 (MDS)	14
NGS-2022-6 (PMF)	15

De analyse is uitgevoerd op de BAM files die door de laboratoria zijn doorgestuurd, alleen voor regio's vereist door de NGS overeenkomst vanaf 1 januari 2022 voor elke indicatie die bij de EKE wordt beoordeeld (zie bijlage 3.1. 'Regio's van de overeenkomst geanalyseerd'). Er werd een drempel van 50 reads gebruikt om te bepalen of de positie al dan niet door het panel werd gedekt.

6 laboratoria gebruiken panels die niet alle regio's vereist door de NGS overeenkomst dekken. Wij vragen de laboratoria om hun analysepanels bij te werken volgens de vereisten van de RIZIV overeenkomst na elke revisie. De regio's die niet door de laboratoria worden gedekt werden niet geëvalueerd.

Laboratorium	Staal	Lengte in bp die niet door het laboratorium panel wordt gedekt
Lab 1	NGS-2022-4 (AML)	694
	NGS-2022-5 (MDS)	51
Lab 2	NGS-2022-4 (AML)	94
	NGS-2022-5 (MDS)	75
	NGS-2022-6 (PMF)	75
Lab 3	NGS-2022-4 (AML)	429
Lab 4	NGS-2022-4 (AML)	189
	NGS-2022-5 (MDS)	189
	NGS-2022-6 (PMF)	189
Lab 5	NGS-2022-4 (AML)	462
	NGS-2022-5 (MDS)	546
	NGS-2022-6 (PMF)	84
Lab 6	NGS-2022-4 (AML)	462
	NGS-2022-5 (MDS)	546
	NGS-2022-6 (PMF)	84

3. BIJLAGE

3.1. Regio's van de NGS overeenkomst geanalyseerd

Gene	Exon	Codon	Chr	Start	End	Conditions
<i>ASXL1</i>	13	all	20	31022235	31025142	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>CEBPA</i>	1	all	19	33792244	33793321	Acute myeloid leukemia
<i>DNMT3A</i>	8	all	2	25470460	25470619	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>DNMT3A</i>	9	all	2	25469920	25470028	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>DNMT3A</i>	10	all	2	25469489	25469646	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>DNMT3A</i>	11	all	2	25469029	25469179	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>DNMT3A</i>	12	all	2	25468889	25468934	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>DNMT3A</i>	13	all	2	25468122	25468202	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>DNMT3A</i>	14	all	2	25467409	25467522	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>DNMT3A</i>	15	all	2	25467024	25467208	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>DNMT3A</i>	16	all	2	25466767	25466852	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>DNMT3A</i>	17	all	2	25464431	25464577	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>DNMT3A</i>	18	all	2	25463509	25463600	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>DNMT3A</i>	19	all	2	25463171	25463320	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>DNMT3A</i>	20	all	2	25461999	25462085	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>DNMT3A</i>	21	all	2	25459805	25459875	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>DNMT3A</i>	22	all	2	25458576	25458695	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>DNMT3A</i>	23	all	2	25457148	25457290	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>FLT3</i>	14	all	13	28608219	28608352	Acute myeloid leukemia
<i>FLT3</i>	15	all	13	28608024	28608129	Acute myeloid leukemia
<i>FLT3</i>	20	835	13	28592640	28592643	Acute myeloid leukemia

Gene	Exon	Codon	Chr	Start	End	Conditions
<i>IDH1</i>	4	132	2	209113111	209113114	Acute myeloid leukemia, Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>IDH2</i>	4	140	15	90631933	90631936	Acute myeloid leukemia, Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>IDH2</i>	4	172	15	90631837	90631840	Acute myeloid leukemia, Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>KIT</i>	8	all	4	55589750	55589865	Acute myeloid leukemia
<i>KIT</i>	10	all	4	55593384	55593491	Acute myeloid leukemia
<i>KIT</i>	17	all	4	55599236	55599359	Acute myeloid leukemia
<i>NPM1</i>	11	288	5	170837546	170837549	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	36265261	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>RUNX1</i>	4	all	21	36259140	36259394	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>RUNX1</i>	5	all	21	36252854	36253011	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>RUNX1</i>	6	all	21	36231771	36231876	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>RUNX1</i>	7	all	21	36206707	36206899	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>RUNX1</i>	8	all	21	36171598	36171760	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>RUNX1</i>	9	all	21	36164432	36164908	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2)
<i>TET2</i>	3	all	4	106155100	106158509	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TET2</i>	9	all	4	106190767	106190905	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TET2</i>	10	all	4	106193721	106194076	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TET2</i>	11	all	4	106196205	106197677	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	7579722	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TP53</i>	4	all	17	7579312	7579591	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes

Gene	Exon	Codon	Chr	Start	End	Conditions
						(without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TP53</i>	5	all	17	7578371	7578555	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TP53</i>	6	all	17	7578177	7578290	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TP53</i>	7	all	17	7577499	7577609	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TP53</i>	8	all	17	7577019	7577156	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TP53</i>	9	all	17	7576853	7576927	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TP53</i>	10	all	17	7573927	7574034	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>TP53</i>	11	all	17	7572927	7573009	Acute myeloid leukemia, Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>WT1</i>	7	all	11	32417803	32417954	Acute myeloid leukemia
<i>WT1</i>	9	all	11	32413518	32413611	Acute myeloid leukemia
<i>EZH2</i>	2	all	7	148544274	148544390	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>EZH2</i>	3	all	7	148543562	148543691	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>EZH2</i>	4	all	7	148529726	148529843	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>EZH2</i>	5	all	7	148526820	148526941	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>EZH2</i>	6	all	7	148525832	148525973	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>EZH2</i>	7	all	7	148524256	148524359	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>EZH2</i>	8	all	7	148523546	148523725	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>EZH2</i>	9	all	7	148516688	148516780	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>EZH2</i>	10	all	7	148514969	148515210	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>EZH2</i>	11	all	7	148514314	148514484	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis

Gene	Exon	Codon	Chr	Start	End	Conditions
<i>EZH2</i>	12	all	7	148513776	148513871	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>EZH2</i>	13	all	7	148512598	148512639	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>EZH2</i>	14	all	7	148512006	148512132	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>EZH2</i>	15	all	7	148511051	148511230	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>EZH2</i>	16	all	7	148508717	148508813	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>EZH2</i>	17	all	7	148507425	148507507	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>EZH2</i>	18	all	7	148506402	148506483	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>EZH2</i>	19	all	7	148506163	148506248	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>EZH2</i>	20	all	7	148504738	148504799	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	198266855	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>SRSF2</i>	1	95	17	74732958	74732961	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>U2AF1</i>	2	34	21	44524455	44524458	Myelodysplastic syndromes (without MDS-EB2), Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>U2AF1</i>	6	157	21	44514776	44514779	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	5070050	Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>JAK2</i>	14	617	9	5073770	5073773	Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis
<i>MPL</i>	10	all	1	43814934	43815032	Myeloproliferative neoplasia-Primary myelofibrosis

3.2. Overzicht van de klinische conclusies

Deze gegevens zijn de antwoorden ingegeven op de website <https://egatoolkit.sciensano.be/NGS> en werden hieruit geëxtraheerd. Om geen vertaalfouten te introduceren, werden de conclusies in de taal van het laboratorium behouden.

3.2.1. NGS-2022-4

<p>Aanwezigheid van TP53 variant: frequentie 2-8% bij AML, geassocieerd met slechte prognose en complex karyotype (gemiddeld 7 afwijkingen). @1@</p>	1
<p>Met next generation sequencing werden 2 pathogene varianten gevonden in KIT (exon 11) en TP53.</p> <p>KIT mutaties (vooral in exon 8 en 17) zijn geassocieerd met een ongunstig prognose in AML met inv(16) of t(8;21) (WHO 2017; Dohner et al, Blood 2017). Het wordt aangeraden om MRD te volgen in deze type AML - te correleren met cytogenetica. Er zijn klinische studies voor AML patiënten met KIT mutaties (clinicaltrial.gov).</p> <p>Mutaties in TP53 in AML zijn geassocieerd met een slechte prognose (Dohner et al., Blood 2017). Papaemmanuil (NEJM, 2016) suggereert dat AML met een complex karyotype en TP53 mutatie een aparte klasse is met een slechte prognose. Echter dit is nog niet opgenomen in de WHO 2017 - te correleren met cytogenetica. @1@</p>	2
<p>Varianten in TP53 zijn beschreven bij AML, waarbij ze geassocieerd zijn aan een complex karyotype, afwezigheid van klinische remissie en verminderde algemene outcome.</p> <p>Varianten in KIT zijn beschreven bij bepaalde types van AML, waarbij ze voorkomen in 20-30% van de AML met t(8;21) en in 30-40% van de AML met inv(16) patiënten. De aanwezigheid van een KIT variant heeft een negatieve invloed op de prognose, voornamelijk bij AML met t(8;21).</p> <p>1. Arber et al. Blood 2016;127:2391-4052 2. Kuykendall et al. Am Soc Clin Oncol Educ Book 2018;38:555-73 3. Ohgami et al. Mod Pathol 2015;28:706-14 4. The Cancer Genome Atlas Research Network. N Engl J Med 2013;368:2059-74 5. Paschka et al. J Clin Oncol 2006;24:3904-11 @1@</p>	3
<p>De gevonden variant in TP53 is recurrent in de context van AML. Ze is prognostisch minder gunstig en is frequent geassocieerd met een complex karyotype (Ref: Döhner et al. NEJM 2015;373:1136-52). @1@</p>	4
<p>Varianten in het TP53 gen zijn recurrent in de context van AML en worden geassocieerd met een complex karyotype en een zeer ongunstige prognose. De variant gedetecteerd bij deze patiënt werd nog niet beschreven in de context van AML.</p> <p>Varianten in het KIT gen zijn zeer recurrent in de context van oa. GIST, melanoma en systemische mastocytose. In de context van AML worden KIT varianten meest frequent beschreven bij core binding factor (CBF) leukemie en vooral exon 17 varianten worden geassocieerd met een ongunstige prognose. De rol van kinase inhibitoren (zoals imatinib, dasatinib, midostaurin) en HSP90 (heat shock proteïne 90) inhibitoren in de behandeling van AML met KIT varianten wordt in meerdere studies onderzocht. De prognostische betekenis van deze exon 11 variant in het juxta-membraan domein van het KIT gen bij AML is momenteel nog onduidelijk.</p> <p>Ref: Döhner et al, Blood 2017; 129:1136-1152, Lodé et al, Haematologica 2018; 103(1): e13-e16. Tarlock et al, Clin Cancer Res 2020; 25(16):5038-5048, Katagiri et al, Int J Mol Sci 2022; 23:4694. @1@</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. Toutefois, les éventuels variants pathogènes (ou probablement pathogènes) observés dans les 29 autres gènes seront rapportés ci-dessous dans le résumé du rapport. 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 suppresseur de tumeur TP53 du variant pathogénique c.818G>A p.(Arg273His) dont l'impact clinique est avéré dans le cadre des AML. Les mutations dans TP53 confèrent un pronostic défavorable (Dohner et al., Blood 2017, PMID27895058 ; NCCN AML V.1.2022). Les patients « TP53 muté » peuvent faire l'objet d'une thérapie ciblée (sensibilité à la décitabine et 5-azacytidine), (NCCN AMLV.1.2022), (Intérêt diagnostic, pronostic et thérapeutique validé par le Compermed D2A, P1, T2B).</p>	6

<p>-Présence dans l'oncogène KIT d'un variant probablement pathogénique c.1679_1680delinsAG p.(Val560Glu) dans l'exon 11, situé au niveau du domaine juxta membranaire. Les mutations dans le gène KIT sont observées chez 4-6% des AML de novo et 20-40% des CBF-AML de novo (Core binding factor- acute myeloid leukemia). L'impact clinique (pronostic et thérapeutique) des mutations situées au niveau des exons 8, 10 et 17 est clairement établi mais il n'y a pas de consensus clair concernant l'exon 11 (NCCN AML v1 2022 ; WHO 2017 ; CHEN, PLOS ONE 2016, PMID: 26771376 ; Badr, Leuk Res Rep. 2018, PMID: 30112273).@1@</p>	
<p>Présence d'un variant du gène TP53.</p> <p>Les variants du gène TP53 sont retrouvés dans 5-10% des leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Ces variants sont associés de manière très significative avec certaines altérations chromosomiques, en ce compris les caryotypes complexes. Ces variants constituent un marqueur de mauvais pronostic indépendant du caryotype et sont associés à un risque augmenté de rechute post-greffe.</p> <p>EN CONCLUSION ce patient présente une pathologie de profil mutationnel défavorable. Ces résultats sont à compléter de ceux du caryotype.@1@</p>	7
<p>Er wordt een variant in TP53 gedetecteerd.</p> <p>Varianten in het TP53 gen zijn recurrent in de context van AML en worden geassocieerd met een complex en/of monosomaal karyotype en een zeer ongunstige prognose (Ref: Döhner et al., Blood 2017. 129:424-447).</p> <p>Door de aanwezigheid van een variant in het TP53 gen in >30% van de allelen, kan een constitutionele origine niet worden uitgesloten. Te correleren met de familiegeschiedenis en de voorgeschiedenis.</p> <p>In geval van een familiale kankergeschiedenis of een therapie gerelateerde kanker, is een kiembaanonderzoek (op niet-geïnvadeerd weefsel (nagels, haar)) aangewezen.@1@</p>	8
<p>Er werd een TP53 (NM_000546.5(TP53):c.818G>A (p.(Arg273His)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 8.</p> <p>De aanwezigheid van dit type variant in AML heeft significant klinisch belang (tier I) en is in het algemeen geassocieerd met een slechtere prognose (NCCN guidelines v3.0 2020, PMID: 27680515). Dit type variant is geassocieerd met een gevoeligheid aan hypomethylating agents zoals decitabine en azacytidine, al dan niet in de setting van allo-transplant (NCCN guidelines v3.2020, PMID: 27959731). Daarenboven is dit type variant in het algemeen geassocieerd met een verminderde gevoeligheid voor chemotherapie vergeleken met wild-type TP53 (PMID: 31203995).</p> <p>Er werden geen andere (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in gevraagde regio's van ASXL1, CEBPA, DNMT3A, FLT3, IDH1/2, KIT, NPM1, RUNX1, TET2, TP53, WT1.@1@</p>	9
<p>Volgende varianten werden waargenomen:</p> <p>KIT, c.1679_1680delinsAG p.(Val560Glu), 22% VAF: Vermoedelijk pathogene mutatie</p> <p>TP53, c.818G>A p.(Arg273His), 33% VAF: Pathogeen, gekende hotspot mutatie</p> <p>KIT mutaties komen voor bij <5% van alle AML, maar er is wel een sterkere associatie met Core Binding Factor (CBF)-AML, waarbij KIT mutaties in 20-30% van de gevallen wordt waargenomen. De aanwezigheid van deze mutatie zou bij patiënten met t(8;21) een ongunstig effect hebben, met nood aan intensievere therapie, terwijl er bij patiënten met inv(16) geen duidelijk prognostisch effect werd aangetoond (PMID: 28297624,34003250).</p> <p>TP53 mutaties komen voor bij ongeveer 5-20% van de AML patiënten en dit voornamelijk bij t-AML (30 tot 70%). Deze komen vaak voor samen met een complex/monosomaal karyotype en zijn geassocieerd aan therapie resistentie en een zeer slechte prognose. De TP53 gemuteerde cellen vertonen een overlevingsvoordeel onder therapie. Selectieve epigenetische therapieën hebben effectiviteit aangetoond in de behandeling van TP53 gemuteerde AML (PMID:32569759,27276561; ELN2017, WHO2016).</p> <p>Voor volgende regio's werden geen sequentiedata bekomen: SMC3 exon 26 (bevat geen mutatie hotspot regio).@1@</p>	10
<p>Er werd een pathogene variant in het TP53 gen geïdentificeerd: TP53 c.818G>A p.(Arg273His). Deze variant heeft een significant klinisch belang (Tier I). Dit is een recurrente mutatie in de context van acute myeloïde leukemie (AML). Mutaties van TP53 komen voor in 12-13 % van de gevallen van AML en zijn geassocieerd met een ongunstige prognose [1].</p> <p>Referenties:</p> <p>[1] National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: acute myeloid leukemia, version 2.2022.@1@</p>	11

<p>Klinische indicatie: AML</p> <p>NGS toont aanwezigheid aan van varianten in de genen KIT en TP53:</p> <p>1) Een vermoedelijk pathogene missens variant (Val560Glu; V560E) in het KIT gen (VAF 22%): De variant is gelegen in het juxta-membraan gebied (exon 11) van KIT. Exon 11 KIT varianten worden voornamelijk teruggevonden bij solide tumoren zoals GIST en slechts heel sporadisch bij AML die meestal exon 17 varianten bevatten.</p> <p>KIT varianten worden in ongeveer 4-6% van alle AML patiënten teruggevonden, maar zijn sterk aangerijkt in CBF-AML waar 20-40% van de patiënten KIT positief zijn. Verschillende studies hebben aangetoond dat t(8;21) positieve CBF-AML met KIT varianten geassocieerd zijn met verminderde duur van remissie (EFS en RFS) alsook een verminderde algemene overleving. Echter het effect op EFS/RFS en OS bij inv(16) positieve CBF-AML (in casu) is niet duidelijk, met sommige studies die geen associatie aantonen (zie review Döhner et al., Blood, 2017 en NCCN guideline version 2.2022, AML). Het ongunstige effect van KIT varianten op de prognose is niet voor alle varianten hetzelfde (Yui et al., Ann Hematol 2017) en is dus ook afhankelijk van de aanwezige translocatie (Ayatollahi et al. Hematol Oncol Stem Cell Ther 2017 en Ishikawa et al., Blood advances 2020). Daarom werd in de ELN guideline (Döhner et al., Blood 2017) aanwezigheid van een KIT variant niet beschouwd als een reden om CBF-AML in een andere risico groep te klasseren. Voor patiënten met KIT positieve t(8;21) raad de NCCN guideline (v2.2022) wel aan om patiënten te includeren in klinische studies gericht op KIT of om een beenmerg transplantatie te overwegen.</p> <p>2) Een consensus pathogene missens variant (Arg273His) in het TP53 gen (VAF 33%): TP53 varianten komen bij ongeveer 6% van de AML patiënten voor en zijn geassocieerd met een heel slechte algemene overleving (Papaemmanuil et al., NEJM 2016). TP53 varianten zijn significant geassocieerd met AML met een complex of monosomaal karyotype (Döhner et al., Blood, 2017).</p> <p>Er konden geen varianten met een VAF >5% teruggevonden worden in de andere bij AML klinisch belangrijke genen (ASXL1, CEBPA, DNMT3A, FLT3, IDH1/2, NPM1, RUNX1, TET2 en WT1 (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: NGS profiel is in overeenstemming met aanwezigheid van AML (of secundaire AML uit MDS/CMML etc...). Gezien aanwezigheid van een TP53 variant behoort deze patiënt tot de ongunstige risico groep van de ELN en NCCN guidelines (Döhner et al., Blood 2017, NCCN guideline version 2.2022, AML). De aanwezigheid van een KIT variant is een mogelijke therapeutische target in CBF-AML. Verschillende studies onderzoeken de impact van toevoeging van dasatinib tijdens de behandeling van al dan niet KIT positieve CBF-AML (Boissel et al., Haematologica 2015 'French AML intergroup trial CBF-2006'; Paschka et al., Leukemia 2018 AMLSG 11-08 trial en Marcucci et al., Blood Advances CALGB 10801 trial).@1@</p>	12
<p>NGS analyse toont de aanwezigheid van een variant in TP53 met een significant klinisch belang (Tier I); c.818G>A p.(Arg273His). Mutaties in TP53 komen in 12-13% van patiënten met acute myeloïde leukemie voor en zijn geassocieerd met een ongunstige prognose.</p> <p>Referenties: NCCN Guidelines Version 1.2022 Acute Myeloid Leukemia.@1@</p>	13
<p>(Vermoedelijk) Pathogene KIT exon 11 variant gedetecteerd. KIT mutaties in AML zijn voornamelijk geassocieerd met core binding factor (CBF) AML en indicatief voor ongunstige prognose in patiënten met CBF-AML met t(8;21) (RUNX1::RUNX1T1). Te correleren met RNA fusie analyse en karyotypering. (Litzow MR. The increasing complexity of the management of core-binding factor acute myeloid leukemia. Haematologica 2020).</p> <p>TP53 mutaties zijn onderwerp van klinische studies bij MDS en AML ikv p53 reactivatie (Sallman DA et al. Eprenetapopt (APR-246) and Azacitidine in TP53-Mutant Myelodysplastic Syndromes. JCO 2021) (Cluzeau T et al. Eprenetapopt Plus Azacitidine in TP53-Mutated Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia: A Phase II Study by the Groupe Francophone des Myélodysplasies (GFM). JCO 2021).@1@</p>	14
<p>Er worden twee varianten gedetecteerd, in TP53 en KIT, die kunnen passen bij een diagnose van AML.</p> <p>Varianten in TP53 worden meestal gedetecteerd in AML met complex karyotype, maar zijn eigenlijk altijd gecorreleerd met een (zeer) slechte prognose, ongeacht het karyotype (Metzeler et al, Blood 2016 en Papaemmanuil et al., NEJM 2016). Volgens de ELN criteria behoren patiënten met een TP53 varianten tot de adverse risk categorie.</p> <p>Varianten in KIT worden teruggevonden in 20-30% van de 'core-binding factor (CBF)-AML', met t(8;21)/RUNX1::RUNX1T1 of inv(16)/CBFB::MYH11. Gezien de aanwezigheid van een TP53 variant is het echter weinig waarschijnlijk dat dit een CBF-AML is. Te correleren met FISH of translocatiescreening. De specifieke variant zoals hier aanwezig, is typisch voor een GIST (gastrointestinale stromale tumor), maar komt normaal niet voor bij AML. De specifieke impact van deze variant op de prognose is dus niet duidelijk.@1@</p>	15

<p>La présence du variant V600E au niveau de l'exon 11 du gène KIT entraîne une bonne réponse vis-à-vis de l'Imatinib. Cependant ce variant serait de pronostic défavorable dans le cas d'une LMA-CBF. La présence de la mutation pathogénique de TP53 est de pronostic défavorable pour cette LMA. @1 @</p>	16
<p>This variant's reference in COSMIC is COSV52660980.</p> <p>- Diagnosis: No specific WHO category related however TP53 mutations are significantly associated with "AML with complex and monosomal karyotype" and with abnormalities in chromosomes 5 and 7.</p> <p>- Prognosis: "Adverse" risk category based on the 2017 ELN recommendations (Döhner et al., BLOOD, 26 JANUARY 2017 x VOLUME 129, NUMBER 4). TP53 mutations have been reported in approximately 12%–13% of AML cases, and are associated with unfavorable risk and poor outcomes. Compared to TP53 deletions, TP53 mutations negatively impacted survival in AML months (36 vs. 9 months (Stengel A et al. Leukemia 2017). Outcomes with unfavorable-risk cytogenetics and TP53-mutated AML remain poor with conventional induction chemotherapy (Rückner FG, et al. Blood 2012;119:2114- 2121). Consider clinical trials, azacitidine/venetoclax (DiNardo CD, et al. N Engl J Med 2020;383:617-629), or a 10-day course of decitabine (Welch JS, et al. N Engl J Med 2016;375:2023-2036).</p> <p>References: NCCN Guidelines v2.2022. @1 @</p>	17
<p>Er werd een pathogene TP53 mutatie gedetecteerd, wat prognostisch ongunstig is in AML.</p> <p>Opmerking: het onderscheid tussen somatische en germline varianten kan met deze analyse niet gemaakt worden. Eventueel aan te vullen met germline testing en genetische counseling. @1 @</p>	18
<p>Aanwezigheid van een pathogene TP53 hotspotmutatie, c.818G>A (p.(Arg273His)). TP53 mutaties zijn recurrent in meerdere types van hematologische maligniteiten, waaronder acute myeloïde leukemie (AML).</p> <p>TP53-gemuteerde AML wordt geassocieerd met een complex karyotype en een slechtere prognose. TP53 mutaties zijn recurrent in AML met een verhoogde genomische instabiliteit (zoals therapy-related AML) (Molica et al., 2021. TP53 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Still a Daunting Challenge? Front. Oncol. 10:610820. doi: 10.3389/fonc.2020.610820; Hunter & Sallman, 2019. Current status and new treatment approaches in TP53 mutated AML. Best Practice & Research Clinical Haematology 32(2):134-144.). @1 @</p>	19

3.2.2. NGS-2022-5

<p>Aanwezigheid van vermoedelijk pathogene TP53 variant geassocieerd met MDS en slechtere prognose en met karyotype del(5 of 7q).@1@</p>	1
<p>Met next generation sequencing werden 2 vermoedelijk pathogene varianten gevonden in ASXL1 TP53. Mutaties in ASXL1 en TP53 (vooral als meer dan 1 hit) zijn geassocieerd met een ongunstige prognose in MDS (WHO 2017; Greenberg et al., JNCCN 2013; Bernard et al., Nature Medecine 2020). In MDS met isolated del(5q) zijn TP53 mutaties geassocieerd met een minder goed respons voor lenalidomide and korter overleving (WHO 2017). Te coreleren met cytogenetica.@1@</p>	2
<p>Varianten in TP53 komen voor in ongeveer 8% van de MDS patiënten, waarbij ze geassocieerd zijn aan een complex karyotype, excess aan blasten en duidelijk slechtere prognose.</p> <p>1. Arber et al. Blood 2016;127:2391-4052 2. Bejar et al. Haematologica 2014;99:956-64 3. Haferlach et al. Leukemia 2014;28:241-7@1@</p>	3
<p>De gevonden variant in TP53 kan voorkomen in de context van MDS. Ze is mogelijks prognostisch minder gunstig en is mogelijks geassocieerd met een complex karyotype (Ref: Kennedy and Ebert. J Clin Oncol 2017;35:968-74).@1@</p>	4
<p>Varianten in TP53 zijn recurrent in de context van MDS en worden geassocieerd met een complex karyotype en een zeer ongunstige prognose. De variant gedetecteerd bij deze patiënt werd nog niet eerder beschreven.</p> <p>(Ref: Döhner et al, Blood 2017. 129:1136-1152; Lodé et al., Haematologica 2018; 103(1): e13-e16)@1@</p>	5
<p>Sur les 41 gènes séquencés, seuls les 9 gènes cibles suivants ont été interprétés dans le cadre d'un syndrome myéodysplasique (MDS) : ASXL1, DNMT3A, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF1. Toutefois, les éventuels variants pathogènes (ou probablement pathogènes) observés dans les 32 autres gènes seront rapportés ci-dessous dans le résumé du rapport. 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 suppresseur de tumeur TP53 d'un variant probablement pathogénique, c.546_547insAC p.(Ser183Thrfs*65), de type perte de fonction. Les mutations dans le gène TP53 sont d'intérêt pronostic/thérapeutique dans les MDS (Intérêt pronostic et thérapeutique validé par le Compermed P2A et T1). Elles sont associées à un pronostic défavorable (WHO-2017, NCCN MDS v1-2022).@1@</p>	6
<p>Présence de variants des gènes ASXL1 et TP53.</p> <p>Les variants du gène ASXL1 sont des anomalies fréquentes des pathologies myéloïdes (15-25% des syndromes myéodysplasiques SMD) et sont largement associés à une péjoration du pronostic dans celles-ci. Dans les SMD, des études récentes démontrent un effet hautement délétère des variants du gène ASXL1 chez les patients traités par allogreffe avec une augmentation du risque de rechute et une diminution de la survie globale similaire à celles observées par le passage d'un groupe IPPS-R au suivant (p.e. intermediate risk -> high risk).</p> <p>Les variants du gène TP53 sont retrouvés dans 5-10% des SMD. Ils sont associés à certaines anomalies du caryotype (caryotype complexe, del 5q entre autres) et constituent un marqueur de mauvais pronostic avec un risque augmenté de transformation en leucémie aigüe. Chez les patients atteints de SMD traités par allogreffe, l'impact pronostique des variants TP53 est identique à celui décrit plus haut pour les variants ASXL1.</p> <p>En conclusion cette pathologie présente un profil moléculaire compatible avec un SMD de pronostic défavorable. Ces résultats doivent être intégrés à ceux de la cytogénétique, de la cytologie et de la clinique.@1@</p>	7
<p>Er wordt een variant in TP53 gedetecteerd. Varianten in het gen TP53 zijn recurrent in de context van MDS en worden geassocieerd met een complex karyotype en een ongunstige prognose (Ref: Swerdlow et al., WHO 2017; Kennedy and Ebert, J Clin Onc 2017. 35(9):968-974). Deze specifieke variant werd nog niet eerder beschreven in de context van MDS.</p> <p>Door de aanwezigheid van een variant in het TP53 gen in >30% van de allelen, kan een constitutionele origine niet worden uitgesloten. Te correleren met de familiegeschiedenis en de voorgeschiedenis.</p>	8

<p>In geval van een familiale kankergeschiedenis of een therapie gerelateerde kanker, is een kiembaanonderzoek (op niet-geïnvadeerd weefsel (nagels, haar)) aangewezen. @1@</p>	
<p>Er werd een TP53 (NM_000546.5(TP53):c.546_547insAC (p.(Ser183Thrfs*65)) vermoedelijk pathogene frameshift variant geïdentificeerd in exon 5. De aanwezigheid van dit type variant in MDS heeft significant klinisch belang (tier I). Varianten in TP53 komen frequent voor in therapie-geassocieerde MDS en geven aanleiding tot een ongunstige prognose (PMID: 27875374, 35073573, 32414002; NCCN guidelines MDS 2022, v1).</p> <p>Er werd een ASXL1 (NM_015338.5(ASXL1):c.1934dup (p.(Gly646Trpfs*12)) vermoedelijk pathogene frameshift variant geïdentificeerd in exon 13. De aanwezigheid van dit type variant heeft significant klinisch belang (tier II) en geeft in het algemeen een slechte prognose in MDS (NCCN guidelines MDS v1.2022; PMID: 30015104).</p> <p>Er werden geen andere (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in gevraagde regio's van ASXL1, DNMT3A, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF1. @1@</p>	9
<p>Volgende variant werd waargenomen: TP53, c.546_547insAC p.(Ser183ThrfsTer65), 42% VAF: Vermoedelijk pathogene mutatie</p> <p>TP53 mutaties komen voor bij 5-15% van de MDS patiënten (en tot 33% bij therapy related-MDS). Ze zijn geassocieerd met een complex/monosomaal karyotype, resistentie aan therapie en een zeer slechte prognose met hoog risico op leukemische evolutie. TP53 mutaties komen voor bij 15-20% van de del5q MDS en zijn daarbij geassocieerd aan relaps na of resistentie aan lenalidomide. (WHO2016; PMID 24030381) @1@</p>	10
<p>Er werd zowel een vermoedelijk pathogene variant in het TP53 gen als een vermoedelijk pathogene variant in het ASXL1 gen geïdentificeerd: resp. TP53 c.546_547insAC p.(Ser183Thrfs*65) en ASXL1 c.1934dup p.(Gly646Trpfs*12). Beide varianten hebben een significant klinisch belang (Tier I).</p> <p>Mutaties in TP53 komen globaal voor in 8-12 % van de gevallen van myelodysplastisch syndroom (MDS), met een hogere prevalentie in geval van een complex karyotype (50 %) of del(5q) (15-20 %). TP53 mutaties zijn in MDS geassocieerd met een ongunstige prognose. Bovendien is bij MDS met del(5q) de aanwezigheid van een TP53 mutatie geassocieerd met een slechtere respons op lenalidomide en een hoger risico op herval na lenalidomide [1].</p> <p>Mutaties in ASXL1 komen voor in 15-25 % van de gevallen van MDS en zijn geassocieerd met een ongunstige prognose [1].</p> <p>Referenties: [1] National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: myelodysplastic syndromes, version 3.2022. @1@</p>	11
<p>Klinische indicatie: MDS</p> <p>NGS toont aanwezigheid aan van varianten in de genen ASXL1 en TP53:</p> <p>1) Een vermoedelijk pathogene frameshift variant in het ASXL1 gen (VAF 10%): ASXL1 varianten komen bij ongeveer 5-20% van de MDS patiënten voor en zijn geassocieerd met een negatief effect op de algemene overleving (zie review Kennedy and Ebert, JCO, 2017), maar vooral wanneer er <5% blasten aanwezig zijn (Nazha and Bejar, Curr Hematol Malig Rep, 2017).</p> <p>2) Een vermoedelijk pathogene frameshift variant in het TP53 gen (VAF 45%): de frameshift variant is gelegen in het DNA-binding domein van TP53 maar werd nog niet beschreven in de de TP53 specifieke databanken (TP53 database (IARC) en TP53 website (Seshat)) en is in de COSMIC databank slechts één maal aanwezig. Gezien de VAF van ongeveer 50% kan er niet uitgesloten worden dat het hier om een aangeboren variant gaat. TP53 varianten worden teruggevonden bij ongeveer 10% van de MDS patiënten (Hou et al., Blood Cancer Journal 2018), maar meestal in hoog-risico MDS (MDS-EB1/2 of MDS-MLD). Aanwezigheid van TP53 varianten is dan ook geassocieerd met een kortere algemene overleving en transformatie naar AML (Hou et al., Blood Cancer Journal 2018, Bejar et al. NEJM, 2011). 30-50% van de MDS patiënten met TP53 varianten hebben daarenboven een complex karyotype (CK) (Bejar et al. NEJM, 2011). Binnen de groep van CK-MDS hebben TP53 gemuteerde patiënten minder varianten in andere</p>	12

<p>genen maar vaker een del(5q) afwijking, monosomaal karyotype en hoge complexiteit (> dan 5 cytogenetische afwijkingen) (Haase et al., Leukemia 2019). In de meer recente studie van Bernard et al. (Nature Medicine 2020) werd echter aangetoond dat bovenvermelde associaties enkel specifiek zijn voor multi-hit TP53 patiënten. Multi-hit TP53 patiënten hebben ofwel meerdere TP53 varianten ofwel één TP53 variant samen met LOH (cnLOH of deletie ter hoogte van de TP53 locus). Binnen de groep van mono-allelische TP53 werd wel vastgesteld dat patiënten met een VAF > 20% eveneens een kortere algemene overleving vertoonden en dat deze patiënten van dichtbij moeten opgevolgd worden eventueel met een extra analyse op een nieuw staal.</p> <p>Er konden geen varianten met VAF >5% teruggevonden worden in de andere bij MDS klinisch belangrijke genen (DNMT3A, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, TET2 en U2AF1 (opmerking: grote insertie/deletie varianten kunnen gemist worden.)</p> <p>Besluit: NGS analyse toont aanwezigheid van ASXL1 en TP53 varianten. De aanwezigheid van een multi-hit TP53 profiel kan op dit ogenblik niet volledig uitgesloten worden gezien 17/17p cnLOH of 'focal' del17p analyse niet werd uitgevoerd. Gezien ontbreken van o.a. karyotype en hematologische parameters is een IPSS-R risico-analyse en de mogelijke impact van de teruggevonden varianten op de IPSS-R score niet mogelijk. Ook andere prognostische scoringsmodellen zoals het recente IPSS-M kunnen hierdoor niet toegepast worden. @1@</p>	
<p>NGS analyse toont de aanwezigheid van 2 varianten met een significant klinisch belang (TIER I): ASXL1 c.1934dup; p.(Gly646Trpfs*12) en TP53 c.546_547insAC; p.(Ser183Thrfs*65). Mutaties in ASXL1 en TP53 zijn recurrent in MDS en zijn geassocieerd met een ongunstige prognose. In het bijzonder zijn TP53 mutaties geassocieerd met progressieve ziekte en kortere overleving na stamceltransplantatie.</p> <p>Referenties: NCCN Guidelines Version 3.2022 Myelodysplastic Syndromes. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues 2018. @1@</p>	13
<p>TP53 mutatie positief. TP53 mutaties in MDS zijn geassocieerd met complex karyotype en ongunstig klinisch verloop. Bovendien zijn TP53 mutaties in del(5q) MDS predictief voor verminderde respons op lenalidomide. Te correleren met karyotypering. (Haase D et al. TP53 mutation status divides myelodysplastic syndromes with complex karyotypes into distinct prognostic subgroups. Leukemia 2019) (Cumbo C et al. TP53 in Myelodysplastic Syndromes: Recent Biological and Clinical Findings. Int J Mol Sci 2020).</p> <p>TP53 mutaties zijn onderwerp van klinische studies bij MDS en AML ikv p53 reactivatie (Sallman DA et al. Eprenetapopt (APR-246) and Azacitidine in TP53-Mutant Myelodysplastic Syndromes. JCO 2021) (Cluzeau T et al. Eprenetapopt Plus Azacitidine in TP53-Mutated Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia: A Phase II Study by the Groupe Francophone des Myélodysplasies (GFM). JCO 2021).</p> <p>ASXL1 mutatie in (polyN) hotspot regio gedetecteerd. Aangezien deze variant in lage VAF (<10%) voorkomt, dient het met de nodige voorzichtigheid te worden geïnterpreteerd. Een technische (slippage) error of CHIP kan niet worden uitgesloten. (Montes-Moreno S et al. Clinical molecular testing for ASXL1 c.1934dupG p.Gly646fs mutation in hematologic neoplasms in the NGS era. PlosOne 2018). @1@</p>	14
<p>Er worden twee varianten gedetecteerd, in TP53 en ASXL1, die een diagnose van MDS kunnen bevestigen.</p> <p>Varianten in TP53 komen frequent voor bij patiënten met MDS (8-12%). In een recente studie wordt aangetoond dat TP53 varianten enkel een impact hebben op de prognose van de novo MDS indien ze bi-allelisch zijn (onder de vorm van TP53 varianten en/of 17p deletie). Bij mono-allelische patiënten is de outcome zeer afhankelijk van het aantal additionele driver varianten (5y OS indien enkel TP53 is 81% terwijl slechts 36% indien 1 of 2 additionele varianten aanwezig zijn en 26% met 3 of 4 additionele varianten en 8% met 5 of meer. Bij biallelische TP53 inactivatie heeft het aantal additionele varianten geen impact meer op de sowieso slechte prognose van 5y OS <6%) (Bernard et al., Nat Med 2020). Resultaat te correleren met aanwezigheid 17p deletie voor een correcte inschatting van de prognose.</p> <p>Varianten in ASXL1 worden frequent terug gevonden bij MDS (~25%) en hebben een negatieve impact op de prognose, ongeacht de IPSS-R klasse (NCCN MDS guidelines 1.2020; Bejar et al., Haematologica 2014). @1@</p>	15
<p>Dans le cadre d'un SMD, une mutation de TP53 confère un pronostic défavorable. @1@</p>	16
<p>ASXL1 p.(Gly646Trpfs*12)</p> <p>- Diagnosis:</p>	17

<p>The overall incidence of ASXL1 Nonsense or Frameshift mutation in MDS is 15-25%. Patients with pathogenic mutations with >10% variant allele frequency AND =2 somatic mutations, spliceosome gene mutations, or mutations of RUNX1 or JAK2 have positive predictive values for myeloid neoplasms (MDS, MPN, or AML). Isolated mutations of DNMT3A, TET2, and ASXL1 have less predictive value. DNMT3A, TET2, ASXL1, RUNX1, JAK2, PPM1D, TP53, and splicing factor genes are the most frequently mutated genes associated with CHIP.</p> <p>- Prognosis: independently associated with a poor prognosis in MDS and CMML. More frequent in CMML (40%–50%). Common in CHIP and CCUS. Mutations of TP53, EZH2, ETV6, RUNX1, and ASXL1 have been shown to predict decreased OS in multivariable models adjusted for IPSS or IPSS-R risk groups in several studies of distinct cohorts. Within IPSS risk groups, a mutation in one or more of these genes identifies patients whose survival risk resembles that of patients in the next highest IPSS risk group. When applied to patients stratified by the IPSS-R, the presence of a mutation in one or more of these five genes was associated with shorter OS for patients in the low- and intermediaterisk groups.</p> <p>TP53 p.(Ser183Thrsf*65)</p> <p>- Diagnosis: / - Prognosis: / - Predictive value: /</p> <p>Variant of unknown significance, "VUS". We couldn't provide any clinical recommendation (diagnosis/prognostic/predictive value not available). Regarding the 49% variant allele frequency (VAF), a germline origin could be suspected. Depending on the clinical and familial data a genetic counselling could be recommended (https://www.compermed.be/fr/workflows/myelodysplastic-syndromes-mds).</p> <p>References: NCCN Guidelines v3.2022. @1@</p>	
<p>Er werd een vermoedelijk pathogene TP53 mutatie gedetecteerd, wat prognostisch ongunstig is in MDS.</p> <p>Opmerking: het onderscheid tussen somatische en germline varianten kan met deze analyse niet gemaakt worden. Eventueel aan te vullen met germline testing en genetische counseling. @1@</p>	18
<p>Aanwezigheid van vermoedelijk pathogene TP53 variant geassocieerd met MDS en slechtere prognose en met karyotype del(5 of 7q). @1@</p>	19

3.2.3. NGS-2022-6

<p>Aanwezigheid van ASXL1 variant: dysplastische driver mutatie voor MDS (11-15%). Pre JAK event in MPN (7% ET/PV, 20% MF) geassocieerd met slechtere prognose.</p> <p>Aanwezigheid van de klassieke pathogene JAK2 variant geassocieerd met PV (95-99%), ET (50-70%) en MF (40-50%).</p> <p>Aanwezigheid van 2 pathogene SF3B1 varianten geassocieerd met primaire myelofibrose (10%) en PV en ET (3-5%).@1@</p>	1
<p>Met next generation sequencing werden 3 pathogene varianten gevonden in JAK2 en SF3B1 en een vermoedelijk pathogene variant gevonden in ASXL1.</p> <p>De JAK2 mutatie is een majeur criterium in de diagnose van MPN (WHO 2017).</p> <p>ASXL1 mutaties zijn beschreven in PMF. ASXL1 mutatie zijn geassocieerd met een minder gunstige prognose, vooral bij CALR negatief patiënten (WHO2017; Vannuchi et al., Leukemia 2013; Tefferi et al., Leukemia 2014).</p> <p>SF3B1 mutaties zijn beschreven in PMF maar zonder duidelijke prognostische betekenis.@1@</p>	2
<p>De gain-of-function variant JAK2 V617F komt voor in 50-60% van de patiënten met PMF. Overige varianten in JAK2 exon 12 of exon 14 worden eveneens beschreven bij PMF. De aanwezigheid van één van deze varianten vormt een majeur diagnostisch criterium voor PMF (WHO2016).</p> <p>Varianten in SF3B1 zijn in mindere mate beschreven bij patiënten met myeloproliferatieve aandoeningen (6% bij patiënten met PMF). Hun prognostische betekenis in deze ziekte entiteit is niet duidelijk.</p> <p>1. Arber et al. Blood 2016;127:2391-405 2. Tefferi et al. Leukemia 2010;24:1128-38 3. Barbui et al. Blood Cancer J 2015;5:e337 4. Lasho et al. Leukemia 2012;26:1135-7@1@</p>	3
<p>De gevonden variant in JAK2 is recurrent in de context van MPN, type primaire myelofibrose. In de context van myelofibrose wordt de aanwezigheid van een "driver" variant in JAK2 geassocieerd met een minder gunstige prognose dan CALR (Ref: Tefferi et al. Blood 2014;124:2507-13). De gevonden SF3B1 variant kan voorkomen in de context van MPN, type primaire myelofibrose (Boiocchi et al. Human pathology 2019;86:1-11).@1@</p>	4
<p>De aanwezigheid van een mutatie in JAK2 past bij de diagnose van primaire myelofibrose (PMF). Bij PMF zijn JAK2 (exon 14) mutaties geassocieerd met een minder gunstige prognose.</p> <p>Varianten in het SF3B1 gen (vooral in exon 14 en 15) zijn gekend in de context van PMF. SF3B1 varianten worden geassocieerd met de aanwezigheid van ringsideroblasten. Zhao et al. beschrijven een negatieve impact op MFS ('myelofibrosis free survival') bij SF3B1 en MPN-driver co-gemuteerde klonen.</p> <p>(Ref: Guglielmelli et al,Leukemia 2014;28(9):1804-1810, Swerdlow et al, WHO 2017; Kennedy and Ebert, J Clin Onc 2017;35(9):968-974, Mangaonkar et al, Blood Cancer Journal 2018;8(18):1-4, Zhao et al, 2020. Blood 136, Lasho et al, Leukemia 2012;26:1135-1137, Tefferi AJH 2014; 89(9):916-925)@1@</p>	5
<p>Sur les 41 gènes séquencés, seuls les 11 gènes suivants ont été interprétés dans le cadre d'une Myélofibrose primitive (PMF) : ASXL1, CALR, EZH2, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, SRSF2, SF3B1, TET2, TP53. Toutefois, les éventuels variants pathogéniques (ou probablement pathogéniques) observés dans les 30 autres gènes seront rapportés ci-dessous dans le résumé du rapport. 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> <ul style="list-style-type: none"> - Présence dans l'oncogène JAK2 du variant pathogénique c.1849G>T p.(Val617Phe) dont l'impact clinique est avéré. C'est la « mutation "driver", la plus fréquemment observée dans les myélofibroses et elle est associée à un pronostic plus favorable que les patients triples négatifs mais moins favorable que les patients CALR ou MPL muté (Tefferi ; Blood 2015-PMID 24402162 ; NCCN v1 2022). - Présence dans l'oncogène SF3B1 d'un variant pathogénique c.2098A>G p.(Lys700Glu) dont l'impact clinique est avéré. Dans le contexte des MPN, les mutations dans SF3B1 sont associées à un pronostic défavorable en terme de survie globale indépendamment du caryotype et de l'âge (Intérêt diagnostic et pronostic validé par le Compermed D1, P2A), (NCCN MPN v1.2022). - Présence également dans l'oncogène SF3B1 d'un autre variant pathogénique c.2225G>A p.(Gly742Asp) dont l'impact clinique est avéré. Dans le contexte des MPN, les mutations dans SF3B1 sont associées à un pronostic défavorable en terme de survie globale indépendamment du caryotype et de l'âge (Intérêt diagnostic et pronostic validé par le Compermed D1, P2A), (NCCN MPN v1.2022). -Présence dans le gène suppresseur de tumeur ASXL1 d'un variant probablement pathogénique c.1900_1922del p.(Glu635Argfs*15). Les mutations dans ASXL1 sont d'intérêt diagnostic et pronostic dans les MPN (validé par le Compermed D1, P1). Elles sont associées à un pronostic défavorable en 	6

<p>terme de survie globale (NCCN MPN v1.2022 ; Brecqueville, Haematologica 2013 PMID 23996481 ; TEFFERI, AJH 2016+2017 PMID 27870387+ PMID 29164670).@1@</p>	
<p>Présence de variants des gènes JAK2, SF3B1 et ASXL1.</p> <p>Le variant V617F du gène JAK2 constitue l'atteinte cardinale des syndromes myéloprolifératifs (SMP) et est retrouvé dans 60% des myélofibroses primitives (PMF).</p> <p>Les variants du gène ASXL1 sont retrouvés dans 10-20% des SMP (35% des PMF). Dans les PMF ils sont définis comme des anomalies moléculaires de haut risque selon les scores pronostiques MIPSS70+* et GIPSS**.</p> <p>Les variants du gène SF3B1 sont retrouvés dans +-10% des PMF. Leur impact pronostique n'est pas clairement défini mais pourrait être associé à une sensibilité à l'Imetelstat***.</p> <p>A noter que l'association JAK2/SF3B1 est cardinale dans les syndromes myélodysplasiques avec sidéroblastes en anneaux et thrombocytose (MDS-RS-T).</p> <p>EN CONCLUSION ce patient présente un profil moléculaire compatible avec une PMF ou un MDS-RS-T. Dans le cas d'une PMF, ce profil est associé à une péjoration du pronostic selon les scores MIPSS70+ et GIPSS.</p> <p>* MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis, Tefferi & al. Journal of Clinical Oncology. 2018</p> <p>** Driver mutations and prognosis in primary myelofibrosis: Mayo-Careggi MPN alliance study of 1,095 patients, Tefferi & al. American Journal of Hematology. 2018</p> <p>*** A Pilot Study of the Telomerase Inhibitor Imetelstat for Myelofibrosis. Tefferi & al. NEJM 2015@1@</p>	7
<p>Varianten in de genen SF3B1 en JAK2 zijn recurrent in de context van een MPN, type myelofibrose.</p> <p>In de context van myelofibrose wordt de aanwezigheid van een "driver" mutatie in JAK2 geassocieerd met een minder gunstige prognose dan CALR (Ref: Tefferi et al., Blood 2014. 124(16): 2507-2513; Shammo and Stein, 2016 ASH Educ. Program: 552-560).</p> <p>Moleculaire scores voor de varianten: - GIPSS: 1 (Ref: Tefferi et al., Leukemia (2018) 32:1631-1642). - MIPSS+70 version 2: 2 (Ref: Tefferi A et al: (2018) JCO 17 :1769-1770)@1@</p>	8
<p>Er werd een SF3B1 (NM_012433.3(SF3B1):c.2225G>A (p.(Gly742Asp)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 16.</p> <p>Er werd een SF3B1 (NM_012433.3(SF3B1):c.2098A>G (p.(Lys700Glu)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 15.</p> <p>De aanwezigheid van dit type varianten in PMF heeft mogelijk klinisch belang (tier II). SF3B1 varianten komen voor in ongeveer <10% van de patiënten met PMF (PMID: 27521306).</p> <p>Er werd een JAK2 (NM_004972.3(JAK2):c.1849G>T (p.(Val617Phe)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 14.</p> <p>De aanwezigheid van deze specifieke variant in PMF heeft significant klinisch belang (tier I). Deze komt voor bij 50% van primaire myelofibrose en is geassocieerd met een intermediaire prognose (median OS = 9jaar) (NCCN guidelines v2.2022; PMID: 15781101 en 26697989). Deze variant is geassocieerd met gevoeligheid aan JAK inhibitoren zoals Ruxolitinib (NCCN guidelines v2. MPN 2022).</p> <p>Er werden geen andere (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in gevraagde regio's van ASXL1, CALR, EZH2, IDH1/2, JAK2, MPL, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF1).@1@</p>	9
<p>Volgende varianten werden waargenomen: ASXL1, c.1900_1922del p.(Glu635ArgfsTer15), 3.5% VAF: Vermoedelijk pathogene mutatie JAK2, c.1849G>T p.(Val617Phe), 27% VAF: Pathogeen, gekende hotspot mutatie SF3B1, c.2098A>G p.(Lys700Glu), 6% VAF: Pathogeen, gekende hotspot mutatie SF3B1, c.2225G>A p.(Gly742Asp), 42% VAF: Pathogeen, gekende hotspot mutatie</p> <p>ASXL1 mutaties komen frequent voor bij PMF (25-35%) en impliceren een slechte prognose met een verhoogd risico op leukemische evolutie (zie MIPSS70+ en GIPSS score). Anderzijds zijn ASXL1 mutaties ook aanwezig bij gezonde oudere personen (Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential CHIP: 10% op de leeftijd van 80j). Pathogene mutaties met een VAF van >10% en aanwezigheid van meerdere somatische mutaties hebben een positieve predictieve waarde voor het ontwikkelen van een neoplasme (MDS, MPN of AML). Geïsoleerde mutaties in ASXL1 aan een lage VAF (<10%) zijn veel minder geassocieerd met ontwikkelen van een myeloid neoplasme. (NCCN guidelines, WHO2016, PMID: 33197049)</p> <p>JAK2 mutaties komen frequent voor bij PMF (50%-65%), maar ook bij andere MPN en MDS/MPN overlap aandoeningen. Hoewel niet essentieel, is de aanwezigheid van een JAK2 variant van</p>	10

<p>diagnostisch belang bij PMF (zie WHO 2016). JAK2 V617F is prognostisch ongunstiger dan CALR type 1-mutante PMF, doch heeft een betere prognose dan MPL gemuteerde en triple negative PMF. JAK2-inhibitoren hebben een plaats binnen de behandeling van PMF, en ook andere (MPN)-aandoeningen. Gezien JAK2-inhibitoren op specifieke wijze inflammatoire cytokines onderdrukken, is hun werking onafhankelijk van de aanwezigheid van JAK2 varianten.</p> <p>SF3B1 mutaties komen voor bij 5-10% van de PMF, zonder duidelijk prognostisch effect. SF3B1 varianten zijn sterk geassocieerd met de aanwezigheid van ringsideroblasten en frequent aanwezig bij MDS/MPN-RS-T, (en zeldzamer bij PV en ET), waarbij de aanwezigheid van deze variant geassocieerd is met een hoger risico op fibrotische transformatie (PMID: 33293830; 32573691; WHO2016; NCCN guidelines).@1@</p>	
<p>Er werden twee varianten met een significant klinisch belang (Tier I) geïdentificeerd, namelijk een pathogene variant in het JAK2 gen en een vermoedelijk pathogene variant in het ASXL1 gen: resp. JAK2 c.1849G>T p.(Val617Phe) en ASXL1 c.1900_1922del p.(Glu635Argfs*15) (met voor deze tweede variant weliswaar slechts een allelfrequentie van 4.5 %). Daarnaast werd een pathogene variant met een mogelijk klinisch belang (Tier II) geïdentificeerd in het SF3B1 gen: SF3B1 c.2098A>G p.(Lys700Glu).</p> <p>De JAK2 c.1849G>T p.(Val617Phe) mutatie wordt aangetroffen in 50-60 % van de patiënten met primaire myelofibrose (PMF) [1,2]. De aanwezigheid van een JAK2 mutatie vormt een majeur WHO-criterium voor diagnose van PMF [1]. De JAK2 c.1849G>T p.(Val617Phe) mutatie is in PMF geassocieerd met een intermediaire prognose en een hoger risico op trombose in vergelijking met patiënten met een CALR mutatie [2,3].</p> <p>Zowel ASXL1 mutaties als SF3B1 mutaties zijn recurrent in PMF [2]. De aanwezigheid van een ASXL1 mutatie is geassocieerd met een minder gunstige prognose in PMF (associatie met een verminderde globale overleving en verminderde leukemievrije overleving evenals met een verminderde progressievrije overleving na hematopoëtische stamceltransplantatie) [2].</p> <p>Referenties: [1] Swerdlow SH et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (revised 4th edition). IARC: Lyon 2017. [2] National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: myeloproliferative neoplasms, version 2.2022. [3] PMID 24986690.@1@</p>	11
<p>Klinische indicatie: PMF</p> <p>NGS toont aanwezigheid aan van varianten in de genen ASXL1, JAK2 en SF3B1:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Een vermoedelijk pathogene frameshift variant in het ASXL1 gen (VAF 9%): ASXL1 varianten worden bij 12-75% van de patiënten met PMF teruggevonden. ASXL1 varianten zijn geassocieerd met een slechte algemene en leukemie-vrije overleving (Tefferi A et al. Leukemia 2014, Tefferi Am. J. Hematol. 2016). 2) De gekende, consensus pathogene missens variant Val617Phe in het JAK2 gen (VAF 29%): aanwezigheid van deze variant is compatibel met aanwezigheid van een myeloproliferatieve neoplasie type PMF. JAK2 varianten worden bij ongeveer 65% PMF patiënten teruggevonden (Tefferi et al., Am J Hematol 2018; zie review Palandri et al., Annals of Hematol. 2019). 3) De gekende, consensus pathogene missens variant Lys700Glu in het SF3B1 gen (VAF 12%): SF3B1 varianten worden in ongeveer 2-7% van de PMF patiënten teruggevonden. Het effect op prognose bij PMF is niet duidelijk. <p>Er konden geen varianten met VAF >5% teruggevonden worden in de andere bij ET/PMF klinisch belangrijke genen (CALR, EZH2, IDH1/2, MPL, SRSF2, TET2, TP53 en U2AF1 (opmerking: grote insertie/deletie varianten kunnen gemist worden.)</p> <p>Besluit: NGS profiel in overeenstemming met aanwezigheid van PMF. Wegens ontbreken van karyotype en hematologische parameters is een risico-analyse volgens de MIPSS70, MIPSS70-plus v2.0 en GIPSS niet mogelijk (Guglielmelli et al., JCO 2018; Tefferi et al., JCO 2018 en Tefferi et al., Leukemia 2018). De afwezigheid van een CALR variant (in casu) en aanwezigheid van een ASXL1 variant (in casu) zijn in deze modellen ongunstige risico-factoren.</p> <p>In 2018 werden patiënten met MPN op basis van de genomische afwijkingen geclassificeerd in 8 genomische subgroepen met verschillende prognoses en risico voor transformatie naar MF en/of AML (Grinfeld et al., NEJM 2018). Door de aanwezigheid van de ASXL1 variant behoort deze patiënt in dit model tot de 'MPN with chromatin or spliceosome mutations'. Deze varianten komen meer voor bij patiënten met PMF of MDS/MPN maar komen ook voor bij 8,4% van de ET patiënten en 11,5% PV patiënten. Patiënten hebben een verhoogd risico voor transformatie naar myelofibrose en hebben een</p>	12

<p>kortere 'event-vrije' overleving ongeacht het myeloproliferatieve subtype of de aanwezige 'driver' variant. @1@</p>	
<p>NGS analyse toont de aanwezigheid van 3 varianten met significant klinisch belang (Tier I); SF3B1 c.2098A>G p.(Lys700Glu), JAK2 c.1849G>T p.(Val617Phe) en ASXL1 c.1900_1922del p.(Glu635Argfs*15) (allelfrequentie slechts 4.1%)*.</p> <p>De JAK2 c.1849G>T mutatie komt voor bij 50-60% van patiënten met myelofibrose. Deze mutatie is geassocieerd met een intermediaire prognose en hoger risico op trombose (1).</p> <p>De aanwezigheid van mutaties in het SF3B1 en ASXL1 gen passen bij een klonale hematopoëse. In myelofibrose is een ASXL1 mutatie geassocieerd met een ongunstige prognose (verminderde leukemie-vrije overleving en lagere progressie-vrije overleving na stamceltransplantatie)(1,2).</p> <p>Referenties (1) NCCN Guidelines Version 2.2022 Myeloproliferative Neoplasms. (2) Froyen G, Le Mercier M, Lierman E, et al. 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. Cancers. 2019, 11, 2030.</p> <p>*Door de lageallelfrequentie kan een vals positief resultaat niet uitgesloten worden. @1@</p>	13
<p>Pathogene JAK2 en SF3B1 mutaties als klonale merkers voor MPN (PMF, ET) (Boiocchi L et al. Clinicopathological and molecular features of SF3B1-mutated myeloproliferative neoplasms. Hum Pathol 2019). @1@</p>	14
<p>Er worden vier varianten gedetecteerd die kunnen passen bij een diagnose van primaire myelofibrose (PMF).</p> <p>Er worden twee varianten in SF3B1 gedetecteerd, waarvan één aan een hoge frequentie (38%) en één aan een lage frequentie (6%). SF3B1 varianten komen sporadisch voor bij PMF (10%) en hebben geen duidelijke impact op de prognose (Boiocchi et al., Human Pathology 2019).</p> <p>De JAK2 V617F variant resulteert in een intermediaire risk, maar nog verder te correleren met eventuele afwijkingen in het karyotype (Tefferi et al., Leukemia 2018).</p> <p>Finaal wordt ook een ASXL1 variant gedetecteerd, maar slechts aan een lage frequentie. Bij patiënten met MF zijn varianten in ASXL1, zeker in afwezigheid van een CALR variant, gecorreleerd met een zeer slechte OS (Tefferi et al., Blood Adv 2017 en Leukemia 2014). @1@</p>	15
<p>La présence de la mutation V617F au niveau du gène JAK2 est un critère diagnostique majeur et thérapeutique dans le cadre d'une PMF. Les mutations au niveau du gène SF3B1, souvent associée aux mutation JAK2, sont aussi des critères diagnostique majeur d'une PMF. @1@</p>	16
<p>Diagnosis:</p> <p>The driver mutation JAK2 V617F does represent a major criteria for the diagnosis of MPN based on the 2017 WHO rules. Please take care that in the case of an ET diagnosis, the two SF3B1 mutations identified would have been associated with bad prognosis (MIPSS-ET). Please refer to the bone marrow trephine biopsy report for specific sub-diagnosis (pré-fibrotic PMF vs ET).</p> <p>Prognostic (PMF):</p> <ul style="list-style-type: none"> - JAK2 V617F: Intermediate prognosis and higher risk of thrombosis compared to patients with CALR mutation. - ASXL1: Independently associated with inferior OS and leukemia-free survival as well as lower progression-free survival (PFS) following HCT. - Absence of CALR-type-1 mutation: inferior OS. Survival longest for CALR(+)ASXL1(-) patients (median 10.4 years) and shortest in CALR(-) ASXL1(+) patients (median 2.3 years). <p>Several "risk assesement tools" have recently been published among which MIPSS-70 and MIPSS-70+ Version 2. The presence and the number (>=2) of mutation(s) in any of the following genes: ASXL1, EZH2, SRSF2, or IDH1/2 (MIPSS-70) or U2AF1 Q157 (MIPSS-70+) is considered "High Molecular Risk, HMR".</p> <p>See NCCN guidelines MPN v2.2022 for details. @1@</p>	17

<p>Er werd een JAK2 V617F mutatie gedetecteerd passend bij de diagnose van een MPN. Bijkomend werd ook een SF3B1 mutatie gedetecteerd wat geassocieerd is met het voorkomen van ringsideroblasten. Aan te vullen met ijzerkleuring op een beenmergpreparaat. Te correleren met de hematologische en morfologische bevindingen voor DD: MPN (PMF?) en MPN/MDS (-RS-T). Trombocytose? Bijkomend ook nog detectie van een ASXL1 mutatie. Prognostisch ongunstig mutatieprofiel. @1@</p>	18
<p>Aanwezigheid van ASXL1 variant: dysplastische driver mutatie voor MDS (11-15%). Pre JAK event in MPN (7% ET/PV, 20% MF) geassocieerd met slechtere prognose. Aanwezigheid van de klassieke pathogene JAK2 variant geassocieerd met PV (95-99%), ET (50-70%) en MF (40-50%). Aanwezigheid van 2 pathogene SF3B1 varianten geassocieerd met primaire myelofibrose (10%) en PV en ET (3-5%). @1@</p>	19

3.3. Interpretatie van het individueel rapport

Naast dit algemene rapport kreeg u ook een individueel rapport. Hieronder vindt u informatie die kan helpen bij de interpretatie van dit rapport. De positie van uw kwantitatieve resultaten wordt gegeven in vergelijking met alle resultaten van alle deelnemers en alle methoden samen.

De volgende gegevens worden vermeld:

- Uw resultaat (R)
- De mediaan (MAF):
de middenwaarde van de resultaten van alle laboratoria en alle methoden samen.
- De algemene standaarddeviatie (SD):
de maatstaf van de spreiding van de resultaten van alle laboratoria, alle methoden samen.
- De Z-score:
het verschil tussen uw resultaat en de mediaan (uitgedrukt in standaarddeviatie-eenheden):
 $Z = (R - \text{MAF}) / \text{SD}$
Uw resultaat wordt genoemd als **IZI > 3**.
- De grafische interpretatie van de positie van uw resultaat (R) in vergelijking met alle resultaten van alle deelnemers, gebaseerd op de methode van Tukey, voor elke parameter en voor elk geanalyseerd staal.

Deze parameters geven u een ruwe indicatie van de positie van uw resultaat (R) ten opzichte van de mediaan (MAF).

U kan meer details vinden in de brochures die beschikbaar zijn op onze website op het volgende adres:

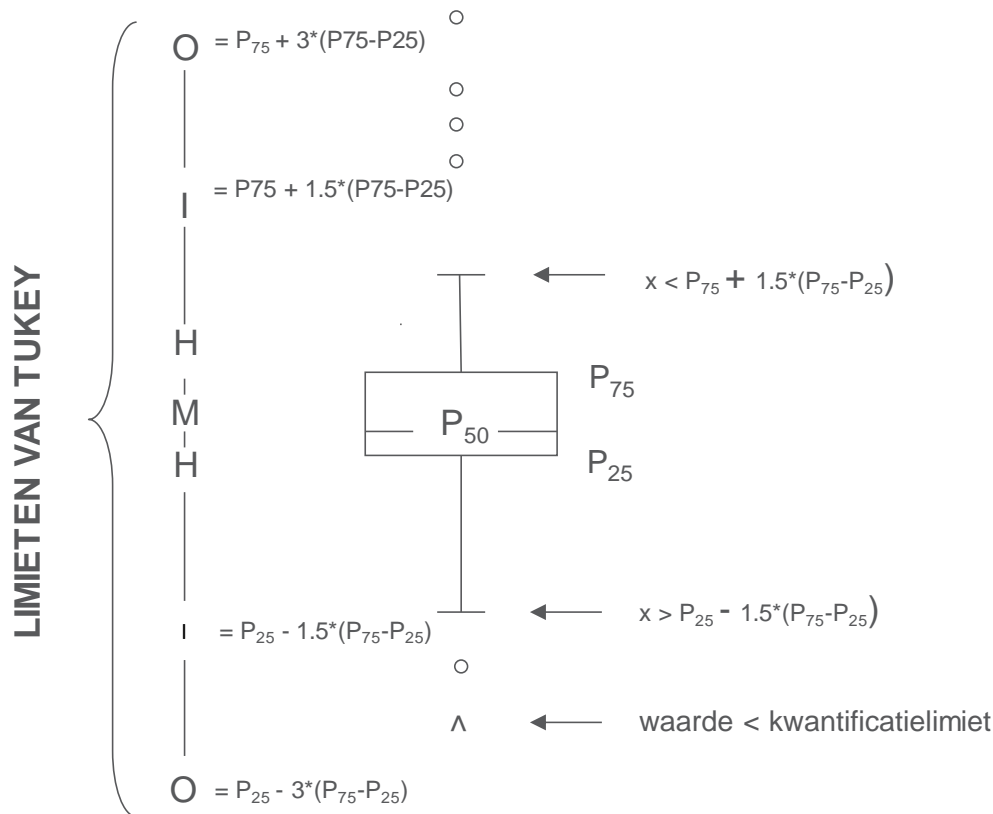
<https://www.sciensano.be/nl/externe-kwaliteitsevaluatie/klinische-gezondheid-eke-klinische-biologie>

- Algemene informatiebrochure EKE
- Statistische methoden gebruikt voor EKE
- Verwerking van gecensureerde waarden

Grafische voorstelling

Naast de tabellen met de resultaten, wordt er soms een grafische voorstelling van de resultaten als “box en whisker plot” toegevoegd. Zij bevat de volgende elementen:

- een rechthoek die gaat van percentiel 25 (P_{25}) tot percentiel 75 (P_{75})
- een centrale lijn die de mediaan van de resultaten voorstelt (P_{50})
- een ondergrens die de kleinste waarde voorstelt $x > P_{25} - 1.5 * (P_{75} - P_{25})$
- een bovengrens die de grootste waarde voorstelt $x < P_{75} + 1.5 * (P_{75} - P_{25})$
- alle punten buiten dit interval worden voorgesteld door een cirkel.



Overeenkomstige limieten in geval van een normale verdeling

EINDE

© Sciensano, Brussel 2023.

Dit rapport mag niet gereproduceerd, gepubliceerd of verdeeld worden zonder akkoord van Sciensano. De individuele resultaten van de laboratoria zijn vertrouwelijk. Zij worden door Sciensano niet doorgegeven aan derden, noch aan de leden van de Commissie, de expertencomités of de werkgroep EKE.