

**EXPERTISE, DIENSTVERLENING EN KLANTENRELATIES**

**KWALITEIT VAN LABORATORIA**

***AD HOC* EXPERTENCOMITE**

**BENCHMARKING TRIAL**

**DEFINITIEF GLOBAAL RAPPORT**  
**Next Generation Sequencing (NGS)**  
**BRCA1/BRCA2**  
**2018/1**

**Sciensano/NGS benchmark trial/3-NL**

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

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

<b>AD HOC EXPERTENCOMITE</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>Experten</b>	<b>Instelling</b>				
Dr. Philippe Aftimos	Instituut Jules Bordet				
Dr. Valérie Capraro	CHU-ULG				
Dr. Kathleen Claes	UZ Gent				
Dr. Els Dequeker	UZ Leuven				
Dr. Nicky d'Haene	ULB-Erasme				
Dr. Helena Devos	AZ Sint-Jan				
Dr. Guy Froyen	Jessa Ziekenhuis				
Dr. Koen Jacobs	AZ Sint-Lucas				
Dr. Frédéric Lambert	CHU-ULG				
Dr. Suzan Lambin	UZA				
Dr. Els Lierman	UZ Leuven				
Dr. Brigitte Maes	Jessa Ziekenhuis				
Dr. Friedel Nollet	AZ Sint-Jan				
Dr. Patrick Pauwels	UZA				
Dr. Roberto Salgado	GZA Ziekenhuis				
Dr. Karl Vandepoele	UZ Gent				
Dr. Pascal Vannuffel	IPG				
Dr. Christine Weyn	UZA				
Aline Hébrant	Sciensano				

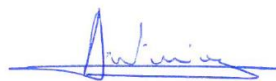
Els Van Valckenborgh	Sciensano
Marc Van den Bulcke	Sciensano
Philippe Van de Walle	Sciensano
Wim Coucke	Sciensano
Mohamed Rida Soumali	Sciensano
Thomas Delcourt	Sciensano

Een voorlopige versie van dit rapport werd voorgelegd aan de experten op: 03/10/2018.  
Dit rapport is besproken in de vergadering van het *ad hoc* expertencomité van: 13/11/2018.

**Verantwoordelijkheden:**

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

**Toestemming verspreiding rapport:** Door Aline Antoniou, enquêtecoördinator, van de NGS-benchmark trial, op 10/12/2018.



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-benchmark trial voor de genen BRCA1 en BRCA2 .....	5
1.2. Uitbestede activiteit .....	5
1.3. Materiaal .....	5
1.4. Vraag .....	5
1.5. Antwoordformulier.....	6
1.6. Evaluatiecriteria .....	6
<b>2. RESULTATEN.....</b>	<b>7</b>
2.1. Deelname aan de NGS-benchmark trial .....	7
2.2. Overzicht van de methoden.....	7
2.3. Overzicht van de resultaten.....	10
2.4. Overzicht van klinische/biologische interpretaties.....	11
<b>3. BESPREKING VAN DE RESULTATEN, DISCUSSIE EN AANBEVELINGEN .....</b>	<b>12</b>
3.1. Identificatie van de varianten.....	12
3.2. Herhaalbaarheid van de resultaten .....	12
3.3. Standaardisatie van klinische rapporten en klinische/biologische interpretatie .....	12
<b>4. BIJLAGE .....</b>	<b>13</b>
4.1. Klinische/biologische interpretaties .....	13
4.1.1. NGS-2018-001.....	13
4.1.2. NGS-2018-002.....	14
4.1.3. NGS-2018-003.....	15
4.2. Punt diagram .....	16
4.3. Interpretatie van het individueel rapport .....	16

## 1. INLEIDING

In januari 2016 is het Kankercentrum 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 benchmark trial voor de detectie van de zogenaamde "actionable" mutaties in de genen BRCA1 en BRCA2 met doelgerichte NGS.

Alle informatie over het NGS-proefproject is te vinden in het NGS Roadbook:

<http://www.e-cancer.be/publications/Documents/Roadbook%20PersMed%20NGS%20NL.pdf>

### 1.1. Doel van de NGS-benchmark trial voor de genen BRCA1 en BRCA2

Het doel van deze benchmark trial is om een inventaris op te maken van de manier waarop de testen door de deelnemende laboratoria worden gerealiseerd. Deze studie richt zich uitsluitend op de kwaliteit van de analyses voor detectie van somatische mutaties in de genen BRCA1 en BRCA2 in oncologie.

### 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 (NGS-2018-001, 002 en 003) met genomisch DNA afkomstig van goed gekarakteriseerde gemengde cellijnen.

De mutatieprofielen van deze 3 stalen werden "à façon" gekozen omwille van de volgende functies, voor de genen vereist door RIZIV overeenkomst voor NGS (bekrachtigd op 19/03/2018: [https://www.riziv.fgov.be/SiteCollectionDocuments/overeenkomst\\_next\\_generation\\_sequencing.pdf](https://www.riziv.fgov.be/SiteCollectionDocuments/overeenkomst_next_generation_sequencing.pdf)):

- soorten varianten: substituties, inserties, deleties
- allelfrequentie van de variant
- aantal varianten

Horizon staat garant voor de homogeniteit en de stabiliteit van de stalen (standaarden ISO9001 en ISO13485).

### 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.

Elk deelnemend laboratorium moest elk staal drie keer analyseren (*triplicates* van elk staal). Replicaten van elk staal moesten in dezelfde analysestroom plaatsvinden. Bij de opbouw van libraries 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 de varianten geïdentificeerd in de genen BRCA1 en BRCA2 moesten door de laboratoria worden gerapporteerd.

## 1.5. Antwoordformulier

Voor de 9 uitgevoerde sequencing-analyses (*triplicates* van 3 stalen) vroegen we om alle ruwe data (fastq-, bam-, bai- en vcf-bestanden) door te sturen. De resultaten en de technische gegevens over de gebruikte methode en de bio-informatica analyse werden door de laboratoria ingevoerd op de volgende beveiligde website: <https://gml.wiv-isp.be/NGS/>. We hebben ook gevraagd om een klinisch rapport voor elk staal (3 in totaal) door te sturen.

## 1.6. Evaluatiecriteria

De evaluatiecriteria zijn gebaseerd op de consensus van de laboratoria met een drempelwaarde van 2/3 van de deelnemers.

In detail zijn de evaluatiecriteria:

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

2/ De afwezigheid van de varianten zoals gerapporteerd door minder dan 1/3 van de deelnemers, voor de 3 stalen: **consensus voor de niet-gerapporteerde varianten**.

**Opmerkingen:** De varianten gerapporteerd door 1/3 tot 2/3 van de laboratoria worden ook gedetailleerd beschreven in dit rapport en alleen ter informatie weergegeven: **geen consensus**.

Al deze varianten zijn door Horizon gevalideerd met NGS voor de pure cellijnen, en met ddPCR voor de gemengde cellijnen (cfr. punt 2.3., tabel 15).

## 2. RESULTATEN

### 2.1. Deelname aan de NGS-benchmark trial

12 Belgische laboratoria hebben zich ingeschreven voor de benchmark trial voor de genen BRCA1 en BRCA2. Alle Belgische medische laboratoria die de detectie van somatische mutaties met NGS-technologie uitvoeren en die voor deze techniek een ISO 15189-accreditatie hebben of waarvan de accreditatieprocedure lopende is op het moment van de verzending van de stalen, mochten deelnemen. De laboratoria met een lopende accreditatieprocedure moesten het validatiedossier of het validatieplan voorleggen bij inschrijving.

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

Regio	N	Laboratorium	N
Vlaams Gewest	6	Pathologische anatomie	2
Brussels Hoofdstedelijk Gewest	3	Klinische biologie	4
Waals Gewest	3	Humane genetica	6
Totaal	12	Totaal	12

Laboratorium	N
Geaccrediteerd	7
Accreditatie lopend op het moment van inschrijving	5
Totaal	12

### 2.2. Overzicht van de methoden

**Tabel 2: Referentiegenoom gebruikt voor de analyse**

Referentiegenoom	N
GRCh37/hg19	12

**Tabel 3: Platforms gebruikt voor NGS analyses**

Merk	N	Platform	N
Illumina	11	MiSeq	10
		NextSeq	1
Qiagen	1	GeneReader	1

**Tabel 4: Referenties *flow cells* of gebruikte chips**

Chip/ <i>flow cell</i>	N
MiSeq v3	5
MiSeq v2	3
MiSeq micro v2	1
MiSeq	1
NextSeq	1
Qiagen	1

**Tabel 5: single/paired-end analyses**

Single/paired-end	N
Single end	1
Paired-end	11

**Tabel 6: Lengte van de reads**

Lengte (bp)	N
150	3
200	2
250	3
300	1
350	1
123-230	2

**Tabel 7: Referentie van de gebruikte genpanelen**

Gebruikte genpanelen	N
AmpliSeq for Illumina BRCA panel	2
BRCA MASTR Plus Dx (Multiplicom-Agilent)	8
NimbleGen SeqCap EZ Choice custom panel, Roche	1
GeneRead QIAact BRCA1 /2 panel, Qiagen	1

**Tabel 8: Commerciële software en "in-house" pipelines (gebruikte tools)**

Commerciële software/"in-houses" pipelines	N
SeqNext (JSI)	7
Sophia DDM	2
Software Qiagen	1
DNA amplicon plugin (Illumina-basespace)	1
CLC Bio + in house scripts	1

**Tableau 9: gebruikte aanrijingsstrategieën**

gebruikte aanrijingsstrategieën	N
Amplicon-based	11
Hybridisation-based	1

**Tabel 10: categorieën van somatische varianten gedetecteerd door de NGS-analysemethoden voor de genen BRCA1 en BRCA2**

Categorieën van somatische varianten	N
SNV	12
Indels	12
CNV	1
Translocaties	1



**Tabel 11: Detectielimieten voor elke gedetecteerde variantcategorie**

Detectielimiet voor SNV: allelfrequentie (%)	Detectielimiet voor SNV: sequentiebepalingsdiepte (X)	N
4	500	1
4	1000	1
5	200-500	1
5	300	4
5	1000	2
10	100	1
10	300	1
10	500	1
Detectielimiet voor indels: allelfrequentie (%)	Detectielimiet voor indels: sequentiebepalingsdiepte (X)	N
4	500	1
4	1000	1
5	200-500	1
5	300	4
5	1000	2
10	100	2
10	500	1
Detectielimiet voor CNV: allelfrequentie (%)	Detectielimiet voor CNV: sequentiebepalingsdiepte (X)	N
5	300	1
Detectielimiet voor translocaties: allelfrequentie (%)	Detectielimiet voor translocaties sequentiebepalingsdiepte (X)	N
5	300	1

**Tabel 12: Voor de opsporing van somatische varianten in de genen BRCA1 en BRCA2, sequencet u dan een normaal staal van dezelfde patiënt, parallel met het tumorstaal?**

Sequencing normaal staal	N
Ja (Bloed)	2
Nee	10

**Tabel 13: Staaltypes gesequencet door laboratoria voor de detectie van somatische varianten in de genen BRCA1 en BRCA2**

Staaltype	N
Bloed	2
Vriesmateriaal	1
Paraffineweefsel	11
Andere: cytologie	1

**Tabel 14: Minimale hoeveelheden genomisch DNA die in uw laboratorium vereist zijn voor het uitvoeren van een NGS-analyse voor de genen BRCA1 en BRCA2**

Minimale hoeveelheid genomisch DNA	N
≤10ng	2
11 - 50ng	2
51-100ng	3
550ng	1
Niet gespecificeerd	4

### 2.3. Overzicht van de resultaten

Tabel 15: varianten gevalideerd door Horizon

Staal	Gen	Referentie cDNA	Eiwitreferentie	Verwachte allelfrequentie
NGS-2018-001	BRCA1	c.4327C>T NM_007294.3	p.(Arg1443*) NP_009225.1	10
	BRCA2	c.5351del NM_000059.3	p.(Asn1784Thrfs*7) NP_000050.2	10
		c.5073del NM_000059.3	p.(Lys1691Asnfs*15) NP_000050.2	10
		c.4258G>T NM_000059.3	p.(Asp1420Tyr) NP_000050.2	10
		c.7397T>C NM_000059.3	p.(Val2466Ala) NP_000050.2	20
NGS-2018-002	BRCA1	c.1303G>T NM_007294.3	p.(Asp435Tyr) NP_009225.1	20
		c.2458A>G NM_007294.3	p.(Lys820Glu) NP_009225.1	20
		c.2612C>T NM_007294.3	p.(Pro871Leu) NP_009225.1	40
		c.3548A>G NM_007294.3	p.(Lys1183Arg) NP_009225.1	20
		c.4837A>G NM_007294.3	p.(Ser1613Gly) NP_009225.1	20
	BRCA2	c.5351del NM_000059.3	p.(Asn1784Thrfs*7) NP_000050.2	20
		c.865A>C NM_000059.3	p.(Asn289His) NP_000050.2	20
		c.2971A>G NM_000059.3	p.(Asn991Asp) NP_000050.2	20
		c.7397T>C NM_000059.3	p.(Val2466Ala) NP_000050.2	20
		NGS-2018-003	BRCA1	c.1303G>T NM_007294.3
c.2458A>G NM_007294.3	p.(Lys820Glu) NP_009225.1			25
c.2612C>T NM_007294.3	p.(Pro871Leu) NP_009225.1			50
c.3548A>G NM_007294.3	p.(Lys1183Arg) NP_009225.1			25
c.4837A>G NM_007294.3	p.(Ser1613Gly) NP_009225.1			25
BRCA2	c.5351del NM_000059.3		p.(Asn1784Thrfs*7) NP_000050.2	25
	c.8021dup NM_000059.3		p.(Ile2675Aspfs*6) NP_000050.2	25
	c.865A>C NM_000059.3		p.(Asn289His) NP_000050.2	25
	c.2971A>G NM_000059.3		p.(Asn991Asp) NP_000050.2	25
	c.7397T>C NM_000059.3		p.(Val2466Ala) NP_000050.2	100

■ consensus voor de gerapporteerde varianten, □ consensus voor de niet-gerapporteerde varianten, ■ geen consensus.

8 laboratoria gebruiken het BRCA MASTR Plus Dx Multiplicom-Agilent-panel. Onze multivariate variantie-analyse (=Manova, Multivariate Anova) laat zien dat allelfrequentiewaarden voor deze groep van laboratoria te verschillend zijn van de waarden gerapporteerd door deelnemers met een andere methode om alle benchmarkdeelnemers als één groep te beschouwen. Als we de 12 laboratoria als één groep beschouwen, zouden de verschillen die we vinden tussen de allelfrequentiewaarden tot een significant risico op foutief vlaggen voor Z-scores hebben geleid. De mediaan-allelfrequenties, de standaarddeviaties en de Z-scores in de tabel hieronder werden alleen berekend op basis van laboratoriumresultaten die bekomen werden met de BRCA MASTR Plus Dx Multiplicom-Agilent methode. Deze gegevens worden ter informatie verstrekt.

Tabel 16: resultaten van de laboratoria

Staal	Gen	Referentie cDNA	Eiwitreferentie	Methode	M_AF	SD	Nm	citZ	Ng
NGS-2018-001	BRCA1	c.4327C>T NM_007294.3	p.(Arg1443*) NP_009225.1	MASTR Plus	11	0.22	8/8	1/8	12/12
				AmpliSeq			2/2		
				NimbleGen SeqCap			1/1		
				GeneRead			1/1		
	BRCA2	c.5351del NM_000059.3	p.(Asn1784Thrfs*7) NP_000050.2	MASTR Plus	12	0.13	7/8	1/7	11/12
				AmpliSeq			2/2		
				NimbleGen SeqCap			1/1		
				GeneRead			1/1		
	BRCA2	c.5073del NM_000059.3	p.(Lys1691Asnfs*15) NP_000050.2	MASTR Plus	13	0.23	7/8	1/7	11/12
				AmpliSeq			2/2		
				NimbleGen SeqCap			1/1		
				GeneRead			1/1		
NGS-2018-002	BRCA1	c.1303G>T NM_007294.3	p.(Asp435Tyr) NP_009225.1	MASTR Plus			3/8		5/12
				AmpliSeq			1/2		
				NimbleGen SeqCap			0/1		
				GeneRead			1/1		
	BRCA2	c.5351del NM_000059.3	p.(Asn1784Thrfs*7) NP_000050.2	MASTR Plus	20.7	0.43	7/8	1/7	11/12
				AmpliSeq			2/2		
				NimbleGen SeqCap			1/1		
				GeneRead			1/1		
NGS-2018-003	BRCA1	c.1303G>T NM_007294.3	p.(Asp435Tyr) NP_009225.1	MASTR Plus			3/8		5/12
				AmpliSeq			1/2		
				NimbleGen SeqCap			0/1		
				GeneRead			1/1		
	BRCA2	c.5351del NM_000059.3	p.(Asn1784Thrfs*7) NP_000050.2	MASTR Plus	25.6	0.61	7/8	0/7	11/12
				AmpliSeq			2/2		
				NimbleGen SeqCap			1/1		
				GeneRead			1/1		
	BRCA2	c.8021dup NM_000059.3	p.(Ile2675Aspfs*6) NP_000050.2	MASTR Plus	24	0.68	7/8	1/7	11/12
				AmpliSeq			2/2		
				NimbleGen SeqCap			1/1		
				GeneRead			1/1		

■ consensus voor de gerapporteerde varianten, □ geen consensus.

Methoden : MASTR Plus (BRCA MASTR Plus Dx Multiplicom-Agilent), AmpliSeq (AmpliSeq for Illumina BRCA panel), NimbleGen SeqCap (NimbleGen SeqCap EZ Choice custom panel, Roche), GeneRead (GeneRead QIAact BRCA1 /2 panel, Qiagen), M\_AF: Mediaan van de allelfrequenties op basis van laboratoriumresultaten bekomen met de methode BRCA MASTR Plus Dx Multiplicom-Agilent, SD: standaarddeviatie, Nm: Per methode, aantal laboratoria dat de mutatie identificeerde, citZ : Aantal Z-citaties, Ng: Aantal laboratoria dat de mutatie identificeerde (alle methoden).

**11 laboratoria van de 12 deelnemers konden de 6 varianten van de consensus voor de gerapporteerde varianten identificeren. 1 laboratorium identificeerde slechts één variant van de 6 varianten van de consensus voor de gerapporteerde varianten. Geen enkel laboratorium heeft één van de 16 varianten van de consensus voor de niet-gerapporteerde varianten gerapporteerd.**

**De statistische interpretatie wordt in detail besproken in het hoofdstuk over de interpretatie van het individueel rapport (pagina 16-17).**

Tabel 17: Slaagpercentage van de deelnemers gebaseerd op de consensus voor de gerapporteerde varianten

Slaagpercentage	N
6/6 (100%)	11
1/6 (17%)	1

Gemiddeld slaagpercentage: 93% (67/72)

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

De klinische/biologische interpretaties zijn opgenomen in de bijlage van dit rapport (pagina's 13 tot 15). Deze gegevens werden uit de website <https://gml.wiv-isp.be/NGS20181/> gehaald voor één triplicate en kunnen gefragmenteerd zijn ten opzichte van 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. Identificatie van de varianten

Eén laboratorium heeft de varianten BRCA2 p.(Asn1784Thrfs\*7) en BRCA2 p.(Lys1691Asnfs\*15) in het staal NGS-2018-001 niet gerapporteerd, in het staal NGS-2018-002, de variant BRCA2 p.(Asn1784Thrfs\*7) en in het staal NGS-2018-003, de varianten BRCA2 p.(Asn1784Thrfs\*7) en BRCA2 p.(Ile2675Aspfs\*6). De mediane allelfrequenties van alle niet-gerapporteerde varianten zijn groter dan de detectielimiet van het betreffende laboratorium. We konden echter de aanwezigheid van deze varianten in hun ruwe data vaststellen, namelijk alle BRCA2-varianten die door ten minste 2/3 van de deelnemers werden gerapporteerd.

5 laboratoria van de 12 deelnemers rapporteerden de BRCA1 p-variant (Asp435Tyr) in de stalen NGS-2018-002 en NGS-2018-003. We konden de aanwezigheid van deze variant in de ruwe data van alle deelnemers voor de 2 betreffende stalen vaststellen. Tijdens de biologische en/of klinische interpretatie van de variant, hebben de laboratoria deze variant in de categorie VUS (Variant of Unknown Significance) ondergebracht. We vermoeden dat de andere laboratoria deze categorie van varianten in hun klinische rapporten niet rapporteren.

Geen enkel laboratorium heeft één van de 16 varianten van de consensus voor de niet-gerapporteerde varianten gerapporteerd. Daarom is er geen onverwacht resultaat voor de consensus voor de niet-gerapporteerde varianten. De meeste ruwe data werden geanalyseerd en de aanwezigheid van deze varianten werd in de gegevens van deze deelnemers bevestigd. Deze varianten worden dus van het klinische rapport uitgesloten door aanvullende filters en criteria.

#### 3.2. Herhaalbaarheid van de resultaten

1 laboratorium had herhaalbaarheidsproblemen bij de detectie van 2 varianten voor het staal NGS-2018-1.

Tabel 18: Herhaalbaarheidsproblemen voor 1 laboratorium

Laboratorium	Varianten met herhaalbaarheidsprobleem	Aantal herhalingen waar de variant kon worden geïdentificeerd
Laboratorium 1	p.(Asn1784Thrfs*7), staal NGS-2018-001	2/3
	p.(Lys1691Asnfs*15), staal NGS-2018-001	2/3

#### 3.3. 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 geeft een antwoord op het verzoek van de experts m.b.t. de diversiteit van de antwoorden die werd vastgesteld tijdens eerdere benchmarking trials in 2017. Deze expertengroep werkt in het bijzonder aan standaardisatie van:

- 1) de annotatie van varianten
- 2) gebruikte referenties voor de geteste regio's
- 3) de biologische classificatie van de varianten
- 4) de klinische classificatie van de varianten
- 5) 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. Publicatie : *HGVS recommendations for the description of sequence variants - 2016 update*, Den Dunnen et al. 2016, *Hum.Mutat.* 37:564-569.

Website : <http://varnomen.hgvs.org/>

## 4. BIJLAGE

### 4.1. Klinische/biologische interpretaties

#### 4.1.1. NGS-2018-001

ID	BRCA1 p.(Arg1443*)	BRCA2 p.(Asn1784Thrfs*7)	BRCA2 p.(Lys1691Asnfs*15)
Lab1	Pathogeen	pathogeen	pathogeen
Lab2	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic
Lab3	Pathogeen. Er werd in exon 12 van het BRCA1 gen een mutatie met beschreven pathogeen potentieel gedetecteerd (c.4327C>T) voor borstkanker. Dit door vroegtijdige truncatie van het BRCA1 eiwit.	Pathogeen. De mutatie c.5351delA in exon 11 van het BRCA2 gen leidt tot een vroegtijdige truncatie van het BRCA2 eiwit. Deze mutatie is beschreven in ClinVar als pathogeen.	Pathogeen. De mutatie c.5073delA in exon 11 van het BRCA2 gen leidt tot een vroegtijdige truncatie van het BRCA2 eiwit. Deze mutatie is beschreven in ClinVar als pathogeen.
Lab4	class 5: pathogenic nonsense mutation	class 5: pathogenic frameshift mutation leading to a premature stop codon	Class 5: pathogenic frameshift mutation leading to a premature stop codon
Lab5	pathogeen, klasse 5	<b>Niet gerapporteerd</b>	<b>Niet gerapporteerd</b>
Lab6	pathogénique	pathogénique	pathogénique
Lab7	pathogénique	pathogénique	pathogénique
Lab8	<p>PRESENCE d'au moins une mutation (classe V) dans le gène BRCA1.</p> <p>La présence d'une mutation BRCA1 ou BRCA2 est associée à une sensibilité aux inhibiteurs de PARP (augmentation de la Progression Free Survival) pour les cancers séreux de haut grade de l'ovaire, en rechute, sensibles aux platines (cfr entre autres Ledermann J et al, Lancet Oncol 2014 ; Tewari K S and Monk BJ, Clin Cancer Res 2015).</p>	<p>PRESENCE d'au moins une mutation (classe V) dans le gène BRCA2.</p> <p>La présence d'une mutation BRCA1 ou BRCA2 est associée à une sensibilité aux inhibiteurs de PARP (augmentation de la Progression Free Survival) pour les cancers séreux de haut grade de l'ovaire, en rechute, sensibles aux platines (cfr entre autres Ledermann J et al, Lancet Oncol 2014 ; Tewari K S and Monk BJ, Clin Cancer Res 2015).</p>	<p>PRESENCE d'au moins une mutation (classe V) dans le gène BRCA2.</p> <p>La présence d'une mutation BRCA1 ou BRCA2 est associée à une sensibilité aux inhibiteurs de PARP (augmentation de la Progression Free Survival) pour les cancers séreux de haut grade de l'ovaire, en rechute, sensibles aux platines (cfr entre autres Ledermann J et al, Lancet Oncol 2014 ; Tewari K S and Monk BJ, Clin Cancer Res 2015).</p>
Lab9	pathogeen	pathogeen	pathogeen
Lab10	This variant is located in exon 12 of BRCA1 gene, at codon 1443. Substitution of cytosine with thymine at position 4327 of the coding sequence induces the appearance of a premature stop codon (CGA>TGA). This variant is reported in ClinVar (ID 17675) by multiple submitters and is widely described in the literature as a pathogenic (class 5) variant of the BRCA1 gene.	This variant is located in exon 11 of BRCA2 gene, at codon 1784. Deletion of adenine at position 5351 of the coding sequence induces a frameshift and the appearance of a premature stop codon at position 7 of the new reading frame. This variant is reported in ClinVar (ID 37961) by seven submitters and is considered as a pathogenic (class 5) variant of the BRCA2 gene.	This variant is located in exon 11 of BRCA2 gene, at codon 1691. Deletion of adenine at position 5073 of the coding sequence induces a frameshift and the appearance of a premature stop codon at position 15 of the new reading frame. This variant is reported in ClinVar (ID 51762) by five submitters and is considered as a pathogenic (class 5) variant of the BRCA2 gene.
Lab11	Pathogeen (cat 5)	Pathogeen (cat 5)	Pathogeen (cat 5)
Lab12	pathogénique	pathogénique	pathogénique

4.1.2. NGS-2018-002

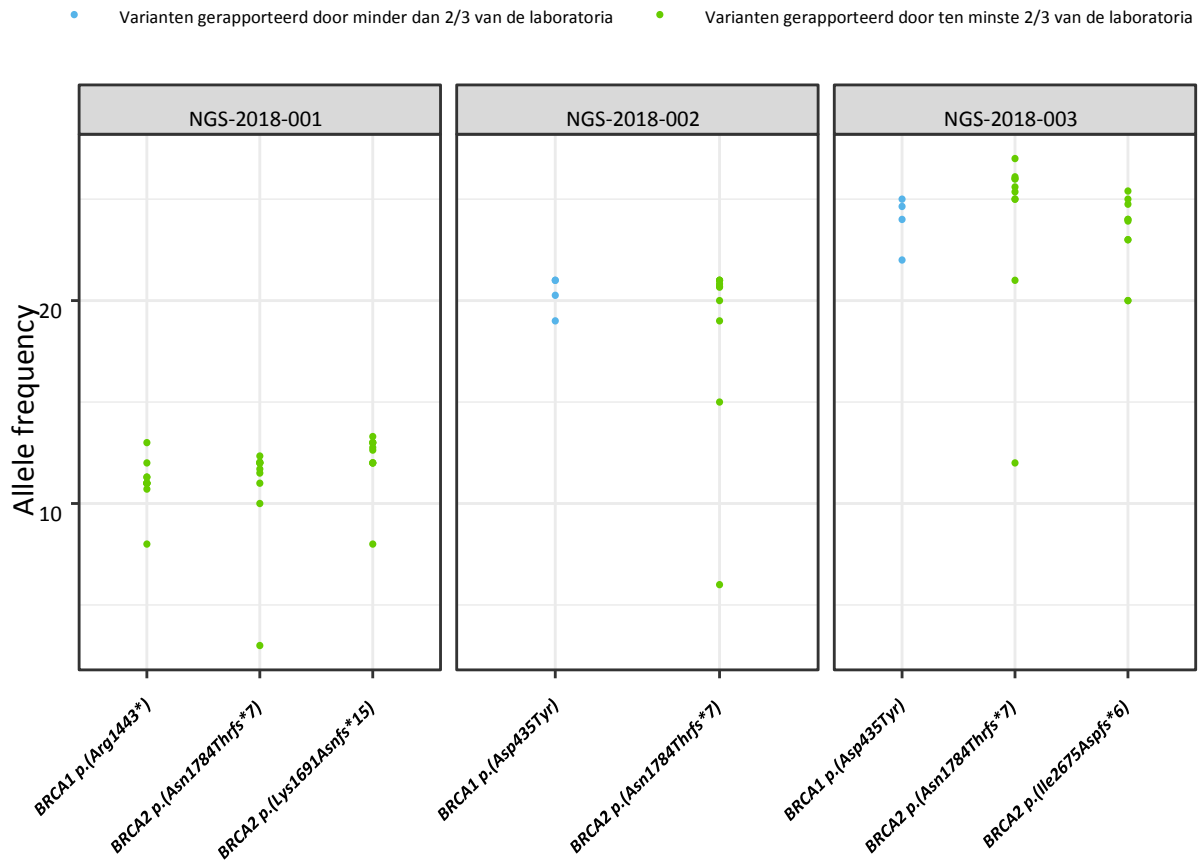
ID	BRCA1 p.(Asp435Tyr)	BRCA2 p.(Asn1784Thrfs*7)
Lab1	<i>Niet gerapporteerd</i>	pathogeen
Lab2	<i>Niet gerapporteerd</i>	Pathogenic
Lab3	VUS. In het BRCA1 gen werd een mutatie (c.1303G>T) gedetecteerd met nog onduidelijk potentieel (VUS).	Pathogeen. De mutatie c.5351delA in exon 11 van het BRCA2 gen leidt tot een vroegtijdige truncatie van het BRCA2 eiwit. Deze mutatie is beschreven in ClinVar als pathogeen.
Lab4	Class 3 : variant of unknown clinical significance  This variant lies within the Rad50-binding region of the Brca1 protein (PMID: 22737296). It has been previously reported in the literature (e.g. PMID: 28857155), but its effect on BRCA1 protein function is currently unknown.	class 5: pathogenic frameshift mutation leading to a premature stop codon
Lab5	VUS, klasse 3	<i>Niet gerapporteerd</i>
Lab6	<i>Niet gerapporteerd</i>	pathogénique
Lab7	Variant de signification inconnue	pathogénique
Lab8	<i>Niet gerapporteerd</i>	PRESENCE d'au moins une mutation (classe V) dans le gène BRCA2.  La présence d'une mutation BRCA1 ou BRCA2 est associée à une sensibilité aux inhibiteurs de PARP (augmentation de la Progression Free Survival) pour les cancers séreux de haut grade de l'ovaire, en rechute, sensibles aux platines (cfr entre autres Ledermann J et al, Lancet Oncol 2014 ; Tewari K S and Monk BJ, Clin Cancer Res 2015).
Lab9	<i>Niet gerapporteerd</i>	pathogeen
Lab10	This variant is located in exon 10 of BRCA1 gene, at codon 435. Substitution of guanine with thymine at position 1303 of the coding sequence induces the change of aspartic acid with tyrosine at codon 435. From a biochemical point of view this variant is a non-conservative change of a moderately conserved residue. This variant is not observed in population database (gnomAD: no frequency) and, to our knowledge, it has not been reported nor described in clinical database and in the literature. Based on current evidence, it is not clear whether BRCA1 p.(Asp435Tyr) is pathogenic or benign. We consider this variant as a variant of uncertain significance (class 3).	This variant is located in exon 11 of BRCA2 gene, at codon 1784. Deletion of adenine at position 5351 of the coding sequence induces a frameshift and the appearance of a premature stop codon at position 7 of the new reading frame. This variant is reported in ClinVar (ID 37961) by seven submitters and is considered as a pathogenic (class 5) variant of the BRCA2 gene.
Lab11	<i>Niet gerapporteerd</i>	Pathogeen (cat 5)
Lab12	<i>Niet gerapporteerd</i>	pathogénique

4.1.3. NGS-2018-003

ID	BRCA1 p.(Asp435Tyr)	BRCA2 p.(Asn1784Thrfs*7)	BRCA2 p.(Ile2675Aspfs*6)
Lab1	<i>Niet gerapporteerd</i>	pathogeen	pathogeen
Lab2	<i>Niet gerapporteerd</i>	Pathogenic	Pathogenic
Lab3	VUS. In het BRCA1 gen werd een mutatie (c.1303G>T) gedetecteerd met nog onduidelijk potentieel (VUS).	Pathogeen. De mutatie c.5351delA in exon 11 van het BRCA2 gen leidt tot een vroegtijdige truncatie van het BRCA2 eiwit. Deze mutatie is beschreven in ClinVar als pathogeen.	Pathogeen. Er werd een andere mutatie met pathogeen potentieel gedetecteerd in exon 18, i.e. c.8021dupA. Deze mutatie leidt tot een vroegtijdige truncatie van het BRCA2 eiwit. In ClinVar wordt deze mutatie als pathogeen beschreven.
Lab4	Class 3 : variant of unknown clinical significance  This variant lies within the Rad50-binding region of the Brca1 protein (PMID: 22737296). It has been previously reported in the literature (e.g. PMID: 28857155), but its effect on BRCA1 protein function is currently unknown.	Class 5: pathogenic frameshift mutation	Class 5: pathogenic frameshift mutation
Lab5	VUS, klasse 3	<i>Niet gerapporteerd</i>	<i>Niet gerapporteerd</i>
Lab6	<i>Niet gerapporteerd</i>	pathogénique	pathogénique
Lab7	variant de signification inconnue	pathogénique	pathogénique
Lab8	<i>Niet gerapporteerd</i>	PRESENCE d'au moins une mutation (classe V) dans le gène BRCA2.  La présence d'une mutation BRCA1 ou BRCA2 est associée à une sensibilité aux inhibiteurs de PARP (augmentation de la Progression Free Survival) pour les cancers séreux de haut grade de l'ovaire, en rechute, sensibles aux platines (cfr entre autres Ledermann J et al, Lancet Oncol 2014 ; Tewari K S and Monk BJ, Clin Cancer Res 2015).	PRESENCE d'au moins une mutation (classe V) dans le gène BRCA2.  La présence d'une mutation BRCA1 ou BRCA2 est associée à une sensibilité aux inhibiteurs de PARP (augmentation de la Progression Free Survival) pour les cancers séreux de haut grade de l'ovaire, en rechute, sensibles aux platines (cfr entre autres Ledermann J et al, Lancet Oncol 2014 ; Tewari K S and Monk BJ, Clin Cancer Res 2015).
Lab9	<i>Niet gerapporteerd</i>	pathogeen	pathogeen
Lab10	This variant is located in exon 10 of BRCA1 gene, at codon 435. Substitution of guanine with thymine at position 1303 of the coding sequence induces the change of aspartic acid with tyrosine at codon 435. From a biochemical point of view this variant is a non-conservative change of a moderately conserved residue. This variant is not observed in population database (gnomAD: no frequency) and, to our knowledge, it has not been reported nor described in clinical database and in the literature. Based on current evidence, it is not clear whether BRCA1 p.(Asp435Tyr) is pathogenic or benign. We consider this variant as a variant of uncertain significance (class 3).	This variant is located in exon 11 of BRCA2 gene, at codon 1784. Deletion of adenine at position 5351 of the coding sequence induces a frameshift and the appearance of a premature stop codon at position 7 of the new reading frame. This variant is reported in ClinVar (ID 37961) by seven submitters and is considered as a pathogenic (class 5) variant of the BRCA2 gene.	This variant is located in exon 18 of BRCA2 gene, at codon 2675. Duplication of adenine at position 8021 of the coding sequence induces a frameshift and the appearance of a premature stop codon at position 6 of the new reading frame. This variant is reported in ClinVar (ID 267050) by four submitters and is considered as a pathogenic (class 5) variant of the BRCA2 gene.
Lab11	<i>Niet gerapporteerd</i>	Pathogeen (cat 5)	Pathogeen (cat 5)

## 4.2. Punt diagram

Allelfrequenties gerapporteerd voor elke variant.



## 4.3. Interpretatie van het individueel rapport

Naast dit globale rapport kreeg u ook een individueel rapport. Hieronder vindt u informatie die kan helpen bij de interpretatie van dit rapport. De positie van de kwantitatieve resultaten wordt gegeven voor alle deelnemers. Voor de laboratoria die de BRCA MASTR Plus Dx Multiplicom-Agilent-methode gebruikten wordt ook een vergelijking gegeven met de resultaten van de deelnemers die deze methode gebruikten.

De volgende gegevens worden vermeld:

- Uw resultaat (MRAF)

Enkel voor de laboratoria die de BRCA MASTR Plus Dx Multiplicom-Agilent-methode gebruikten:

- De mediaan (MAF):  
de middenwaarde van de resultaten.
- De algemene standaarddeviatie (SD):  
de maatstaf van spreiding van de resultaten.
- De Z-score:  
het verschil tussen uw resultaat en de mediaan (uitgedrukt in standaarddeviatie-eenheden):  
 **$Z = (MRAF - MAF) / SD$**   
Uw resultaat wordt genoemd als  **$|Z| > 3$** .  
Deze parameters geven u een ruwe indicatie van de positie van uw resultaat (MRAF) ten opzichte van de mediaan (MAF).



## Grafische weergave

Naast de resultaattabellen wordt soms een grafische weergave in een punt diagram toegevoegd. Het geeft de positie weer van uw kwantitatieve resultaten ten opzichte van alle deelnemers. Voor de laboratoria die de BRCA MASTR Plus Dx Multiplicom-Agilent-methode gebruikten wordt ook een vergelijking gegeven met de resultaten van de deelnemers die deze methode gebruikten.

Voor de laboratoria die de BRCA MASTR Plus Dx Multiplicom-Agilent-methode gebruikten:

- een benedenlijn geeft de kleinste waarde weer  $x > P_{25} - 1.5 * (P_{75} - P_{25})$
- een bovenlijn geeft de grootste waarde weer  $x > P_{75} - 1.5 * (P_{75} - P_{25})$

---

**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.