

**EXPERTISE, DIENSTVERLENING EN KLANTENRELATIES**  
**KWALITEIT VAN LABORATORIA**  
**AD HOC COMITE VAN EXPERTS**  
**BENCHMARKSTUDIE**

**DEFINITIEF GLOBAAL RAPPORT**  
**Next Generation Sequencing (NGS)**  
**2017/2**

**Sciensano/NGS benchmarkstudie/2-NL**

Expertise, dienstverlening en klantenrelaties  
Kwaliteit van laboratoria  
Juliette Wytsmanstraat 14  
1050 Brussel | België

[www.sciensano.be](http://www.sciensano.be)


<b>AD HOC COMITE VAN EXPERTS</b>
----------------------------------

<b>Sciensano</b>					
Pannis M.	Secretariaat	Tel:	02/642.55.22	Fax:	02/642.56.45
Aline Antoniou	Enquêtecöördinator	Tel:	02/642.55.27		
		e-mail:	<a href="mailto:Aline.Antoniou@sciensano.be">Aline.Antoniou@sciensano.be</a>		
Vanessa Ghislain	Vervangend enquêtecöördinator	Tel:	02/642.52.08		
		e-mail:	<a href="mailto:Vanessa.Ghislain@sciensano.be">Vanessa.Ghislain@sciensano.be</a>		
<b>Experts</b>	<b>Instelling</b>				
Dr. Philippe Aftimos	Instituut Jules Bordet	Tel:	+32 2 541 32 08	Fax:	+32 2 541 32 19
		e-mail:	<a href="mailto:philippe.aftimos@bordet.be">philippe.aftimos@bordet.be</a>		
Dr. Valérie Capraro	CHU-ULG	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:valerie.capraro@chu.ulg.ac.be">valerie.capraro@chu.ulg.ac.be</a>		
Dr. Els Dequeker	UZ Leuven	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:els.dequeker@uzleuven.be">els.dequeker@uzleuven.be</a>		
Dr. Nicky d'Haene	ULB-Erasme	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Nicky.D.Haene@erasme.ulb.ac.be">Nicky.D.Haene@erasme.ulb.ac.be</a>		
Dr. Helena Devos	AZ Sint-Jan	Tel:	050 45 96 55	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Helena.Devos@azsintjan.be">Helena.Devos@azsintjan.be</a>		
Dr. Guy Froyen	Jessa Ziekenhuis	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Guy.Froyen@jessazh.be">Guy.Froyen@jessazh.be</a>		
Dr. Jacobs Koen	AZ Sint-Lucas	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Koen.Jacobs@AZSTLUCAS.BE">Koen.Jacobs@AZSTLUCAS.BE</a>		
Dr. Frédéric Lambert	CHU-ULG	Tel:	+32 4 366 25 47	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:frederic.lambert@chu.ulg.ac.be">frederic.lambert@chu.ulg.ac.be</a>		
Dr. Suzan Lambin	UZA	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:suzan.lambin@uza.be">suzan.lambin@uza.be</a>		
Dr. Els Lierman	UZ Leuven	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:els.lierman@uzleuven.be">els.lierman@uzleuven.be</a>		
Dr. Friedel Nollet	AZ Sint-Jan	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Friedel.Nollet@azsintjan.be">Friedel.Nollet@azsintjan.be</a>		
Dr. Patrick Pauwels	UZA	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Patrick.Pauwels@uza.be">Patrick.Pauwels@uza.be</a>		
Dr. Roberto Salgado	GZA Ziekenhuis	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:roberto@salgado.be">roberto@salgado.be</a>		
Dr. Karl Vandepoele	UZ Gent	Tel:	+32 9 332 0553	Fax:	+32 9 332 4985
		e-mail:	<a href="mailto:Karl.Vandepoele@uzgent.be">Karl.Vandepoele@uzgent.be</a>		
Dr. Pascal Vannuffel	IPG	Tel:	071 44 71 32	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:pascal.vannuffel@ipg.be">pascal.vannuffel@ipg.be</a>		
Dr. Christine Weyn	UZA	Tel:	+32 3 821 59 57	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Christine.Weyn@uza.be">Christine.Weyn@uza.be</a>		
Aline Hébrant	Sciensano	Tel:	+32 2 642 57 32	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Aline.Hebrant@sciensano.be">Aline.Hebrant@sciensano.be</a>		
Els Van Valckenborgh	Sciensano	Tel:	+32 2 642 54 96	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Els.VanValckenborgh@sciensano.be">Els.VanValckenborgh@sciensano.be</a>		
Marc Van den Bulcke	Sciensano	Tel:	+32 2 642 57 60	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Marc.VandenBulcke@sciensano.be">Marc.VandenBulcke@sciensano.be</a>		

Philippe Van de Walle	Sciensano	Tel:	+32 2 642 52 00	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Philippe.VandeWalle@sciensano.be">Philippe.VandeWalle@sciensano.be</a>		
Wim Coucke	Sciensano	Tel:	+32 2 642 55 23	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Wim.Coucke@sciensano.be">Wim.Coucke@sciensano.be</a>		
Thomas Delcourt	Sciensano	Tel:	+32 2 642 55 99	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Thomas.Delcourt@sciensano.be">Thomas.Delcourt@sciensano.be</a>		

Een conceptversie van dit rapport werd naar de experts gestuurd op:16/04/2018 .  
Dit rapport is besproken tijdens de vergadering van de *ad hoc* expertcommissie op:14/05/2018.

**Toestemming verspreiding rapport:** Door Aline Antoniou, coördinator van de NGS-benchmarkstudie, op 14/06/2018.



Alle rapporten zijn ook beschikbaar op onze website:  
[https://www.wiv-isp.be/QML/activities/NGS/nl/rapports\\_annee.htm](https://www.wiv-isp.be/QML/activities/NGS/nl/rapports_annee.htm)

# INHOUDSTAFEL

<b>1. INLEIDING .....</b>	<b>5</b>
1.1. Doel van de NGS-benchmarkstudie voor hematologische myeloïde tumoren .....	5
1.2. Uitbestede activiteit .....	5
1.3. Materiaal .....	5
1.4. Vraag .....	5
1.5. Antwoordformulier .....	7
1.6. Slaagcriteria .....	7
<b>2. RESULTATEN .....</b>	<b>8</b>
2.1. Deelname aan de NGS-benchmarkstudie .....	8
2.2. Overzicht van de methoden .....	8
2.3. Overzicht van de resultaten .....	12
2.4. Overzicht van klinische/biologische interpretaties .....	13
<b>3. BESPREKING VAN DE RESULTATEN, DISCUSSIE EN AANBEVELINGEN .....</b>	<b>14</b>
3.1. Kunstmatige varianten Horizon .....	14
3.2. Onverwachte resultaten voor endogene varianten gevalideerd met ddPCR .....	14
3.3. Herhaalbaarheid van de resultaten .....	15
3.4. Standaardisatie van klinische rapporten en klinische/biologische interpretatie .....	15
3.5. Referenties van beoordeelde genomische regio's .....	16
<b>4. BIJLAGE .....</b>	<b>17</b>
4.1. Klinische/biologische interpretaties: staal NGS-2017-005 .....	17
4.1.1. Varianten gevalideerd met ddPCR .....	17
4.1.2. Varianten gerapporteerd door minstens 2/3 van de laboratoria en niet gevalideerd met ddPCR .....	21
4.1.3. Varianten gerapporteerd door minder dan 2/3 van de laboratoria en niet gevalideerd met ddPCR .....	24
4.2. Klinische/biologische interpretaties: staal NGS-2017-006 .....	26
4.2.1. Varianten gevalideerd met ddPCR .....	26
4.2.2. Varianten gerapporteerd door minstens 2/3 van de laboratoria en niet gevalideerd met ddPCR .....	29
4.2.3. Varianten gerapporteerd door minder dan 2/3 van de laboratoria en niet gevalideerd met ddPCR .....	31
4.3. Klinische/biologische interpretaties: staal NGS-2017-007 .....	32
4.3.1. Varianten gevalideerd met ddPCR .....	32
4.3.2. Varianten gerapporteerd door minstens 2/3 van de laboratoria en niet gevalideerd met ddPCR .....	34
4.3.3. Varianten gerapporteerd door minder dan 2/3 van de laboratoria en niet gevalideerd met ddPCR .....	35
4.4. "Boxplot" voor de varianten van het staal NGS-2017-005 .....	37
4.5. "Boxplot" voor de varianten van het staal NGS-2017-006 .....	38
4.6. "Boxplot" voor de varianten van het staal NGS-2017-007 .....	39
4.7. Interpretatie van het individueel rapport .....	40

## 1. INLEIDING

In januari 2016 is het Kankercentrum van het WIV begonnen met de uitvoering van een nationaal proefproject voor de invoering van de NGS-technologie in onze gezondheidszorg. Het project, dat over een periode van 5 jaar wordt gespreid, heeft als doel om deze nieuwe technologie succesvol in de klinische praktijk te integreren met behulp van concrete acties. Om de kwaliteit van de testresultaten te beoordelen, organiseerden het Kankercentrum en de dienst Kwaliteit van laboratoria van Sciensano een benchmarkstudie voor de detectie van de zogenaamde "actionable" mutaties in hematologische myeloïde tumoren met doelgerichte NGS.

Alle informatie over de NGS-proefstudie is te vinden op het platform NGS Roadbook: <https://e-cancer.wiv-isp.be/roadbook/>

### 1.1. Doel van de NGS-benchmarkstudie voor hematologische myeloïde tumoren

Het doel van deze benchmarkstudie is om een inventaris op te maken van de manier waarop de varianten in een tumorstaal worden gedetecteerd, geselecteerd en gerapporteerd in klinische protocollen. Deze studie richt zich uitsluitend op de beoordeling van specifieke parameters voor hematologische myeloïde tumoren.

### 1.2. Uitbestede activiteit

De genomische DNA-stalen werden geproduceerd door de firma Horizon en worden verdeeld door de firma AmpliTech (Frankrijk).

### 1.3. Materiaal

Het materiaal voor deze studie bestond uit 3 buisjes met genomisch DNA afkomstig uit goed gekarakteriseerde gemengde cellijnen (NGS-2017-005, 006 en 007).

De mutatieprofielen van deze 3 multiplexen werden "à façon" gekozen omwille van de volgende functies:

- soorten varianten aanwezig in de multiplex
- allelfrequentie van de variant
- aantal varianten per multiplex

Verskillende varianten in verschillende klinisch relevante genen zijn gekozen voor het steekproefontwerp voor:

- AML of acute myeloblastische leukemie (stalen NGS-2017-005)
- Myeloproliferatieve neoplasie (MPN) - (prefibrotische) primaire myelofibrose (stalen NGS-2017-006)
- Myelodysplastische syndromen (MDS) (stalen NGS-2017-007)

Twaalf varianten werden gevalideerd door ddPCR. De allelfrequenties voor deze varianten varieerden tussen 3 en 50%

Horizon staat garant voor de homogeniteit en de stabiliteit van de stalen.

### 1.4. Vraag

Er is gevraagd om de NGS-analyses uit te voeren volgens de geldende procedures in het laboratorium. Verder werd ook benadrukt dat de verwerking van de stalen identiek aan die van patiëntstalen moest zijn.

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

NGS-2017-005: Acute myeloblastische leukemie (AML)

NGS-2017-006: Myeloproliferatieve neoplasie (MPN) - (prefibrotische) primaire myelofibrose

NGS-2017-007: Myelodysplastische syndromen (MDS)

Elk deelnemend laboratorium moest elk multiplex-staal drie keer analyseren (*triplicates* van elke multiplex). Replicaten van elk multiplexstaal moesten in dezelfde analysestroom plaatsvinden. Bij de opbouw van bibliotheken moesten deze herhalingen echter als afzonderlijke stalen worden beschouwd en derhalve met verschillende barcodes worden geïdentificeerd en onafhankelijk van elkaar met bio-informatische hulpmiddelen worden geanalyseerd.

Alleen regio's die op ComPerMed-bijeenkomsten als klinisch bruikbaar in de context van hematologische oncologie zijn gedefinieerd, moeten door de laboratoria worden gemeld. Deze regio's worden gedetailleerd weergegeven in de lijsten hieronder:

#### **NGS-2017-005: Acute myeloblastische leukemie (AML):**

##### Genen:

*ASXL1 (exon 12)*

*CEBPA (alle exonen)*

*DNMT3A (exonen 8-23)*

*FLT3 (exon 14, exon 15, exon 20-codon 835)*

*IDH1 (exon 4-hotspot)*

*IDH2 (exon 4-hotspot)*

*KIT (exon 8, exon 10, exon 17)*

*NPM1 (exon 11-codon 288)*

*RUNX1 (alle exonen)*

*TET2 (exon 3, exonen 9-11)*

*TP53 (exonen 3-9)*

*WT1 (exon 7, exon 9)*

#### **NGS-2017-006: Myeloproliferatieve neoplasie (MPN) - (prefibrotische) primaire myelofibrose:**

##### Genen:

*JAK2 (exon 12-F537\_I546), exon 14-codon 617)*

*MPL (exon 10-codon 515)*

*CALR (exon 9)*

*ASXL1 (exonen 12)*

*EZH2 (alle exonen)*

*TET2 (exon 3, exonen 9-11)*

*IDH1 (exon 4-hotspot)*

*IDH2 (exon 4-hotspot)*

*SRSF2 (exon 1-codon 95)*

*SF3B1 (exon 14, exon 15)*

#### **NGS-2017-007: Myelodysplastische syndromen (MDS):**

##### Genen:

*SF3B1 (exon 14, exon 15)*

*TET2 (exon 3, exonen 9-11)*

*SRSF2 (exon 1-codon 95)*

*ASXL1 (exon 12)*

*DNMT3A (exonen 8-23)*

*RUNX1 (alle exonen)*

*U2AF1 (exon 2-codon 34, exon 6-codon 157)*

*TP53 (exonen 3-9)*

*EZH2 (alle exonen)*

## **1.5. Antwoordformulier**

Voor de 9 uitgevoerde sequencing-analyses (*triplicates* van 3 multiplexstalen) vroegen we om alle ruwe data (fastq-, bam- en vcf-bestanden) door te geven en een Excel-spreadsheet aan te vullen met verschillende parameters. We vroegen ook een klinisch rapport voor elk multiplexstaal (3 in totaal).

We hebben ook gevraagd om een antwoordformulier in te vullen met enkele technische gegevens over de methode en analyse van de bio-informatica die tijdens deze studie werden gebruikt.

## **1.6. Slaagcriteria**

De slaagcriteria zijn de identificatie van de 12 met ddPCR gevalideerde varianten die aanwezig zijn in de 3 multiplexstalen. De mediane waarden van alle frequenties die de laboratoria voor deze varianten rapporteren, worden alleen ter informatie gebruikt, net zoals de SD-waarden. De varianten die de laboratoria rapporteren maar die niet gevalideerd zijn door ddPCR worden ook gedetailleerd beschreven in het rapport en alleen ter informatie weergegeven.

## 2. RESULTATEN

### 2.1. Deelname aan de NGS-benchmarkstudie

16 Belgische laboratoria hebben zich ingeschreven voor de benchmarkstudie over hematologische myeloïde tumoren. 15 laboratoria reageerden binnen de tijdslimiet van de studie en werden opgenomen in de analyse van de resultaten. Alle Belgische medische laboratoria die de detectie van mutaties in vaste tumoren met NGS-technologie hebben uitgevoerd en die voor deze techniek een ISO 15189-accreditatie hebben of waarvan de accreditatie lopende is op het moment van de verzending van de stalen, mochten deelnemen. De laboratoria met een lopende accreditatie moesten het validatiedossier of het validatieplan voorleggen bij inschrijving.

Tabellen 1a, 1b en 1c: Overzicht van de deelnemers

Regio	N	Laboratorium	N
Vlaams Gewest	10	Pathologische anatomie	1
Brussels Hoofdstedelijk Gewest	3	Klinische biologie	11
Waals Gewest	2	Humane genetica	3
Totaal	15	Totaal	15

Laboratorium	N
Geaccrediteerd	9
Accreditatie lopend op het moment van inschrijving	6
Totaal	15

### 2.2. Overzicht van de methoden

Tabel 2: Platforms gebruikt door deelnemers

Merk	N	Platform	N
Illumina	14	MiSeq	12
		MiSeq DX	1
		HiSeq 1500	1
IonTorrent	1	PGM	1

Tabel 3: Referenties *flow cells* of gebruikte chips

Chip/ <i>flow cell</i>	N
Miseq v3	7
Miseq v2	5
Miseq micro v2	2
HiSeq Rapid v2	1
Ion 318 v2	1

Let op: sommige laboratoria gebruiken in hun procedures meerdere *flow cells*/chips.



Tabel 4: *single/paired-end* analyses

<b>Single/paired-end</b>	<b>N</b>
Single end	1 (Ion Torrent)
Paired-end	14 (Illumina)

Tabel 5: Lengte van de *reads*

<b>Lengte (pb)</b>	<b>N</b>
125	1
150	7
200	1
230	1
250	4
225-275	1

Tabel 6: Referentie van de gebruikte genpanelen

<b>Gebruikte genpanelen</b>	<b>N</b>
TruSight Myeloid Sequencing panel (Illumina)	7
Human Myeloid Neoplasms panel (Qiagen)	1
AmpliSeq Oncomine Myeloid (Thermo Fisher)	1
xGen Acute Myeloid Leukemia Cancer Panel (IDT)	1
TruSeq Custom Amplicon Low input (Illumina)	1
Nextera XT Custom panel (Illumina)	1
Haloplex Custom panel (Agilent)	2
GeneRead Custom panel v2 (Qiagen)	1

Opmerking: één laboratorium heeft verschillende aangepaste panels ontwikkeld voor verschillende soorten tumoren.

Tabel 7: Commerciële software en "*in-house*" pipelines (gebruikte tools)

<b>Commerciële software/"in-houses" pipelines</b>	<b>N</b>
Sophia DDM (Sophia Genetics)	5
Variant Studio (Illumina)	4
SeqNext (JSI)	4
NextGene Software (Softgenetics)	1
Biomedical Genomics Workbench (Qiagen)	1
CLC Genomics Workbench (Qiagen)	1
QCI interpret (Qiagen)	1
Agilent SureCall (Agilent)	1
BWA+GATK+annovar (open source)	1
FastQC+BWA+Samtools+Picardtools+Genome Analysis Toolkit (open source)	1

Let op: sommige laboratoria gebruiken in hun procedures meerdere bio-informatica-instrumenten.

Tabel 8: Welke categorieën van somatische varianten worden gedetecteerd door uw NGS-analysemethode voor hematologische myeloïde tumoren?

Categorieën van somatische varianten	N
SNV	15
Indels (<50pb)	15
Indels (50pb-1kb)	2
CNV	0
Translocatie	0
Andere: indels tussen 50-150pb	2

Tabel 9: Detectielimieten voor elke gedetecteerde variantcategorie

Detectielimiet voor SNV: allelfrequentie (%)	Detectielimiet voor SNV: sequentiebepalingsdiepte (X)	N
2	40	1
2.5	/	1
5	300	3
5	500	6
5	/	3
1-5	/	1
Detectielimiet voor indels <50pb: allelfrequentie (%)	Detectielimiet voor indels <50pb: sequentiebepalingsdiepte (X)	N
2	40	1
5	300	3
5	500	5
5	/	4
1-5	/	1
/	/	1
Detectielimiet voor indels (50pb-150pb): allelfrequentie (%)	Detectielimiet voor indels (50pb-150pb): sequentiebepalingsdiepte (X)	N
2	40	1
5	500	1
Detectielimiet voor indels (50pb-1kb): allelfrequentie (%)	Detectielimiet voor indels (50pb-1kb): sequentiebepalingsdiepte (X)	N
5	300	1
5	/	1

Opmerking: sommige laboratoria gebruiken minder strenge detectielimieten voor hotspots.

Tabel 10: Voor de opsporing van somatische varianten in hematologische myeloïde tumoren, sequencet u dan een normaal staal van dezelfde patiënt, parallel met het tumorstaal?

Sequencing normaal staal	N
Ja	0
Nee	15

Tabel 11: Staaltypes gesequencet door laboratoria voor de detectie van somatische varianten in hematologische myeloïde tumoren

Staaltype	N
Beenmerg	15
Bloed	14
Gevriesdroogd weefsel	4
In paraffine ingebed weefsel	1
Andere: Biopsieën en lichaamsvloeistoffen	1

Tabel 12: Minimale hoeveelheden genomisch DNA die in uw laboratorium vereist zijn voor het uitvoeren van een NGS-analyse op hematologische myeloïde tumoren

Minimale hoeveelheid genomisch DNA	N
20ng	2
30ng	1
40ng	2
50ng	7
185ng	1
200ng	1
250ng	1
1000ng	1

Opmerkingen: Eén laboratorium vermeldt andere minimale hoeveelheden afhankelijk van het gebruikte panel.

Tabel 13: Bevatten de panels die de laboratoria gebruiken alle regio's die door ComPerMed zijn gedefinieerd?

Volledige dekking	N
Ja	7
Nee	8

Opmerkingen: De genen die niet door alle deelnemers worden behandeld, zijn hoofdzakelijk de genen CEBPA, EZH2 en DNMT3A.

### 2.3. Overzicht van de resultaten

Tabel 14: Verwachte en waargenomen resultaten voor varianten gevalideerd met ddPCR

Staal	Gen	Mutatie	Aantal laboratoria dat de mutatie identificeerde	Aantal Z-citaties	Mediane allelfrequentie (%)	SD
NGS-2017-005	TP53	p.(Glu171*)	15/15	1/15	34.30	1.76
NGS-2017-005	KIT	p.(Asp816Val)	15/15	1/15	19.03	1.67
NGS-2017-005	IDH2	p.(Arg140Gln)	15/15	3/15	20.88	1.11
NGS-2017-005	IDH1	p.(Arg132Gly)	15/15	1/15	5.30	0.60
NGS-2017-005	FLT3	p.(Asp835Tyr)*	14/15	1/14	11.46	0.86
NGS-2017-006	JAK2	p.(Val617Phe)	15/15	2/15	21.00	0.87
NGS-2017-006	IDH2	p.(Arg172Ser)**	14/15	1/14	30.95	0.83
NGS-2017-006	IDH1	p.(Arg132Ser)**	14/15	1/14	11.05	1.12
NGS-2017-006	SF3B1	p.(Lys700Glu)*	12/15	2/12	10.65	1.24
NGS-2017-007	SF3B1	p.(Lys666Asn)*	15/15	2/15	24.76	2.63
NGS-2017-007	TP53	p.(Ala161Asp)**	14/15	2/14	47.45	2.73
NGS-2017-007	TP53	p.(Tyr220Cys)**	13/15	1/13	5.12	0.63

**8 laboratoria konden de 12 relevante mutaties identificeren, 6 identificeerden er 11 en 1 identificeerde er 9.**  
*\* Kunstmatige varianten Horizon (zie punt 3.1.)*  
*\*\* Door sommige laboratoria niet-geïdentificeerde endogene varianten (zie punt 3.2.)*  
**De statistische interpretatie wordt in detail besproken in het hoofdstuk over de interpretatie van het individueel rapport p 40-41.**

Tabel 15: Resultaten waargenomen voor varianten gerapporteerd door minstens 2/3 van de laboratoria en niet gevalideerd met ddPCR

Staal	Gen	Mutatie	Aantal laboratoria dat de mutatie identificeerde	Mediane allelfrequentie (%)	SD
NGS-2017-005	TET2	p.(Ser268*)	15/15	27.00	1.21
NGS-2017-005	TP53	p.(Ser215Gly)	14/15	46.34	1.90
NGS-2017-005	ASXL1	p.(Leu764Tyrfs*8)	13/15	40.20	0.96
NGS-2017-005	RUNX1	p.(Pro49Leu)	10/15	13.00	1.04
NGS-2017-006	ASXL1	p.(Tyr591*)	13/15	10.10	0.74
NGS-2017-006	ASXL1	p.(Leu764Tyrfs*8)	13/15	68.00	2.74
NGS-2017-007	EZH2	p.(Cys539Arg)	11/15	21.19	0.69

Tabel 16: Resultaten waargenomen voor varianten gerapporteerd door minder dan 2/3 van de laboratoria en niet gevalideerd met ddPCR

Staal	Gen	Mutatie	Aantal laboratoria dat de mutatie identificeerde	Mediane allelfrequentie (%)	SD
NGS-2017-005	RUNX1	p.(Met267Ile)	9/15	12.30	2.20
NGS-2017-005	ASXL1	p.(Gly646Trpfs*12)	6/15	8.00	0.56
NGS-2017-005	TET2	p.(Tyr867His)	5/15	51.10	0.83
NGS-2017-005	TET2	p.(Pro1723Ser)	4/15	48.81	3.77
NGS-2017-005	ASXL1	p.(Met1249Val)	4/15	7.79	0.84
NGS-2017-005	TET2	p.(Ile1762Val)	2/15	9.90	0.59
NGS-2017-005	TET2	p.(His1778Arg)	2/15	51.00	0.15
NGS-2017-005	TP53	p.(Pro72Arg)	1/15	98.50	0.00
NGS-2017-005	DNMT3A	p.(Arg729Trp)	1/15	2.80	0.00
NGS-2017-005	CEBPA	p.(His195_Pro196dup)	1/15	8.10	0.00
NGS-2017-006	TET2	p.(Tyr867His)	5/15	69.82	1.63
NGS-2017-006	TET2	p.(Pro1723Ser)	5/15	67.74	7.64
NGS-2017-006	TET2	p.(Leu1721Trp)	2/15	20.30	1.11
NGS-2017-006	TET2	p.(Ile1762Val)	2/15	37.25	22.28
NGS-2017-006	TET2	p.(His1778Arg)	2/15	39.45	21.83
NGS-2017-007	TET2	p.(Arg1261His)	8/15	26.70	1.06
NGS-2017-007	TET2	p.(Gln1084Pro)	5/15	41.10	1.16
NGS-2017-007	TET2	p.(Ile1762Val)	2/15	22.80	2.15
NGS-2017-007	TP53	p.(Pro72Arg)	1/15	53.70	0.00
NGS-2017-007	TET2	p.(Leu1721Trp)	1/15	3.15	0.00
NGS-2017-007	EZH2	p.(Asp146His)	1/15	7.80	0.00
NGS-2017-007	DNMT3A	p.(Arg729Trp)	1/15	2.80	0.00

Tabel 17: Slaagpercentage van deelnemers op basis van 12 varianten gevalideerd met ddPCR

Slaagpercentage	N
12/12 (100%)	8
11/12 (91.67%)	6
9/12 (75.00%)	1

Gemiddeld slaagpercentage: 171/180 (95.00%)

#### 2.4. Overzicht van klinische/biologische interpretaties

De klinische/biologische interpretaties zijn opgenomen in de bijlage van dit rapport (pagina's 17 tot 36). Deze gegevens werden uit de excel-antwoordbestanden voor herhaling 1 gehaald en kunnen gefragmenteerd zijn ten aanzien de commentaren vermeld in het klinisch rapport. Om geen vertaalfouten te introduceren, werden de klinische/biologische interpretaties in de taal van het laboratorium behouden.

### 3. BESPREKING VAN DE RESULTATEN, DISCUSSIE EN AANBEVELINGEN

#### 3.1. Kunstmatige varianten Horizon

Drie in deze studie beoordeelde varianten werden kunstmatig ingevoegd in de gebruikte cellijnen (zie Tabel 14). Het betreft de varianten FLT3 p.(Asp835Tyr) (staal NGS-2017-005), SF3B1 p.(Lys700Glu) (staal NGS-2017-006) en SF3B1 p.(Lys666Asn) (staal NGS-2017-007). Deze varianten werden ingevoerd met een insertiecassette van ongeveer 2kb (zie schema hieronder).



We analyseerden de uitlijning van de primers die de deelnemende laboratoria voor deze drie varianten gebruikten. Bij 3 laboratoria zagen we een incompatibiliteit tussen sommige van deze kunstmatige varianten en hun analysemethoden. Deze varianten werden niet geëvalueerd voor deze drie laboratoria. Voor de drie betrokken laboratoria is voor de 2 varianten (zie tabel 18) de insertiecassette aanwezig tussen de primers die dit gebied dekken en verhindert de amplificatie.

Tabel 18: Incompatibiliteit van kunstmatige varianten voor 3 laboratoria

Laboratorium	Kunstmatige varianten onverenigbaar met de gebruikte methode
Laboratorium 1	FLT3 p.(Asp835Tyr), staal NGS-2017-005
Laboratorium 2	SF3B1 p.(Lys700Glu), staal NGS-2017-006
Laboratorium 3	SF3B1 p.(Lys700Glu), staal NGS-2017-006

Tabel 19: Herberekend slaagpercentage van de deelnemers

Slaagpercentage	N
12/12 of 11/11 (100%)	11
11/12 (91.67%)	3
9/12 (75.00%)	1

Gemiddeld slaagpercentage: 171/177 (96.61%)

#### 3.2. Onverwachte resultaten voor endogene varianten gevalideerd met ddPCR

Voor staal NGS-2017-006 werden 3 onverwachte resultaten waargenomen (zie tabel 14):

- Eén laboratorium heeft de varianten IDH2 p (Arg172Ser) en IDH1 p (Arg132Ser) met mediane allelfrequenties van respectievelijk 30,95% en 11,05% niet gerapporteerd. We konden de aanwezigheid van deze varianten in hun ruwe data vaststellen. Nochtans heeft dit laboratorium in plaats van de variant IDH1 p. (Arg132Ser) de variant IDH1 p. (Arg132Gly) gerapporteerd. Voor dit laboratorium vermoeden we een probleem in de bio-informatica-analyse van deze varianten door hun methode.
- Eén laboratorium heeft de variant SF3B1 p.(Lys700Glu), gebonden aan een insertiecassette en met een mediane allelfrequentie van 10,65% niet gevonden. Voor dit laboratorium konden we de aanwezigheid van deze variant in hun ruwe data vaststellen. Voor dit laboratorium vermoeden we een probleem in de bio-informatica-analyse van deze variant door hun methode.

Voor staal NGS-2017-007 werden 3 onverwachte resultaten waargenomen (zie tabel 14):

- Eén laboratorium heeft de variant TP53 p.(Ala161Asp) met mediane allelfrequentie 47,45%, niet gevonden. We konden de aanwezigheid van deze varianten in hun ruwe data vaststellen. Tijdens de biologische en/of klinische interpretatie van de variant heeft het laboratorium ons laten weten dat het deze variant heeft ondergebracht in de categorie VUS (*Variant of Unknown Significance*), een categorie die dit laboratorium niet rapporteert in zijn klinische rapporten.
- 2 laboratoria hebben de variant TP53 p.(Tyr220Cys) met mediane allelfrequentie 5,12%, niet gevonden. Voor beide laboratoria lag de allelfrequentie van de mutatie dichtbij hun detectiedrempel, die op 5% was vastgelegd.

### 3.3. Herhaalbaarheid van de resultaten

- 2 laboratoria hadden herhaalbaarheidsproblemen bij de detectie van bepaalde varianten gevalideerd met ddPCR.
- Eén laboratorium analyseerde het staal NGS-2017-007 alleen in tweevoud. Volgens hun criteria leverde de derde analyse geen bijdrage.

Tabel 20: Herhaalbaarheidsproblemen voor 2 laboratoria

Laboratorium	Varianten met herhaalbaarheidsprobleem	Aantal herhalingen waar de variant kon worden geïdentificeerd
Laboratorium 1	FLT3 p.(Asp835Tyr), staal NGS-2017-005 KIT p.(Asp816Val), staal NGS-2017-005 JAK2 p.(Val617Phe), staal NGS-2017-006	2/3 1/3 2/3
Laboratorium 2	JAK2 p.(Val617Phe), staal NGS-2017-006 SF3B1 p.(Lys700Glu), staal NGS-2017-006 TP53 p.(Tyr220Cys), staal NGS-2017-007	2/3 2/3 2/3

### 3.4. Standaardisatie van klinische rapporten en klinische/biologische interpretatie

Sinds februari 2018 heeft ComPerMed een werkgroep opgericht om de interpretatie van varianten en de inhoud van klinische NGS-rapporten te standaardiseren. Dit project beantwoordt aan het verzoek van de experts naar aanleiding van de diversiteit van de antwoorden die werden waargenomen tijdens georganiseerde *benchmarking trials* (zie Bijlage 4.1, 4.2 en 4.3).

Deze experten groep werkt in het bijzonder aan standaardisatie:

- 1) van de annotatie van varianten
- 2) van gebruikte referenties voor de geteste regio's
- 3) van de biologische classificatie van de varianten
- 4) van de klinische classificatie van de varianten
- 5) van het klinisch rapport

De weerhouden conclusies zullen worden gepubliceerd in de vorm van aanbevelingen.

De nomenclatuurregels die in dit rapport werden gebruikt, zijn afkomstig van HGVS-aanbevelingen (<http://varnomen.hgvs.org/>)

### 3.5. Referenties van beoordeelde genomische regio's

De te analyseren regio's tijdens deze *benchmarking trial* zijn gekozen door een ComPerMed werkgroep die zich toelegt op de definitie van de moleculaire testen die moeten worden uitgevoerd in de (hemato -) oncologie. Deze discussies leidden tot het opstellen van een document waarin de voorwaarden worden opgenomen die in de toekomstige conventie zullen worden gebruikt. De lijst met relevante regio's die in dit document en in de richtlijnen van deze studie is opgenomen, werd echter niet gekoppeld aan duidelijke genomische referenties. Tijdens deze *benchmarking trial* heeft een laboratorium, vanwege deze onnauwkeurigheid, bepaalde varianten in het ASXL1-gen die volgens hun referentie niet in de geëvalueerde regio waren gelokaliseerd (exon 12), niet gerapporteerd. Dit punt werd ook besproken tijdens de eerste vergadering van de werkgroep 'standaardisatie van de interpretatie van varianten en klinische rapporten', en de beslissing om genomische referenties aan te geven (NM of LRG) werd goedgekeurd (cf. 3.4). Voortaan wordt dus aanbevolen om altijd een eenduidige referentie met een positie/een regio van het genoom te associëren.



## 4. BIJLAGE

### 4.1. Klinische/biologische interpretaties: staal NGS-2017-005

#### 4.1.1. Varianten gevalideerd met ddPCR

Lab	Interpretatie TP53 p.(Glu171*)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
2	Les mutations TP53 sont retrouvées dans 60 à 80 % des LMA à caryotype complexe et sont fortement associées aux LMA induite par thérapie.
3	Classe 4A
4	Het TP53 gen, dat gelegen is 17p13.1, is een gen dat codeert voor het p53 eiwit, een transcriptionele regulator waarbij cel cyclus arrest en apoptose geïnduceerd wordt in het geval van DNA schade. TP53 mutaties zijn één van de meest frequente genetische abnormaliteiten in kanker en bovendien een belangrijke prognostische merker voor AML, gezien het de therapie-gerelateerde AML/MDS subgroep identificeert. t-AML is een complicatie ten gevolge van cytotoxische chemo- en/of radiotherapie. T-AML/MDS is gekenmerkt door een hogere incidentie van TP53 mutaties, chromosoom 5 of 7 abnormaliteiten, complexe cytogenetica en chemoresistentie. Het betreft een tumor suppressor waarbij zowel frameshift, nonsense en missense mutaties van belang zijn. Wong T et al heeft aangetoond dat TP53 mutaties in t-AML/MDS frequent zijn maar dat ze reeds jaren vóór toediening van cytotoxische therapie reeds subclonaal aanwezig zijn, ten gevolge van bvb verhoogde mutatiefrequentie door oa. leeftijd. Tijdens behandeling wordt de TP53mut subkloon uitgeselecteerd met verhoogde proliferatie in de jaren nadien, met t-AML tot gevolg. Gekende driver mutaties in de novoAML zijn significant minder aanwezig in t-AML/MDS (bvb DNMT3A, NPM1, TET2). T-AML/MDS is aldus gekenmerkt door een specifiek mutatieprofiel. TP53 mutatiefrequentie varieert van 5-35% in t-AML/MDS en zijn geassocieerd met complexe cytogenetica en ongunstige prognose. Malcovati et al.toont een onafhankelijk effect op algemene overleving van TP53 mutaties in MDS (HR 6,00). Lindsley et al. classificeert TP53 mutatiepositieve patiënten als een aparte subgroep met minst gunstige algemene overleving. Bijna de helft van de MDS patiënten bezit een mutatie in TP53, DNMT3A of TET2 dewelke 64% van de sterftes vertegenwoordigt. 3-jaarsoverleving in de cohort negatief voor deze drie mutaties bedraagt 59%, versus 19% in de cohort met deze mutatie (Bejar R, JCO, 2014). TP53 mutaties zijn geassocieerd met complex en monosomaal karyotype en met excessieve blasten en thrombocytopenie. TP53 is gemuteerd in 20% van del(5q) patiënten.
5	PRES PATHOGENIC
6	ongunstige prognose
7	pathogene mutatie
8	4-likely pathogenic
9	Variant Class IIIa: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: A. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant LIKELY DOES modify protein function
10	Waarschijnlijk pathogeen
11	Mutaties in TP53 zijn recurrent bij acute myeloïde leukemie. Mutaties in TP53 worden over het algemeen geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. Ref. Stirewalt et al. Blood 2001;97:3589–3595. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. Hou et al. Blood Cancer Journal (2015). TP53 mutations in de novo acute myeloid leukemia patients: longitudinal follow-ups show the mutation is stable during disease evolution
12	Pathogénique
13	Vermoedelijk pathogene variant
14	Likely Pathogenic / Mutaties in TP53 in AML zijn geassocieerd met een slechte prognose (Dohner et al., Blood 2017). Papaemmanuil (NEJM, 2016) suggereert dat AML met complex Karyotype en TP53 mutatie een aparte klasse is, met een slechte prognose. Echter dit is nog niet opgenomen in de WHO 2017.
15	Pathogeen

Lab	Interpretatie KIT p.(Asp816Val)
1	Deze variant: prognose niet gekend. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
2	La mutation KIT est associée à une pronostic intermédiaire dans les LMA présentant un facteur pronostique favorable tel que t(8 ;21) ou inv(16).
3	Classe 1
4	KIT mutaties komen voornamelijk voor in CBF-AML, zijnde de subgroepen inv(16) en t(8;21). KIT behoort tot de klasse III RTK. Constitutieve receptor activatie (GOF) werd beschreven bij CBF-AML. Mutaties komen in CBF-AML voornamelijk voor in exons 8 en 17. Exon 17 mutaties voorspellen een significant slechtere prognose en verhoogd risico op herval (>6x tov van wt) in zowel volwassenen als pediatrische t(8;21) AML. De prognostische impact van KIT mutaties bij inv(16) AML is niet eenduidig, doch Paschka et al. tonen aan dat de aanwezigheid van KIT mutaties eveneens een verhoogd risico op herval aangeeft bij inv(16) AML. KIT D816V mutatie is een kenmerkende mutatie bij mastocytose (in 95% van mastocytosen) die geassocieerd is met imatinib resistentie.
5	PATHOGENIC
6	coverage te laag
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
8	5-definitely pathogenic
9	Variant Class I: This variant is established as clinically actionable (druggable/predictive/prognostic and/or with diagnostic/classification implications) in the disease primary site & histology in which it has been identified
10	Pathogeen, gekende hotspot mutatie
11	Deze mutatie is geassocieerd met een intermediaire prognose in patiënten met AML met t(8;21), inv(16), of t(16;16) karyotype. In patiënten zonder KIT mutaties zijn t(8;21), inv(16), of t(16;16) geassocieerd met een gunstige prognose. Resistentie aan KIT inhibitors is beschreven bij KIT D816 mutaties. Ref. Paschka et al. J Clin Oncol 2006;24:3904–3911. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): A Cancer and Leukemia Group B Study.
12	Pathogénique
13	Pathogene variant
14	Definitely pathogenic / KIT mutatie zijn beschreven in AML, in sommige studies werd een kortere overleving beschreven in AML met mutaties in KIT exon 17 (WHO 2017, Döhner et al, 2008).
15	Pathogeen

Lab	Interpretatie IDH2 p.(Arg140Gln)
1	Deze variant: prognose niet gekend. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
2	Chez les patients avec un caryotype normal, les mutations IDH sont associées à un pronostic favorable.
3	Classe 1
4	Isocitraat dehydrogenasen komen cytosolisch (IDH1) of mitochondriaal (IDH2) voor waar ze de oxidatieve decarboxylatie van isocitraat αKG katalyseren. Betrokken bij cellulaire bescherming tegen oxidatieve schade. Mutaties komen voornamelijk voor op positie 140 en in mindere mate op positie 172. Deze varianten leiden tot neomorfe enzymatische activiteit. Frequentie van 8% in ongeselecteerde AML. Associatie met CN-AML (10-19%). IDH2 mutaties zijn geassocieerd met hogere leeftijd en moleculair 'low-risk' AML (NPM1pos / FLT3-ITDneg). IDH mutaties zijn mutueel exclusief met TET2 mutaties. Fase III klinische studie (ECOG E1900 cohort) toont aan dat IDH2 R140 specifiek geassocieerd is met gunstig verloop in AML, zowel in volledige cohort als CN-intermediate risk cohort. Combinatie van NPM1 met IDH1 of 2 toonden een specifiek gunstig verloop, superieur tov CN-favorable. In MDS worden IDH mutaties gedetecteerd in app. 2-5%. IDH mutaties in MDS zijn geassocieerd met oudere leeftijd, hoge thrombocyten telling, en mutaties in DNMT3A (p<0,001), ASXL1 (p=0,007), en SRSF2 (p<0,001). IDH2 is een predictieve factor voor

Lab	Interpretatie IDH2 p.(Arg140Gln)
	ongunstige prognose bij patienten met een IPSS of FAB of WHO low-risk MDS. Dit is niet het geval bij high-risk MDS. Indicatief voor moleculair 'low risk' AML en gunstig klinisch verloop wanneer co-mutatie met NPM1. Verder geen eenduidige impact op prognose. In MDS predictief voor ongunstig klinisch verloop en snelle leukemische progressie bij 'low risk' MDS.
5	PATHOGENIC
6	gunstige prognose
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
8	5-definitely pathogenic
9	Variant Class I: This variant is established as clinically actionable (druggable/predictive/prognostic and/or with diagnostic/classification implications) in the disease primary site & histology in which it has been identified
10	Pathogeen, gekende hotspot mutatie
11	Mutaties in IDH2 zijn recurrent bij acute myeloïde leukemie. De prognostische betekenis van IDH2 mutaties is nog onduidelijk. In AML patiënten met een normaal karyotype en NPM1 mutatie, worden IDH2 mutaties geassocieerd met een gunstige prognose. Ref. Patel et al. NEJM 366 (12), 2012. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in AML.
12	Pathogénique
13	Pathogene variant
14	Definitely pathogenic / IDH2 mutaties zijn beschreven in AML, echter de betekenis hiervan is niet duidelijk (WHO 2017). Er zijn Clinical trials voor AML patienten met IDH mutaties (clinicaltrials.gov).
15	Pathogeen

Lab	Interpretatie IDH1 p.(Arg132Gly)
1	Deze variant: prognose niet gekend. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
2	Chez les patients avec un caryotype normal, les mutations IDH sont associées à un pronostic favorable.
3	Classe 1
4	Isocitraat dehydrogenasen komen cytosolisch (IDH1) of mitochondriaal (IDH2) voor waar ze de oxidatieve decarboxylatie van isocitraat $\alpha$ KG katalyseren. Betrokken bij cellulaire bescherming tegen oxidatieve schade. Mutaties komen voornamelijk voor op positie 132. Deze variant leidt tot neomorfe enzymatische activiteit. Frequentie van 8% in ongeselecteerde AML. Associatie met CN-AML (10-16%). IDH1 R132 is geassocieerd met moleculair 'low-risk' AML (NPM1pos / FLT3-ITDneg). IDH mutaties zijn mutueel exclusief met TET2 en WT1 mutaties. Combinatie van NPM1 met IDH1 of 2 toonden een specifiek gunstig verloop, superieur tov CN-favorable. In MDS worden IDH mutaties gedetecteerd met een frequentie van 5%. IDH mutaties in MDS zijn geassocieerd met oudere leeftijd, hoge trombocyten telling, en mutaties in DNMT3A ( $p < 0,001$ ), ASXL1 ( $p = 0,007$ ), en SRSF2 ( $p < 0,001$ ).
5	PATHOGENIC
6	gunstige prognose
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
8	4-likely pathogenic
9	Variant Class I: This variant is established as clinically actionable (druggable/predictive/prognostic and/or with diagnostic/classification implications) in the disease primary site & histology in which it has been identified
10	Pathogeen, gekende hotspot mutatie
11	Mutaties in IDH1 zijn recurrent bij acute myeloïde leukemie. De prognostische betekenis van IDH1 mutaties is onduidelijk. In AML patiënten met een normaal karyotype en NPM1 mutatie, worden IDH1 mutaties geassocieerd met een gunstige prognose. Ref. Patel et al. NEJM 366 (12), 2012. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in AML.
12	Pathogénique
13	Pathogene variant
14	Definitely pathogenic /IDH1 mutaties zijn beschreven in AML, echter de betekenis hiervan is niet duidelijk (WHO 2017). Er zijn Clinical trials voor AML patienten met IDH mutaties (clinicaltrials.gov).

<b>Lab</b>	<b>Interpretatie IDH1 p.(Arg132Gly)</b>
15	Pathogeen

<b>Lab</b>	<b>Interpretatie FLT3 p.(Asp835Tyr)</b>
1	Deze variant: prognose niet gekend. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
2	La mutation FLT3 D835Y est associée avec un pronostic plutôt défavorable dans les LMA à caryotype normal ne présentant pas de FLT3-ITD.
3	Classe 1
4	FLT3 behoort tot klasse III receptor tyrosine kinase familie en is structureel homolog aan KIT en PDGFR receptors. FLT3 is betrokken bij celproliferatie, -overleving en -differentiatie van hematopoïetische progenitor cellen. FLT3 somatische mutaties komen voor met een frequentie van 20% in AML en een aanrijking bij cytogenetisch normale AML (28-34%). De meest voorkomende variant is een ITD in exon 14/15 gevolgd door een puntmutatie in exon 20 (D835Y). Het betreft voornamelijk activerende mutaties. FLT3-ITD's zijn geassocieerd met een slechte prognose, welke zich maximaal manifesteert bij patiënten met een hoge variant frequentie en ongeacht de leeftijd van de patiënt. Allo-HSCT kan worden beschouwd als een efficiënte therapeutische benadering bij primaire CR, doch contradictorische data. Ook intensivering van zowel inductie als post-remissie chemotherapie blijkt klinisch voordeel op te leveren bij de novo AML.
5	PATHOGENIC
6	prognose nog onduidelijk
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
8	5-definitely pathogenic
9	Variant Class I: This variant is established as clinically actionable (druggable/predictive/prognostic and/or with diagnostic/classification implications) in the disease primary site & histology in which it has been identified
10	Pathogeen, gekende hotspot mutatie
11	De prognostische betekenis van FLT3 kinase domein puntmutaties is nog onduidelijk. FLT3 mutaties gecombineerd met t(8;21), inv(16) of t(16;16) worden geassocieerd met een gunstige prognose. Ref. Allen et al. Leukemia 27 (9), 2013. The importance of relative mutant level for evaluating impact on outcome of KIT, FLT3 and CBL mutations in core-binding factor acute myeloid leukemia.
12	Pathogénique
14	Definitely pathogenic / Tyrosine kinase domain FLT3 (FLT3-TKD) mutaties zijn beschreven in AML, echter de betekenis hiervan is niet duidelijk (Döhner et al, 2008). Er zijn Clinical trials voor AML patiënten met FLT3 mutaties (clinicaltrials.gov).
15	Pathogeen

#### 4.1.2. Varianten gerapporteerd door minstens 2/3 van de laboratoria en niet gevalideerd met ddPCR

Lab	interpretatie TET2 p.(Ser268*)
1	Deze variant: prognose niet gekend. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
2	Les mutations TET2 sont un marqueur pronostic défavorable dans les LMA avec un risque cytogénétique intermédiaire.
3	Classe 3A
4	<p>Tet2 mutaties (meestal loss of function) waargenomen in verschillende myeloïde malignancies: 19% in MDS 4-13% in MPN 22-42% in CMML 12-16% in AML Mutueel exclusief met idh1/2. Bijna de helft van de MDS patiënten bezit een mutatie in TP53, DNMT3A of TET2 dewelke 64% van de sterftes vertegenwoordigt. 3-jaarsoverleving in de cohort negatief voor deze drie mutaties bedraagt 59%, versus 19% in de cohort met deze mutatie (Bejar R, JCO, 2014).</p> <p>AML: Negatief prognostisch effect voornamelijk in intermediate-risk AML, doch eerder trend. MDS: Tet2 mutaties reeds vaak geassocieerd met betere HMT (AZA/DEC) respons, doch niet eenduidig. Betere ORR op 5-azacytidine en/of decitabine indien subclones (&lt;10%VAF) als wildtype worden behandeld. Respons rates zijn het hoogst in de subgroep met TET2 mutante patiënten zonder clonale ASXL1 mutatie.</p> <p>MDS/MPN (CMML): Tet2 gemuteerd in 50-60% bij CMML. In CMML, tet2 typisch een comutatie met SRSF2</p> <p>MPN: Tet2 mutaties komen in MPN vaak voor samen met Jak2 mutaties. De volgorde waarin JAK2 en TET2-mutaties worden verworven beïnvloedt de klinische kenmerken, de respons op gerichte therapieën, en de biologie en clonale evolutie bij MPN.</p> <p>A) jak2 first: vnl jak2/tet2 dubbel mutaties: grotere kans op PV itt ET, verhoogd risico op trombose en verhoogde gevoeligheid op ruxolitinib. Tet2 mutatie noodzakelijk voor stamcel/progenitor expansie, doch reeds megakaryocytose en erthrocytose, wat leidt tot vroege klinische presentatie. B) tet2 first: vnl tet2 single mutaties. Tet2 verandert transcriptioneel pad van jak2 V617F en verhindert jak2 mutatie van genen geassocieerd met proliferatie op te reguleren</p>
5	PRES PATHOGENIC
6	ongunstige prognose
7	pathogene mutatie
8	4-likely pathogenic
9	Variant Class IIIa: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: A. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant LIKELY DOES modify protein function
10	Waarschijnlijk pathogeen
11	Mutaties in TET2 zijn recurrent bij acute myeloïde leukemie. TET2 mutaties bij AML met een normaal karyotype (CN-AML) worden geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. Ref. Weissmann et al. Leukemia (2012) 26, 934 – 942. Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia. Patel et al. NEJM 366 (12), 2012. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in AML.
12	Pathogénique probable
13	Vermoedelijk pathogene variant
14	Likely Pathogenic / TET2 mutatie is beschreven in AML maar zonder duidelijk prognosis betekenis.
15	Pathogeen



Lab	Interpretatie TP53 p.(Ser215Gly)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
2	Les mutations TP53 sont retrouvées dans 60 à 80 % des LMA à caryotype complexe et sont fortement associées aux LMA induite par thérapie.
3	Classe 1
5	PRES PATHOGENIC
6	ongunstige prognose
7	pathogene mutatie
8	4-likely pathogenic
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	VUS
11	Mutaties in TP53 zijn recurrent bij acute myeloïde leukemie. Mutaties in TP53 worden over het algemeen geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. Ref. Stirewalt et al. Blood 2001;97:3589–3595. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. Hou et al. Blood Cancer Journal (2015). TP53 mutations in de novo acute myeloid leukemia patients: longitudinal follow-ups show the mutation is stable during disease evolution.
12	Pathogénique
13	Vermoedelijk pathogene variant
14	Likely Pathogenic / Mutaties in TP53 in AML zijn geassocieerd met een slechte prognose (Dohner et al., Blood 2017). Papaemmanuil (NEJM, 2016) suggereert dat AML met complex Karyotype en TP53 mutatie een aparte klasse is, met een slechte prognose. Echter dit is nog niet opgenomen in de WHO 2017.
15	Pathogeen

Lab	Interpretatie ASXL1 p.(Leu764Tyrf8)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
3	Classe 1 ou VUS
4	ASXL1 behoort samen met EZH2 tot de groep van 'chromatin modifiers'. Het betreft een tumor suppressor gen, waardoor voornamelijk LOF varianten van belang zijn. ASXL1 interageert met het polycomb-repressive complex (PRC) en promoot myeloïde transformatie door H3K27 tri-methylatie. Mutatiefrequenties zijn 14% in MDS, 11% AML, 45% CMML, 30% PMF en 4% PV/ET. ASXL1 mutaties zijn beschreven als 'secondary-type mutations', dewelke vroege genetische events zijn die leiden tot dysplasie en ineffektieve hematopoïese. Dit in tegenstelling tot de novo/pan-AML mutaties die voornamelijk verworven worden tijdens progressie van MDS naar AML en aldus latere genetische events zijn die myeloïde maturatie verhinderen en zo de stijging in blasten verklaren in (s)AML. Deze 'secondary-type' mutaties zijn geassocieerd met een ongunstig klinisch verloop. In ASXL1 zijn 70% frameshift mutaties en 30% puntmutaties. De klinische implicatie van frameshift mutaties is kortere tijd tot leukemische progressie. Wanneer enkel puntmutaties als cohort wordt getest, is er geen significante correlatie wat betreft tijd tot progressie naar AML. Bij frameshift en puntmutatie cohorts samen wordt enkel een trend gedetecteerd. Ook Malcovati et al. toont een ongunstig klinisch effect aan van ASXL1 mutaties in MDS op algemene overleving (HR 2,08). ASXL1 is een predictor voor ongunstige algemene overleving in zowel de volledige cohort als de intermediate-risk AML cohort. ASXL1 mutaties zijn exclusief met NPM1 in AML en geassocieerd met Runx1 mutaties.
5	PRES PATHOGENIC
6	ongunstige prognose

Lab	Interpretatie ASXL1 p.(Leu764Tyrf8)
7	pathogene mutatie
8	4-likely pathogenic
9	Variant Class IIIa: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: A. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant LIKELY DOES modify protein function
10	Waarschijnlijk pathogeen
11	Mutaties in ASXL1 zijn recurrent bij acute myeloïde leukemie. Mutaties in ASXL1 worden geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. Ref.: Chou et al. Blood 2010; 116 (20): 4086-94. Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. Pratorona et al. Haematologica 2012; 97(3):388-92. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. Patel et al. NEJM 366 (12), 2012. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in AML. Cazzola et al. Blood 122 (25), 2013. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance.
13	Vermoedelijk pathogene variant
14	Likely Pathogenic / Mutaties in ASXL1 zijn in AML geassocieerd met een lagere overleving (Dohner et al, Blood 2017; WHO 2017).
15	Pathogeen

Lab	Interpretatie RUNX1 p.(Pro49Leu)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
2	Les mutations RUNX1 sont associées avec l'âge, le genre (masculin) et les LMA secondaires à un SMD. Elles sont associées à des survies sans événement, survie sans rechute et une survie globale inférieures.
3	VUS
6	ongunstige prognose
7	waarschijnlijk pathogene mutatie
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function.
10	VUS
12	Signification inconnue
13	VUS
15	VUS

#### 4.1.3. Varianten gerapporteerd door minder dan 2/3 van de laboratoria en niet gevalideerd met ddPCR

Lab	Interpretatie RUNX1 p.(Met267Ile)
1	Deze variant: VUS (variant of unknown significance). Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
3	SNP
6	ongunstige prognose
8	4-likely pathogenic
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function.
10	VUS
12	Signification inconnue
13	VUS
15	VUS

Lab	Interpretatie ASXL1 p.(Gly646Trpfs*12)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig, kan ook artefact zijn. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
3	Classe 1* ou VUS
6	ongunstige prognose
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
13	Vermoedelijk pathogene variant
15	Pathogeen

Lab	interpretatie TET2 p.(Tyr867His)
2	Les mutations TET2 sont un marqueur pronostic défavorable dans les LMA avec un risque cytogénétique intermédiaire.
8	4-likely pathogenic
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	VUS
12	Pathogénique probable

Lab	interpretatie TET2 p.(Pro1723Ser)
2	Les mutations TET2 sont un marqueur pronostic défavorable dans les LMA avec un risque cytogénétique intermédiaire.
6	ongunstige prognose
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	VUS



Lab	Interpretatie ASXL1 p.(Met1249Val)
6	ongunstige prognose
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	VUS
15	VUS

Lab	interpretatie TET2 p.(Ile1762Val)
2	Les mutations TET2 sont un marqueur pronostic défavorable dans les LMA avec un risque cytogénétique intermédiaire.
6	ongunstige prognose

Lab	interpretatie TET2 p.(His1778Arg)
2	Les mutations TET2 sont un marqueur pronostic défavorable dans les LMA avec un risque cytogénétique intermédiaire.
6	ongunstige prognose

Lab	Interpretatie TP53 p.(Pro72Arg)
2	Les mutations TP53 sont retrouvées dans 60 à 80 % des LMA à caryotype complexe et sont fortement associées aux LMA induite par thérapie

Lab	Interpretatie DNMT3A p.(Arg729Trp)
11	Mutaties in DNMT3A zijn recurrent bij acute myeloïde leukemie. Mutaties in het DNMT3A gen worden geassocieerd met een eerder ONGUNSTIGE prognose. DNMT3A mutaties in AML zouden predictief zijn voor verbeterde respons op een hogere dosis van anthracyclines. Ref. Patel et al. NEJM 366 (12), 2012. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in AML.

Lab	Interpretatie CEBPA p.(His195_Pro196dup)
6	gekend polymorfisme

## 4.2. Klinische/biologische interpretaties: staal NGS-2017-006

### 4.2.1. Varianten gevalideerd met ddPCR

Lab	Interpretatie JAK2 p.(Val617Phe)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig. Interpretatie staal: Varianten in de genen JAK2 (driver mutatie), IDH2, IDH1, SF3B1 en ASXL1 passen bij de diagnose MPN type myelofibrose. De aanwezigheid van varianten in JAK2 (als driver mutatie) is meer ongunstig dan CALR of MPL. Varianten in het gen ASXL1 en de aanwezigheid van meer dan 2 varianten wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Shammo and Stein, 2016 ASH Educ. Program: 552-560).
2	La mutation Jak2 est observée chez 95 % des patient PV et 50 % des patients ET et PMF
3	Classe 1
4	Jak2 V617F komt voor in 90-95% van de PV, 40-60% ET en PMF. De test detecteert eveneens exon 12 mutaties in JAK2, die in 5% van de JAK2V617F-negatieve PV gevallen voorkomt. JAK2, MPL en CalR mutaties komen voor in 90% van ET en PMF. In de 10% resterende triple negatieve kunnen mutaties in andere genen, waaronder ASXL1, TET2, DNMT3A, ... gedetecteerd worden. Dus in meer dan 90% van de MPN gevallen kan klonaliteit aangetoond worden. Mutatie-analyse biedt hierdoor de mogelijkheid tot differentiatie van reactieve condities ten opzichte van clonale myeloproliferatieve neoplasmen. Mutuele exclusiviteit met CalR/MPL mutaties. Naast MPN worden in de helft van RARS-T (en nog in enkele kleinere subsets van andere MDS en mengvormen) JAK2V617F mutaties gedetecteerd. In PMF is de aanwezigheid van IDH mutatie en JAK2 mutatie indicatief voor snelle leukemische transformatie, wat synergistisch effect van beide mutaties veronderstelt. Dergelijk ongunstig klinisch verloop werd ook reeds aangetoond voor enkel IDH mutaties in PMF. In MPN is een JAK2 mutatie meestal founder in tegenstelling tot MDS waar het eerder als een subkloon optreedt.
5	PATHOGENIC
6	Deze puntmutatie kan worden teruggevonden bij patiënten met Polycytemia Vera (Vacquez) (97%), essentiële trombocytose (57%) en idiopathische myelofibrose (50%) (Lancet 2005: 365; 1054-1061).
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
8	5-Definitely pathogenic
9	Variant Class I: This variant is established as clinically actionable (druggable/predictive/prognostic and/or with diagnostic/classification implications) in the disease primary site & histology in which it has been identified
10	Pathogeen, gekende hotspot mutatie
11	De aanwezigheid van een mutatie in JAK2 is aanwezig bij 50% van patiënten met primaire myelofibrose. Bij PMF zijn JAK2 (exon 14) mutaties geassocieerd met een minder gunstige prognose. Ref: Guglielmelli et al., 2014. Leukemia 28(9): 1804-1810. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. Tefferi et al., 2014. Leukemia 28(7):1494-500. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients.
12	Pathogénique
13	Pathogene variant
14	Definitely pathogenic / JAK2 mutatie is een majeur criterium in de diagnose van PMF / Pre-PMF (WHO 2017).
15	Pathogeen

Lab	Interpretatie IDH2 p.(Arg172Ser)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig ovw aantal mutaties Interpretatie staal: Varianten in de genen JAK2 (driver mutatie), IDH2, IDH1, SF3B1 en ASXL1 passen bij de diagnose MPN type myelofibrose. De aanwezigheid van varianten in JAK2 (als driver mutatie) is meer ongunstig dan CALR of MPL. Varianten in het gen ASXL1 en de aanwezigheid van meer dan 2 varianten wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Shammo and Stein, 2016 ASH Educ. Program: 552-560).
2	Normalement, les mutations IDH ne sont pas retrouvées chez les patients PV ou ET. Elles sont présentes chez 4 % des patients PMF et surtout chez les patients MPN en phase blastique (20 %).

Lab	Interpretatie IDH2 p.(Arg172Ser)
3	Classe 4
4	Isocitraat dehydrogenasen komen cytosolisch (IDH1) of mitochondriaal (IDH2) voor waar ze de oxidatieve decarboxylatie van isocitraat $\alpha$ KG katalyseren. Betrokken bij cellulaire bescherming tegen oxidatieve schade. Mutaties komen voornamelijk voor op positie 140 en in mindere mate op positie 172. Deze varianten leiden tot neomorfe enzymatische activiteit. Frequentie van 8% in ongeselecteerde AML. Associatie met CN-AML (10-19%). IDH2 mutaties zijn geassocieerd met hogere leeftijd en moleculair 'low-risk' AML (NPM1pos / FLT3-ITDneg). IDH mutaties zijn mutueel exclusief met TET2 mutaties. Fase III klinische studie (ECOG E1900 cohort) toont aan dat IDH2 R140 specifiek geassocieerd is met gunstig verloop in AML, zowel in volledige cohort als CN-intermediate risk cohort. Combinatie van NPM1 met IDH1 of 2 toonden een specifiek gunstig verloop, superieur tov CN-favorable. In MDS worden IDH mutaties gedetecteerd in app. 2-5%. IDH mutaties in MDS zijn geassocieerd met oudere leeftijd, hoge thrombocyten telling, en mutaties in DNMT3A ( $p < 0,001$ ), ASXL1 ( $p = 0,007$ ), en SRSF2 ( $p < 0,001$ ). IDH is een predictieve factor voor ongunstige prognose bij patiënten met een IPSS of FAB of WHO low-risk MDS. Dit is niet het geval bij high-risk MDS. Indicatief voor moleculair 'low risk' AML en gunstig klinisch verloop wanneer co-mutatie met NPM1. Verder geen eenduidige impact op prognose. In MDS predictief voor ongunstig klinisch verloop en snelle leukemische progressie bij 'low risk' MDS.
5	PATHOGENIC
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
8	4-Likely pathogenic
9	Variant Class I: This variant is established as clinically actionable (druggable/predictive/prognostic and/or with diagnostic/classification implications) in the disease primary site & histology in which it has been identified
10	Pathogeen, gekende hotspot mutatie
11	Mutaties in IDH2 zijn gekend bij primaire myelofibrose. Mutaties in IDH bij PMF patiënten worden geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. Ref. Tefferi et al., 2012. Leukemia 26(3):475-80. IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with JAK2V617F. Vannucchi et al., 2013. Leukemia 27:1861-69. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis.
12	Pathogénique
13	Pathogene variant
14	Definitely pathogenic / IDH1 en IDH2 mutatie zijn beschreven in PMF en zijn geassocieerd met slechter prognose en hoger kans voor leukemische transformatie (Tefferi et al., Leukemia 2010; Yonal-Hindilerden et al., J Clin Res Med 2016)
15	Pathogeen

Lab	Interpretatie IDH1 p.(Arg132Ser)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig ovw aantal mutaties Interpretatie staal: Varianten in de genen JAK2 (driver mutatie), IDH2, IDH1, SF3B1 en ASXL1 passen bij de diagnose MPN type myelofibrose. De aanwezigheid van varianten in JAK2 (als driver mutatie) is meer ongunstig dan CALR of MPL. Varianten in het gen ASXL1 en de aanwezigheid van meer dan 2 varianten wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Shammo and Stein, 2016 ASH Educ. Program: 552-560).
2	Normalement, les mutations IDH ne sont pas retrouvées chez les patients PV ou ET. Elles sont présentes chez 4 % des patients PMF et surtout chez le patients MPN en phase blastique (20 %).
3	Classe 4
4	Isocitraat dehydrogenasen komen cytosolisch (IDH1) of mitochondriaal (IDH2) voor waar ze de oxidatieve decarboxylatie van isocitraat $\alpha$ KG katalyseren. Betrokken bij cellulaire bescherming tegen oxidatieve schade. Mutaties komen voornamelijk voor op positie 132. Deze variant leidt tot neomorfe enzymatische activiteit. Frequentie van 8% in ongeselecteerde AML. Associatie met CN-AML (10-16%). IDH1 R132 is geassocieerd met moleculair 'low-risk' AML (NPM1pos / FLT3-ITDneg). IDH mutaties zijn mutueel exclusief met TET2 en WT1 mutaties. Combinatie van NPM1 met IDH1 of 2 toonden een specifiek gunstig verloop, superieur tov CN-favorable. In MDS worden IDH mutaties gedetecteerd met een frequentie van 5%. IDH mutaties in MDS zijn geassocieerd met oudere leeftijd, hoge thrombocyten telling, en mutaties in DNMT3A ( $p < 0,001$ ), ASXL1 ( $p = 0,007$ ), en SRSF2 ( $p < 0,001$ ).
5	PATHOGENIC

Lab	Interpretatie IDH1 p.(Arg132Ser)
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
8	5-Definitely pathogenic
9	Variant Class I: This variant is established as clinically actionable (druggable/predictive/prognostic and/or with diagnostic/classification implications) in the disease primary site & histology in which it has been identified
10	Pathogeen, gekende hotspot mutatie
11	Mutaties in IDH1 zijn gekend bij primaire myelofibrose. Mutaties in IDH bij PMF patiënten worden geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. Ref. Tefferi et al., 2012. Leukemia 26(3):475-80. IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with JAK2V617F. Vannucchi et al., 2013. Leukemia 27:1861-69. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis.
12	Pathogénique
13	Pathogene variant
14	Definitely pathogenic / IDH1 en IDH2 mutatie zijn beschreven in PMF en zijn geassocieerd met slechter prognose en hoger kans voor leukemische transformatie (Tefferi et al., Leukemia 2010; Yonal-Hindilerden et al., J Clin Res Med 2016).
15	Pathogeen

Lab	Interpretatie SF3B1 p.(Lys700Glu)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig ovw aantal mutaties Interpretatie staal: Varianten in de genen JAK2 (driver mutatie), IDH2, IDH1, SF3B1 en ASXL1 passen bij de diagnose MPN type myelofibrose. De aanwezigheid van varianten in JAK2 (als driver mutatie) is meer ongunstig dan CALR of MPL. Varianten in het gen ASXL1 en de aanwezigheid van meer dan 2 varianten wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Shammo and Stein, 2016 ASH Educ. Program: 552-560).
3	Classe 1
4	SF3B1 is een component van het RNA splicing complex samen met SRSF2, U2AF1 en ZRSR2. Volgens Papaemmanuil et al. kan er een chronologisch mutatieprofiel afgeleid worden waarbij mutaties in spliceosomale componenten als founder worden waargenomen. SF3B1 mutaties zijn gain-of-function mutation met dus voornamelijk missense mutaties. Malcovati et al. tonen aan dat SF3B1 mutaties voorkomen in >90% van RARS. Bovendien blijkt dat SF3B1 mutatiepositieve MDS een 'distinct subset' vormt binnen MDS met een homogeen geno- en fenotype en gunstig klinisch verloop, ongeacht de klinische classificatie (WHO). Omgekeerd, MDS met ringsideroblasten maar afwezig voor SF3B1 mutatie (voornamelijk RCMD), vormt een aparte cluster met andere MDS subtypes en een significant slechtere prognose. Mutaties van het spliceosoom complex zijn mutueel exclusief. SF3B1 K700E hotspot mutatie strikt geassocieerd met ringsideroblasten.
6	mutatie vaak geassocieerd met MDS/MPN-RS-T
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
8	5-Definitely pathogenic
10	Pathogeen, gekende hotspot mutatie
11	Mutaties in SF3B1 zijn recurrent in myelofibrose. De betekenis van deze mutaties in PMF patiënten is nog onduidelijk. Mutaties in SF3B1 in PMF patiënten worden als secundaire mutaties beschouwd. Ref. Lasho et al., 2012. Leukemia 26: 1135-1137. SF3B1 mutations in primary myelofibrosis: clinical, histopathology and genetic correlates among 155 patients.
12	Pathogénique probable
13	Pathogene variant
14	Definitely pathogenic /SF3B1 mutatie is beschreven in PMF maar zonder duidelijk prognose betekenis.
15	Pathogeen

#### 4.2.2. Varianten gerapporteerd door minstens 2/3 van de laboratoria en niet gevalideerd met ddPCR

Lab	Interpretatie ASXL1 p.(Tyr591*)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig Interpretatie staal: Varianten in de genen JAK2 (driver mutatie), IDH2, IDH1, SF3B1 en ASXL1 passen bij de diagnose MPN type myelofibrose. De aanwezigheid van varianten in JAK2 (als driver mutatie) is meer ongunstig dan CALR of MPL. Varianten in het gen ASXL1 en de aanwezigheid van meer dan 2 varianten wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Shammo and Stein, 2016 ASH Educ. Program: 552-560).
3	Classe 1*
4	ASXL1 behoort samen met EZH2 tot de groep van 'chromatin modifiers'. Het betreft een tumor suppressor gen, waardoor voornamelijk LOF varianten van belang zijn. ASXL1 interageert met het polycomb-repressieve complex (PRC) en promoot myeloïde transformatie door H3K27 tri-methylatie. Mutatiefrequenties zijn 14% in MDS, 11% AML, 45% CMML, 30% PMF en 4% PV/ET. ASXL1 mutaties zijn beschreven als 'secondary-type mutations', dewelke vroege genetische events zijn die leiden tot dysplasie en ineffektieve hematopoïese. Dit in tegenstelling tot de novo/pan-AML mutaties die voornamelijk verworven worden tijdens progressie van MDS naar AML en aldus latere genetische events zijn die myeloïde maturatie verhinderen en zo de stijging in blasten verklaren in (s)AML. Deze 'secondary-type' mutaties zijn geassocieerd met een ongunstig klinisch verloop. In ASXL1 zijn 70% frameshift mutaties en 30% puntmutaties. De klinische implicatie van frameshift mutaties is kortere tijd tot leukemische progressie. Wanneer enkel puntmutaties als cohort wordt getest, is er geen significante correlatie wat betreft tijd tot progressie naar AML. Bij frameshift en puntmutatie cohorts samen wordt enkel een trend gedetecteerd. Ook Malcovati et al. toont een ongunstig klinisch effect aan van ASXL1 mutaties in MDS op algemene overleving (HR 2,08). ASXL1 is een predictor voor ongunstige algemene overleving in zowel de volledige cohort als de intermediate-risk AML cohort. ASXL1 mutaties zijn exclusief met NPM1 in AML en geassocieerd met Runx1 mutaties.
5	PRES PATHOGENIC
6	ongunstige prognose
7	pathogene mutatie
8	5-Definitely pathogenic
9	Variant Class IIIa: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: A. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant LIKELY DOES modify protein function
10	Pathogeen
11	Mutaties in ASXL1 zijn recurrent in primaire myelofibrose. De aanwezigheid van een mutatie in het ASXL1 gen bij CALR-mutatie negatieve patiënten wordt geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose in PMF patiënten. Ref. Lundberg et al., 2014. Blood 123(14): 2220-8. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. Tefferi et al., 2014. Leukemia 28(7):1494-500. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients.
13	Vermoedelijk pathogene variant
14	Likely Pathogenic / mutatie in ASXL1 in PMF is geassocieerd met een lagere overleving (Vannucchi et al., Leukemia 2013 ; Yonal-Hindilerden et al., J Blood Med 2015).
15	Pathogeen

Lab	Interpretatie ASXL1 p.(Leu764Tyrfs*8)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig Interpretatie staal: Varianten in de genen JAK2 (driver mutatie), IDH2, IDH1, SF3B1 en ASXL1 passen bij de diagnose MPN type myelofibrose. De aanwezigheid van varianten in JAK2 (als driver mutatie) is meer ongunstig dan CALR of MPL. Varianten in het gen ASXL1 en de aanwezigheid van meer dan 2 varianten wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Shammo and Stein, 2016 ASH Educ. Program: 552-560).
3	Classe 1

Lab	Interpretatie ASXL1 p.(Leu764Tyrfs*8)
4	idem variant 2
5	PRES PATHOGENIC
6	ongunstige prognose
7	pathogene mutatie
8	4-Likely pathogenic
9	Variant Class IIIa: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: A. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant LIKELY DOES modify protein function
10	Waarschijnlijk pathogeen
11	Mutaties in ASXL1 zijn recurrent in primaire myelofibrose. De aanwezigheid van een mutatie in het ASXL1 gen bij CALR-mutatie negatieve patiënten wordt geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose in PMF patiënten. Ref. Lundberg et al., 2014. Blood 123(14): 2220-8. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. Tefferi et al., 2014. Leukemia 28(7):1494-500. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients.
13	Vermoedelijk pathogene variant
14	Likely Pathogenic / Mutatie in ASXL1 in PMF is geassocieerd met een lagere overleving (Vannucchi et al., Leukemia 2013 ; Yonal-Hindilerden et al., J Blood Med 2015).
15	Pathogeen



#### 4.2.3. Varianten gerapporteerd door minder dan 2/3 van de laboratoria en niet gevalideerd met ddPCR

Lab	nterpretatie TET2 p.(Tyr867His)
2	La présence de mutations TET2 est associée à une survie supérieure dans les SMD (sauf en cas de transplantation hématopoïétique).
8	4-Likely pathogenic
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	VUS
12	Pathogénique probable

Lab	Interpretatie TET2 p.(Pro1723Ser)
2	La présence de mutations TET2 est associée à une survie supérieure dans les SMD (sauf en cas de transplantation hématopoïétique).
6	mutatie is geassocieerd met MPN; niet prognostisch
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	VUS
12	Signification inconnue

Lab	Interpretatie TET2 p.(Leu1721Trp)
2	La présence de mutations TET2 est associée à une survie supérieure dans les SMD (sauf en cas de transplantation hématopoïétique).
6	mutatie is geassocieerd met MPN; niet prognostisch

Lab	Interpretatie TET2 p.(Ile1762Val)
2	La présence de mutations TET2 est associée à une survie supérieure dans les SMD (sauf en cas de transplantation hématopoïétique).
6	mutatie is geassocieerd met MPN; niet prognostisch

Lab	Interpretatie TET2 p.(His1778Arg)
2	La présence de mutations TET2 est associée à une survie supérieure dans les SMD (sauf en cas de transplantation hématopoïétique).
6	mutatie is geassocieerd met MPN; niet prognostisch

### 4.3. Klinische/biologische interpretaties: staal NGS-2017-007

#### 4.3.1. Varianten gevalideerd met ddPCR

Lab	Interpretatie SF3B1 p.(Lys666Asn)
1	Deze variant: prognostisch gunstig. Interpretatie staal: Varianten in de genen TP53, SF3B1, EZH2 en TET2 passen bij de diagnose MDS. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53 en EZH2 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Kennedy and Ebert, J Clin Onc 2017. 35(9):968-974).
2	Les mutations SF3B1 sont associées avec une survie globale favorable et un risque plus faible de transformation en LMA.
3	Classe 1
4	SF3B1 is een component van het RNA splicing complex samen met SRSF2, U2AF1 en ZRSR2. Volgens Papaemmanuil et al. kan er een chronologisch mutatieprofiel afgeleid worden waarbij mutaties in spliceosomale componenten als founder worden waargenomen. SF3B1 mutaties zijn gain-of-function mutation met dus voornamelijk missense mutaties. Malcovati et al. tonen aan dat SF3B1 mutaties voorkomen in >90% van RARS. Bovendien blijkt dat SF3B1 mutatiepositieve MDS een 'distinct subset' vormt binnen MDS met een homogeen geno- en fenotype en gunstig klinisch verloop, ongeacht de klinische classificatie (WHO). Omgekeerd, MDS met ringsideroblasten maar afwezig voor SF3B1 mutatie (voornamelijk RCMD), vormt een aparte cluster met andere MDS subtypes en een significant slechtere prognose. Mutaties van het spliceosoom complex zijn mutueel exclusief. Strikt geassocieerd met RS fenotype (RARS, RARS-T, RCMD-RS). Geassocieerd met lagere hemoglobine niveau's, verhoogde WBC en thrombocyten, en geassocieerd met DNMT3A co-mutatie.
5	PATHOGENIC
6	mutatie vaak geassocieerd met MDS/MPN-RS-T, gunstige prognose
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
8	4-Likely pathogenic
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	Pathogeen, gekende hotspot mutatie
11	Mutaties in SF3B1 zijn recurrent in myelodysplastische syndromen. Een mutatie in SF3B1 (exon 14) komt voor bij ongeveer 15-30% van de patiënten met MDS (associatie met de aanwezigheid van ring sideroblasten) (volgens WHO 2016: "MDS with ring sideroblasts (MDS-RS)") en wordt geassocieerd met een GUNSTIGE prognose. Ref. Arber et al., 2016. Blood 127(20):2391-2405. The 2016 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Bejar et al., 2014 Haematologica 99(6): 956-964. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes.
12	Signification inconnue
13	Pathogene variant
14	Definitely pathogenic / Mutaties in SF3B1 komen frequent voor in MDS en zijn geassocieerd met de aanwezigheid van ring sideroblasten (MDS-RS) en met een goede prognose (Arber Blood 2016; WHO 2017). Belangrijk, mutaties in SF3B1 zijn ook beschreven als CHIP ("clonal hematopoiesis of indeterminate potential") en de aanwezigheid van deze mutatie alleen is niet voldoende voor de diagnose van MDS (Arber et al Blood, 2016; WHO 2017).
15	Pathogeen

Lab	Interpretatie TP53 p.(Ala161Asp)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig Interpretatie staal: Varianten in de genen TP53, SF3B1, EZH2 en TET2 passen bij de diagnose MDS. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53 en EZH2 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Kennedy and Ebert, J Clin Onc 2017. 35(9):968-974).



Lab	Interpretatie TP53 p.(Ala161Asp)
2	Les mutations TP53 sont souvent associées avec un 5q-, corrélées à un mauvais pronostic (diminution de la survie globale) et à une plus mauvaise réponse aux agents hypométhylants. Elles sont aussi associées à un risque plus élevé de transformation en LMA
3	Classe 3A
4	idem variant 3
5	PRES PATHOGENIC
6	ongunstige prognose
7	pathogene mutatie
8	4-Likely pathogenic
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	VUS
11	Mutaties in TP53 zijn recurrent in myelodysplastische syndromen. Mutaties in de genen TP53 en DNMT3A worden over het algemeen geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. De aanwezigheid van een mutatie in het TP53 gen in combinatie met een 5q- wordt in MDS geassocieerd met agressieve ziekte en een verminderde respons op lenalidomide. Ref. Bejar et al., 2014 Haematologica 99(6): 956-964. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. Arber et al., 2016. Blood 127(20):2391-2405. The 2016 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia.
12	Signification inconnue
13	Vermoedelijk pathogene variant
15	Pathogeen

Lab	Interpretatie TP53 p.(Tyr220Cys)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig Interpretatie staal: Varianten in de genen TP53, SF3B1, EZH2 en TET2 passen bij de diagnose MDS. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53 en EZH2 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Kennedy and Ebert, J Clin Onc 2017. 35(9):968-974).
2	Les mutations TP53 sont souvent associées avec un 5q-, corrélées à un mauvais pronostic (diminution de la survie globale) et à une plus mauvaise réponse aux agents hypométhylants. Elles sont aussi associées à un risque plus élevé de transformation en LMA
3	Classe 1
4	Het TP53 gen, dat gelegen is 17p13.1, is een gen dat codeert voor het p53 eiwit, een transcriptionele regulator waarbij cel cyclus arrest en apoptose geïnduceerd wordt in het geval van DNA schade. TP53 mutaties zijn één van de meest frequente genetische abnormaliteiten in kanker en bovendien een belangrijke prognostische merker voor AML, gezien het de therapie-gerelateerde AML/MDS subgroep identificeert. t-AML is een complicatie ten gevolge van van cytotoxische chemo- en/of radiotherapie. T-AML/MDS is gekenmerkt door een hogere incidentie van TP53 mutaties, chromosoom 5 of 7 abnormaliteiten, complexe cytogenetica en chemoresistentie. Het betreft een tumor suppressor waarbij zowel frameshift, nonsense en missense mutaties van belang zijn. Wong T et al heeft aangetoond dat TP53 mutaties in t-AML/MDS frequent zijn maar dat ze reeds jaren vóór toediening van cytotoxische therapie reeds subclonaal aanwezig zijn, ten gevolge van bvb verhoogde mutatiefrequentie door oa. leeftijd. Tijdens behandeling wordt de TP53mut subkloon uitgeselecteerd met verhoogde proliferatie in de jaren nadien, met t-AML tot gevolg. Gekende driver mutaties in de novoAML zijn significant minder aanwezig in t-AML/MDS (bvb DNMT3A, NPM1, TET2). T-AML/MDS is aldus gekenmerkt door een specifiek mutatieprofiel. TP53 mutatiefrequentie varieert van 5-35% in t-AML/MDS en zijn geassocieerd met complexe cytogenetica en ongunstige prognose. Malcovati et al.toont een onafhankelijk effect op algemene overleving van TP53 mutaties in MDS (HR 6,00). Lindsley et al. classificeert TP53 mutatiepositieve patiënten als een aparte subgroep met minst gunstige algemene overleving. Bijna de helft van de MDS patiënten bezit een mutatie in TP53, DNMT3A of TET2 dewelke 64% van de sterftes vertegenwoordigt. 3-jaarsoverleving in de cohort negatief voor deze drie mutaties bedraagt 59%, versus 19% in de cohort met deze mutatie (Bejar R, JCO, 2014). TP53 mutaties zijn geassocieerd met complex en monosomaal karyotype en met excessieve blasten en thrombocytopenie. TP53 is

Lab	Interpretatie TP53 p.(Tyr220Cys)
	gemuteerd in 20% van del(5q) patiënten.
5	PRES PATHOGENIC
8	5-Definitely pathogenic
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	Pathogeen
11	Mutaties in TP53 zijn recurrent in myelodysplastische syndromen. Mutaties in de genen TP53 en DNMT3A worden over het algemeen geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. De aanwezigheid van een mutatie in het TP53 gen in combinatie met een 5q- wordt in MDS geassocieerd met agressieve ziekte en een verminderde respons op lenalidomide. Ref. Bejar et al., 2014 Haematologica 99(6): 956-964. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. Arber et al., 2016. Blood 127(20):2391-2405. The 2016 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia.
12	Pathogénique
13	Vermoedelijk pathogene variant
14	Definitely pathogenic / Mutaties in TP53 in MDS zijn geassocieerd met een slechte prognose (Al-Issa, K., et al, Blood 2016 ; WHO 2017).
15	Pathogeen

#### 4.3.2. Varianten gerapporteerd door minstens 2/3 van de laboratoria en niet gevalideerd met ddPCR

Lab	Interpretatie EZH2 p.(Cys539Arg)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig Interpretatie staal: Varianten in de genen TP53, SF3B1, EZH2 en TET2 passen bij de diagnose MDS. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53 en EZH2 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Kennedy and Ebert, J Clin Onc 2017. 35(9):968-974).
2	Les mutations EZH2 sont un marqueur pronostic associé avec une survie globale plus faible.
3	Classe 3A*
4	ASXL1 behoort samen met EZH2 tot de groep van 'chromatin modifiers'. In tegenstelling tot epitheliale maligniteiten, wordt EZH2 activiteit bij myeloïde maligniteiten gekenmerkt als zijnde een tumor suppressor. EZH2 mutatie-positiviteit in MDS is geassocieerd met cytogenetische abnormaliteiten in chromosoom 7. EZH2 mutaties komen voornamelijk voor bij IPSS 'low' of 'intermediate-1'. Significant geassocieerd met verminderde algemene overleving. Bewezen klinisch voordeel van intensifiëring van behandeling of gebruik van hypomethyleerende therapeutica, doch betreft het geen eenduidige genetische of epigenetische merker voor predictie van respons. EZH2 mutaties komen samen voor met Jak2V717F of ASXL1 in MPN en is een sterke indicator voor verminderde leukemie-vrije overleving en algemene overleving, in het bijzonder bij PMF. EZH2 mutaties zijn frequent in CMML en voorspellen een kortere algemene overleving dan verwacht op basis van klinische kenmerken in alle myeloïde neoplasmen. Geassocieerd met RCMD en RAEB.
6	ongunstige prognose
8	4-Likely pathogenic
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	VUS
11	Mutaties in EZH2 zijn recurrent in myelodysplastische syndromen. Mutaties in EZH2 worden geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. Ref: Cazzola et al., 2013. Blood 122(25):4021-4034. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance.

Lab	Interpretatie EZH2 p.(Cys539Arg)
12	Signification inconnue
15	VUS

#### 4.3.3. Varianten gerapporteerd door minder dan 2/3 van de laboratoria en niet gevalideerd met ddPCR

Lab	Interpretatie TET2 p.(Arg1261His)
1	Deze variant: prognose niet gekend Interpretatie staal: Varianten in de genen TP53, SF3B1, EZH2 en TET2 passen bij de diagnose MDS. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53 en EZH2 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Kennedy and Ebert, J Clin Onc 2017. 35(9):968-974).
4	<p>TET2, gelegen op 4q24, Behoort samen met idh1/2, asxl1 en dnmt3a tot de klasse "epigenetic modifier". TET2 heeft dioxygenase enzymatische activiteit, afhankelijk van Fe(II) en <math>\alpha</math>KG. Het catalytisch domein is C-terminaal gelegen en medieert de conversie van een methylgroep op de 5'positie van cytosine (5mC) naar 5'hydroxymethyl cytosine (5hmC). Deze geoxideerde variant van 5mC heeft diverse transcriptionele effecten in het genomisch DNA. Muismodellen met genetische TET2 deletie resulteert in progressieve expansie van het hematopoietisch stamcel compartiment en de ontwikkeling van een proliferatieve myeloïede maligniteit, sterk gelijkend op CMML. Op zich, kan TET2 deletie geen AML veroorzaken.</p> <p>Tet2 mutaties (meestal loss of function) waargenomen in verschillende myeloïde malignancies  19% in MDS  4-13% in MPN  22-42% in CMML  12-16% in AML  Mutueel exclusief met idh1/2  Bijna de helft van de MDS patiënten bezit een mutatie in TP53, DNMT3A of TET2 dewelke 64% van de sterftes vertegenwoordigt. 3-jaarsoverleving in de cohort negatief voor deze drie mutaties bedraagt 59%, versus 19% in de cohort met deze mutatie (Bejar R, JCO, 2014).</p> <p>AML: Negatief prognostisch effect voornamelijk in intermediate-risk AML, doch eerder trend.  MDS: Tet2 mutaties reeds vaak geassocieerd met betere HMT (AZA/DEC) respons, doch niet eenduidig. Betere ORR op 5-azacytidine en/of decitabine indien subclones (&lt;10%VAF) als wildtype worden behandeld. Respons rates zijn het hoogst in de subgroep met TET2 mutante patiënten zonder clonale ASXL1 mutatie.</p> <p>MDS/MPN (CMML): Tet2 gemuteerd in 50-60% bij CMML. In CMML, tet2 typisch een comutatie met SRSF2</p> <p>MPN: Tet2 mutaties komen in MPN vaak voor samen met Jak2 mutaties. De volgorde waarin JAK2 en TET2-mutaties worden verworven beïnvloedt de klinische kenmerken, de respons op gerichte therapieën, en de biologie en clonale evolutie bij MPN.  A) jak2 first: vnl jak2/tet2 dubbel mutaties: grotere kans op PV itt ET, verhoogd risico op trombose en verhoogde gevoeligheid op ruxolitinib. Tet2 mutatie noodzakelijk voor stamcel/progenitor expansie, doch reeds megakaryocytose en erthrocytose, wat leidt tot vroege klinische presentatie.  B) tet2 first: vnl tet2 single mutaties. Tet2 verandert transcriptioneel pad van jak2 V617F en verhindert jak2 mutatie van genen geassocieerd met proliferatie op te reguleren</p>
7	pathogene mutatie
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	Waarschijnlijk pathogeen
11	Mutaties in TET2 komen voor bij ongeveer 25% van de patiënten met MDS. Mutaties in TET2 zijn niet geassocieerd met slechtere overleving in MDS patiënten. Ref. Bejar et al., 2014 Haematologica 99(6): 956-964. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. Itzykson et al., 2011. Leukemia 25(7):1147-52. Impact of TET2 mutations on response rate to

Lab	Interpretatie TET2 p.(Arg1261His)
	azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias
13	Vermoedelijk pathogene variant
15	VUS

Lab	Interpretatie TET2 p.(Gln1084Pro)
2	La présence de mutation TET2 est associée à une survie supérieure dans les SMD (sauf en cas de transplantation hématopoïétique).
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	VUS
12	Pathogénique probable
15	VUS

Lab	Interpretatie TET2 p.(Ile1762Val)
2	La présence de mutations TET2 est associée à une survie supérieure dans les SMD (sauf en cas de transplantation hématopoïétique).
6	vaak voorkomend in MDS, slechte prognose in combinatie met andere mutaties

Lab	Interpretatie TP53 p.(Pro72Arg)
2	Les mutations TP53 sont souvent associées avec un 5q-, corrélées à un mauvais pronostic (diminution de la survie globale) et à une plus mauvaise réponse aux agents hypométhylants. Elles sont aussi associées à un risque plus élevé de transformation en LMA

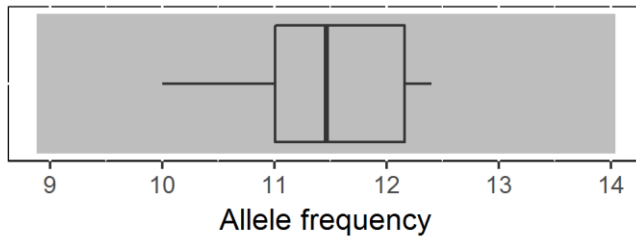
Lab	Interpretatie TET2 p.(Leu1721Trp)
2	La présence de mutations TET2 est associée à une survie supérieure dans les SMD (sauf en cas de transplantation hématopoïétique).

Lab	Interpretatie EZH2 p.(Asp146His)
6	onvoldoende coverage

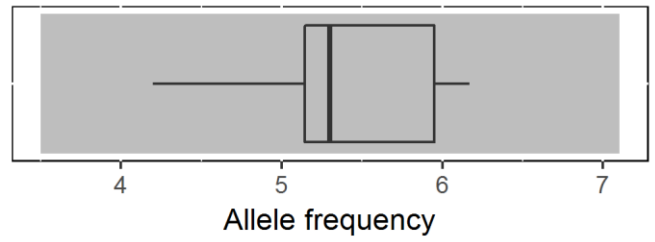
Lab	Interpretatie DNMT3A p.(Arg729Trp)
11	Mutaties in DNMT3A zijn recurrent in myelodysplastische syndromen. Mutatie in DNMT3A worden geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. Ref: Bejar et al., 2014 Haematologica 99(6): 956-964. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. Mutaties in de genen DNMT3A en SF3B1 zijn recurrent bij MDS-RARS. De combinatie van een mutatie in het DNMT3A gen en het SF3B1 gen wordt geassocieerd met een EERDER GUNSTIGE PROGNOSE. Ref: Cazzola et al., 2013. Blood 122(25): 4021-4035

#### 4.4. "Boxplot" voor de varianten van het staal NGS-2017-005

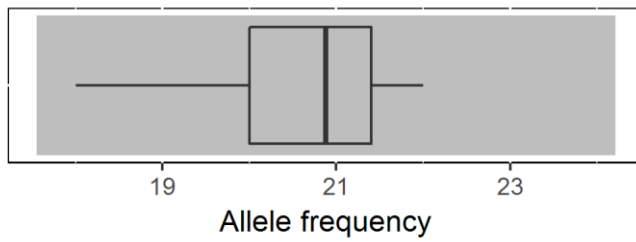
FLT3 p.(Asp835Tyr)



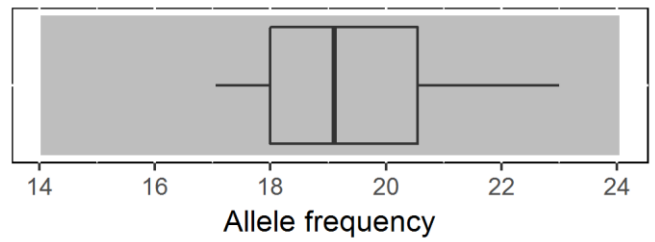
IDH1 p.(Arg132Gly)



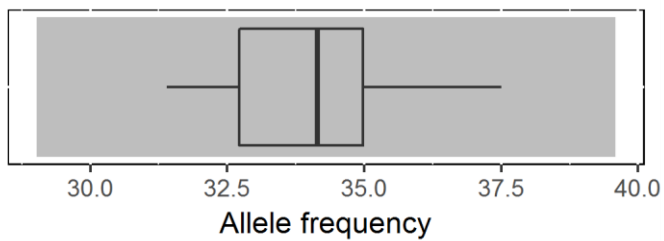
IDH2 p.(Arg140Gln)



KIT p.(Asp816Val)

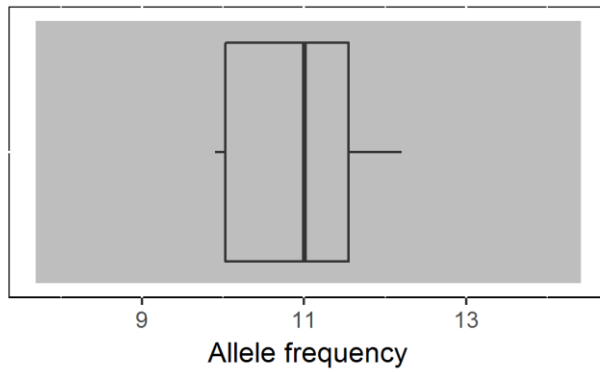


TP53 p.(Glu171\*)

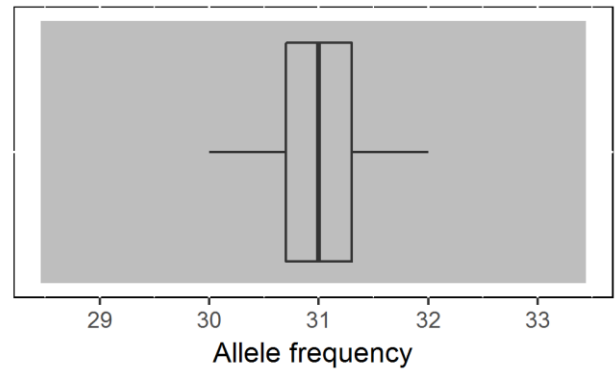


#### 4.5. "Boxplot" voor de varianten van het staal NGS-2017-006

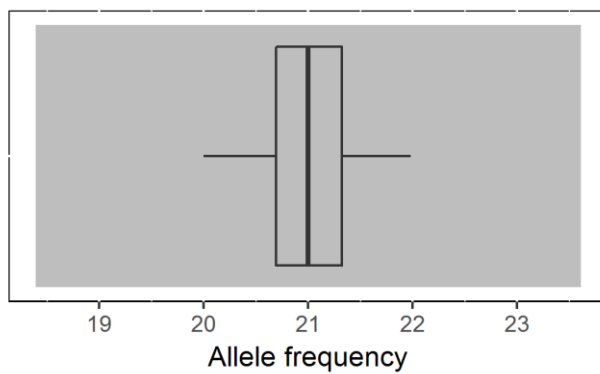
IDH1 p.(Arg132Ser)



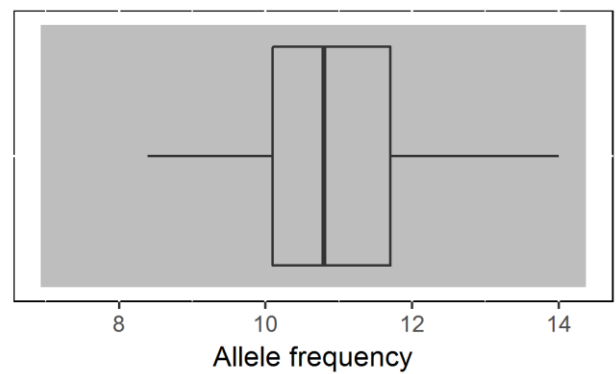
IDH2 p.(Arg172Ser)



JAK2 p.(Val617Phe)

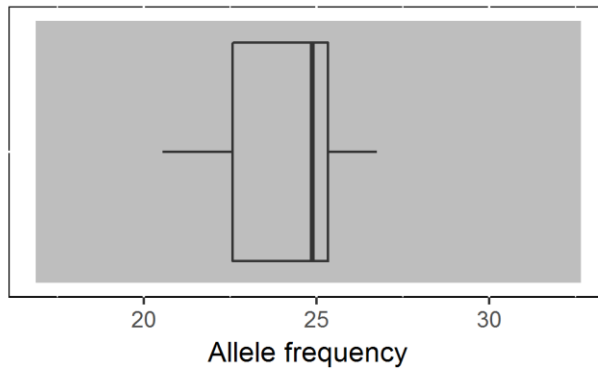


SF3B1 p.(Lys700Glu)

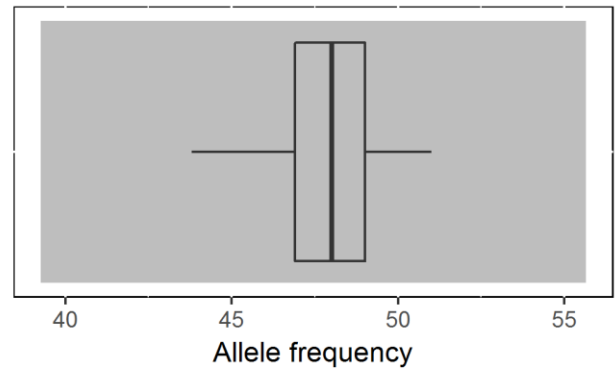


#### 4.6. "Boxplot" voor de varianten van het staal NGS-2017-007

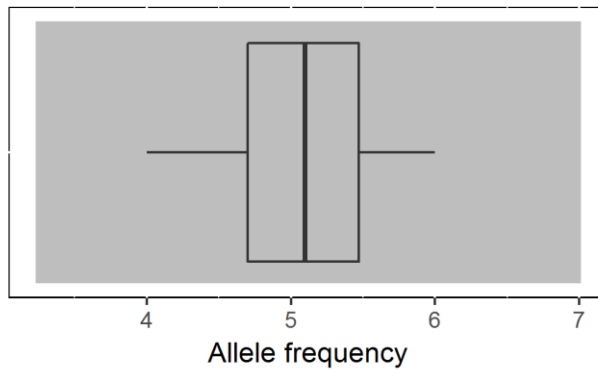
SF3B1 p.(Lys666Asn)



TP53 p.(Ala161Asp)



TP53 p.(Tyr220Cys)



#### 4.7. 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, alle methoden samen.

De volgende gegevens worden vermeld:

- Uw resultaat (MRAF)
- De mediaan (MAF):  
de middenwaarde van de resultaten van alle laboratoria, alle methoden samen.
- De algemene standaarddeviatie (SD):  
de maatstaf van 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):  
 **$Z = (MRAF - MAF) / SD$**   
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.

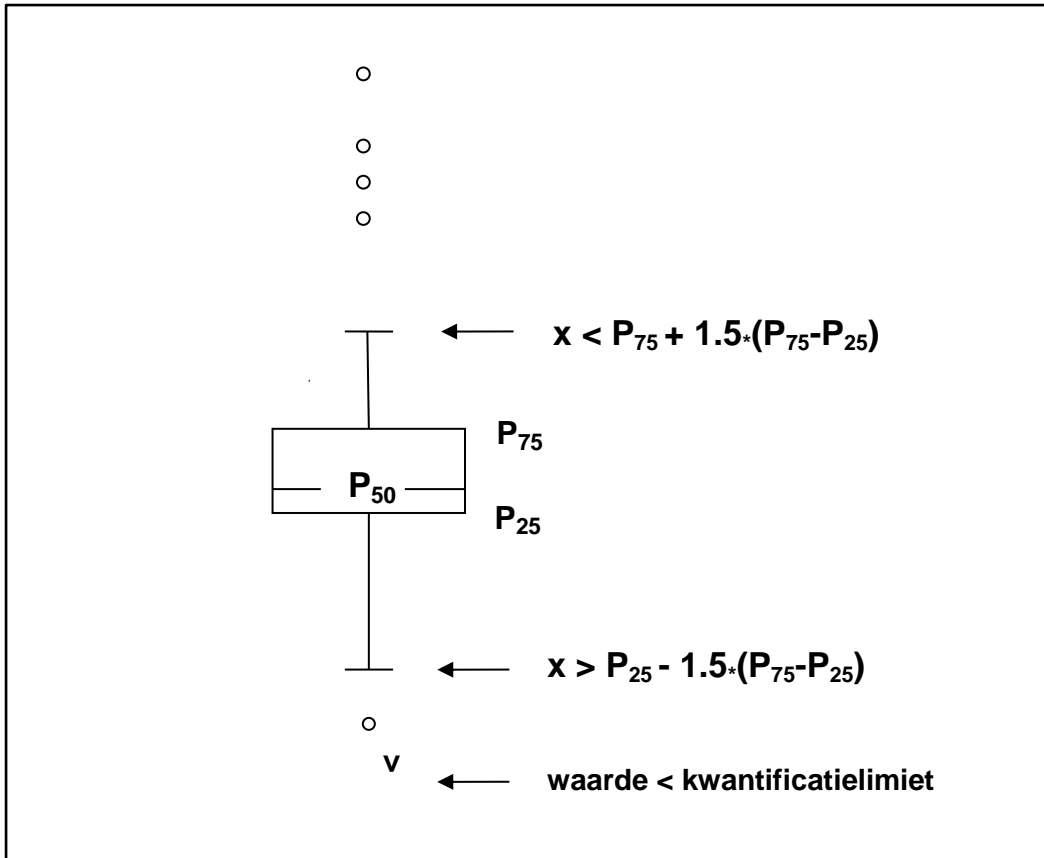
Deze parameters geven u een ruwe indicatie van de positie van uw resultaat (MRAF) ten opzichte van de mediaan (MAF).

#### Grafische weergave

Naast de resultaatstabellen wordt soms een grafische weergave in "boxplot" toegevoegd. Hierin zijn de volgende elementen opgenomen:

- een rechthoek vanaf percentiel 25 ( $P_{25}$ ) tot percentiel 75 ( $P_{75}$ )
- een middenlijn die de mediaan van de resultaten weergeeft ( $P_{50}$ )
- een benedenlijn die de kleinste waarde weergeeft  $x > P_{25} - 1.5 * (P_{75} - P_{25})$
- een bovenlijn die de grootste waarde weergeeft  $x > P_{75} - 1.5 * (P_{75} - P_{25})$
- Alle punten buiten dit bereik worden weergegeven door een cirkel.






---

**EINDE**

---

© Sciensano, Brussel 2018.

Dit rapport mag niet worden gereproduceerd, gepubliceerd of verspreid zonder schriftelijke toestemming 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.