

**EXPERTISE EN DIENSTVERLENING
KWALITEIT VAN LABORATORIA**

***AD HOC* EXPERTENCOMITE**

BENCHMARKING TRIAL

GLIBAAL RAPPORT
Next Generation Sequencing (NGS)

Vaste tumoren

2020/1

Sciensano/NGS benchmarking trial/6-NL

Expertise en dienstverlening
Kwaliteit van laboratoria
J. Wytsmanstraat, 14
1050 Brussel | België

www.sciensano.be

AD HOC EXPERTENCOMITE

| Sciensano | | | | | |
|-----------------------|---------------------------------|---------|--|------|--------------|
| Secretariaat | | TEL: | 02/642.55.22 | FAX: | 02/642.56.45 |
| Aline Antoniou | Enquêtecoördinator | TEL: | 02/642.55.27 | | |
| | | e-mail: | Aline.Antoniou@sciensano.be | | |
| Vanessa Ghislain | Vervanger enquêtecoördinator | TEL: | 02/642.52.08 | | |
| | | e-mail: | Vanessa.Ghislain@sciensano.be | | |
| Experten | Instelling | | | | |
| Elke Boone | AZ Delta Hospital Roeselare | | | | |
| Guy Froyen | Jessa Hospital Hasselt | | | | |
| Koen Jacobs | AZ-St-Lucas Hospital Ghent | | | | |
| Suzan Lambin | UZ Antwerp | | | | |
| Marie Le Mercier | UZ Antwerp | | | | |
| Friedel Nollet | AZ Sint-Jan Brugge | | | | |
| Karl Vandepoele | UZ Ghent | | | | |
| Sara Vander Borght | UZ Leuven | | | | |
| Joni Van Der Meulen | UZ Ghent | | | | |
| Thomas Delcourt | Sciensano | | | | |
| Aline Hébrant | Sciensano | | | | |
| Mohamed Rida Soumali | Sciensano | | | | |
| Marc Van Den Bulcke | Sciensano | | | | |
| Philippe Van de Walle | Sciensano | | | | |
| Els Van Valckenborgh | Sciensano | | | | |

Een voorlopige versie van dit rapport werd voorgelegd aan de experts op: 27/05/2020, 11/06/2020 en 22/06/2020.

Verantwoordelijkheden:

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

Autorisatie verspreiding rapport: Door Aline Antoniou, enquêtecoördinator van de NGS-benchmark trial, op 14/07/2020.

Alle rapporten zijn tevens te raadplegen op onze website:
https://www.wiv-isp.be/QML/activities/NGS/_nl/rapports_annee.htm

INHOUDSTAFEL

| | |
|--|-----------|
| 1. INLEIDING | 5 |
| 1.1. DOEL VAN DE NGS-BENCHMARK TRIAL – VASTE TUMOREN | 5 |
| 1.2. UITBESTEDE ACTIVITEIT | 5 |
| 1.3. MATERIAAL..... | 5 |
| 1.4. VRAAG..... | 5 |
| 1.5. EVALUATIECRITERIA..... | 6 |
| 2. RESULTATEN | 7 |
| 2.1. DEELNAME AAN DE NGS BENCHMARKING TRIAL..... | 7 |
| 2.2. OVERZICHT VAN DE METHODEN | 7 |
| 2.3. OVERZICHT VAN DE RESULTATEN..... | 10 |
| 2.3.1. NGS-2020-1 | 10 |
| 2.3.2. NGS-2020-2..... | 12 |
| 2.3.3. NGS-2020-3..... | 14 |
| 2.3.4. Slaagpercentage van de deelnemers | 17 |
| 3. BIJLAGE..... | 18 |
| 3.1. OVERZICHT VAN DE KLINISCHE CONCLUSIES | 18 |
| 3.1.1. NGS-2020-1 | 18 |
| 3.1.2. NGS-2020-2..... | 21 |
| 3.1.3. NGS-2020-3..... | 23 |
| 3.2. INTERPRETATIE VAN HET INDIVIDUEEL RAPPORT | 25 |

1. INLEIDING

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

https://www.compermed.be/sites/compermed.be/files/2018-05/Roadbook_PersMed_NGS_NL_0.pdf

Sinds februari 2018 hebben de ComPerMed en MolecularDiagnostics.be 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 eerder georganiseerde *benchmarking trials* in 2017.

Deze groep werkt in het bijzonder aan de standaardisatie van:

- de nomenclatuur van varianten
- de biologische classificatie van de varianten
- de klinische classificatie van de varianten
- de inhoud van het klinisch rapport

De weerhouden conclusies werden op de Belac website gepubliceerd:

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

Na de analyse van de resultaten van de 'benchmarking trials – case studies' uitgevoerd in 2019 is een herziening van de Belgische richtlijnen voor de interpretatie van de varianten gepland voor 2020.

1.1. Doel van de NGS-benchmark trial – vaste tumoren

Deze benchmarking trial heeft als doel de stand van zaken na te gaan betreffende de wijze waarop somatische varianten in de vaste tumoren worden gedetecteerd, geselecteerd en gerapporteerd in het patiënten rapport.

1.2. Uitbestede activiteit

De tumorstalen werden geleverd door het Jules Bordet instituut, Brussel.

1.3. Materiaal

Het materiaal voor deze studie bestond uit:

- 2 tubes genomisch DNA (Volume: 9µl, Concentratie: ongeveer 50 ng/µl), afkomstig van 2 verschillende stalen met de volgende referentie: NGS-2020-1 en NGS-2020-2.
- 3 FFPE coupes van 4 µm dikte afkomstig van een derde staal (3 consecutieve coupes) met de volgende referentie: NGS-2020-3-nummer van de coupe.

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

1.4. Vraag

De evaluatie is gebaseerd op de sequentie analyse van 3 verschillende tumoren uit de routine. Voor elke klinische casus werd aan de deelnemers een klinische context doorgegeven. Voor elke klinische casus werd er gevraagd om een antwoord te geven, volgens de werkwijzen van het laboratorium, van alle varianten die in het klinisch rapport van de patiënt zouden worden

gerapporteerd, maar enkel voor de regio's die zijn beschreven in de NGS overeenkomst en volgens de ComPerMed workflows:

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

| staal | tumor | genen |
|------------|----------------------------|------------------|
| NGS-2020-1 | Melanoom | BRAF, KIT, NRAS |
| NGS-2020-2 | Colorectaal adenocarcinoom | KRAS, NRAS, BRAF |
| NGS-2020-3 | GIST | KIT, PDGFRA |

Voor het staal NGS-2020-3 moest één van de opgestuurde coupes worden gebruikt om een Hematoxyline-Eosine kleuring uit te voeren en om de tumorinhoud te schatten.

Op de antwoordwebsite: <https://qml.wiv-isp.be/NGS/20201> werd er aan de deelnemers gevraagd:

- De vragenlijst met betrekking tot de analysemethode in te vullen.
- De gevraagd parameters in te voeren voor elke geïdentificeerde en in het klinisch rapport gerapporteerde variant:
 - Naam van het gen en het bijhorend NM nummer (multiple choice)
 - Referentie nomenclatuur van de coderende DNA sequentie volgens HGVSn: <http://varnomen.hgvs.org/>
 - Referentie nomenclatuur van de proteïne sequentie volgens HGVS_p
 - Allelfrequentie
 - Biologische classificatie (multiple choice)
 - Klinische classificatie (multiple choice)
- Voor het staal NGS-2020-3, het percentage neoplastische cellen van het geanalyseerd gebied en de nummers van de ontvangen coupes door te sturen.
- Een algemene conclusie te schrijven voor elke klinische casus in de vorm van een vrije tekst.

1.5. Evaluatiecriteria

In dit rapport worden de resultaten van de deelnemende laboratoria weergegeven. Voor de identificatie van de varianten zijn de evaluatiecriteria gebaseerd op de consensus van de laboratoria met een drempelwaarde van 2/3 van de deelnemers.

In detail zijn de evaluatiecriteria:

1/ De identificatie van alle varianten gerapporteerd door ten minste 2/3 van de deelnemers, in elk van de 3 stalen: consensus voor de te-rapporteren 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 elk van de 3 stalen: consensus voor de niet-te-rapporteren varianten.

Wat betreft de biologische en klinische interpretaties, voor de consensus voor de te-rapporteren varianten, werden de antwoorden van de laboratoria gerangschikt als 'verwacht resultaat' (in groen), 'niet-aanbevolen maar aanvaardbaar' (in oranje) en 'niet-aanvaardbaar' (in rood). Deze categorieën werden door een groep van experts gedefinieerd door de resultaten van de consensus van de laboratoria te vergelijken met de resultaten die werden verkregen met behulp van de Belgische richtlijnen. De inhoud van de algemene conclusies die door de laboratoria werden gerapporteerd, werd gerangschikt op basis van standaardinformatie die door ten minste twee laboratoria werd vermeld.

2. RESULTATEN

2.1. Deelname aan de NGS benchmarking trial

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

Overzicht van de deelnemers

| Regio | N |
|--------------------------------|----|
| Vlaams Gewest | 12 |
| Brussels Hoofdstedelijk Gewest | 4 |
| Waals Gewest | 3 |
| Totaal | 19 |

| Laboratorium | N |
|------------------------|----|
| Pathologische anatomie | 9 |
| Klinische biologie | 7 |
| Humane genetica | 3 |
| Totaal | 19 |

2.2. Overzicht van de methoden

Q1. Referentiegenoom gebruikt voor de analyse

| Antwoorden | N |
|-------------|----|
| hg19/GRCh37 | 18 |
| hg38/GRCh38 | 1 |

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

| Antwoorden | N |
|--|----|
| Illumina - MiSeq | 11 |
| Illumina - NextSeq 550 | 2 |
| Illumina - NovaSeq 6000 | 2 |
| Qiagen - GeneReader | 1 |
| ThermoFisher/Ion Torrent - Ion GeneStudio S5 | 1 |
| ThermoFisher/Ion Torrent - Ion S5 | 1 |
| ThermoFisher/Ion Torrent - Ion PGM | 1 |

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

| Antwoorden | N |
|---|---|
| Archer FusionPlex CTL panel (Illumina) | 1 |
| Truseq Amplicon Cancer panel (Illumina) | 1 |
| TruSight Oncology 500 (Illumina) | 1 |
| Focus Ampliseq panel (Illumina) | 1 |
| Colon and Lung panel, Oncomine Solid Tumor (ThermoFisher) | 1 |
| Oncomine focus assay (ThermoFisher) | 1 |
| GeneRead QIAact AIT DNA UMI panel (Qiagen) | 1 |
| SureMASTR Tumor Hotspot (Agilent) | 2 |
| Custom panel (SeqCap, Roche) | 5 |
| Custom panel (QIASeq, Qiagen) | 4 |
| Custom Ampliseq panel (Illumina) | 2 |
| Custom panel CP-Alphav3 | 1 |
| Custom panel (not specified) | 1 |

Q4. Welke verrijkingstrategie wordt gebruikt voor NGS analyses van vaste tumoren op DNA?

| Antwoorden | N |
|---------------------|----|
| Amplicon-based | 14 |
| Hybridization-based | 5 |

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

| Antwoorden | N |
|------------|----|
| Paired-end | 15 |
| Single-end | 4 |

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

| Antwoorden | N |
|------------|----|
| 75 | 1 |
| 100 | 1 |
| 110 | 1 |
| 113 | 1 |
| 141 | 1 |
| 150 | 10 |
| 151 | 1 |
| 251 | 1 |
| 300 | 1 |
| 360 | 1 |

Q7. Welke bioinformatica software worden gebruikt voor de data analyse?

| Antwoorden | N |
|---|---|
| Open source /in-house development | 7 |
| SeqNext, JSI medical systems | 4 |
| QCI Interpret-Somatic Cancer, Qiagen | 3 |
| CLC Genomics Workbench, Qiagen | 3 |
| Variant Studio Software, Illumina | 2 |
| Sophia DDM, Sophia Genetics | 2 |
| Ion Reporter Software, ThermoFisher/Ion Torrent | 2 |
| HGMD database | 1 |
| Ingenuity Variant Analysis, Qiagen | 1 |
| Biomedical Genomics Workbench, Qiagen | 1 |
| MASTR Reporter, Multiplicom | 1 |
| NextGENe Software, SoftGenetics | 1 |
| TruSight Oncology 500 app Software, Illumina | 1 |

Opmerkingen: De bio-informatica tools zijn in *open source* gebruikt met de volgende combinaties: 1/BWA, GATK UnifiedGenotyper, Annotvar, 2/bcbio, 3/ Pindel, CNVkit , CNVpanelizer

Q8. Welke categorieën van somatische varianten worden gedetecteerd door uw NGS methode gebruikt voor vaste tumoren op DNA? en detectielimiet voor de allelfrequentie (%)

| | 2 | 2.5 | 3 | 4 | 5 | NA | Totaal |
|--|---|-----|---|---|----|----|--------|
| CNV (Copy number variants) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 |
| Indels | 1 | 2 | 2 | 2 | 12 | 0 | 19 |
| SNV (Single nucleotides variants) | 1 | 2 | 2 | 2 | 12 | 0 | 19 |

Q9. Welk type staal wordt in uw laboratorium gesequeneerd voor het opsporen van somatische varianten?

| Antwoorden | N |
|-----------------------|----|
| Paraffineweefsel | 19 |
| Cytologisch vocht | 7 |
| Vers weefsel | 3 |
| Circulerend tumor-DNA | 2 |
| Uitstrijkje | 1 |
| Vriesmateriaal | 1 |

Q10. Wanneer u, in de routine, somatische varianten in vaste tumoren opspoor op DNA, sequeneert u dan een normaal staal in parallel met het tumorstaal van dezelfde patiënt?

| Antwoorden | N |
|---|----|
| Nee | 18 |
| In sommige gevallen, bij verdenking van kiembaanvariant | 1 |

Q11. Voor stalen in paraffine: schat een patholoog de tumorinhoud op een Hematoxyline-Eosine slide (HE) vooraleer u start met de NGS analyse?

| Antwoorden | N |
|------------|----|
| Ja | 19 |

Q12. Rijkt uw laboratorium de tumorcelpopulatie aan voor een NGS analyse?

| Antwoorden | N |
|--|----|
| Ja, met handmatige dissectie m.b.v. een HE slide vooraf omcirkeld door een patholoog | 16 |
| Nee, de volledige weefselcoupe wordt gebruikt voor analyse | 2 |
| In sommige gevallen, op aangeven van de patholoog | 1 |

Q13. Wat is het minimum percentage neoplastische cellen dat in het staal moet aanwezig zijn om een NGS analyse uit te voeren?

| Antwoorden | N |
|------------|----|
| 5% | 1 |
| 10% | 15 |
| 20% | 3 |

Opmerkingen: Sommige laboratoria starten ook de NGS analyse onder het aangegeven percentage neoplastische cellen maar negatieve resultaten worden gerapporteerd onder voorbehoud.

Q14. Welke methode wordt gebruikt voor de kwantificatie van DNA?

| Antwoorden | N |
|-----------------------------|----|
| Qubit fluorometer | 16 |
| Quantus fluorometer | 2 |
| NanoDrop fluorospectrometer | 1 |

Opmerkingen: Eén laboratorium meldt dat het DNA niet wordt gekwantificeerd. Een ander laboratorium gebruikt 2 verschillende kwantificatiemethoden (Qubit en Quantus).

Q15. Combinaties van richtlijnen gebruikt door laboratoria

| Richtlijnen\ Aantal laboratoria | 5 | 5 | 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | totaal |
|---|---|---|---|---|---|---|---|--------|
| BELAC 2-405-NGS Rev 0-2018 | | | | X | X | | | 3 |
| BELAC 2-405-NGS Rev 1-2019 | | | | X | | X | | 3 |
| BELAC 2-405-NGS Rev 2-2019 | X | X | X | X | X | | X | 18 |
| Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists, Li et al., JMD, 2017, 19(1), (PMID: 27993330) | | X | X | X | X | | X | 13 |
| ACMG-AMP: Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology, Richard et al., Genet Med, 2015, 17(5), (PMID: 25741868) | | | X | X | X | | | 7 |
| Standardization of Somatic Variant Classifications in Solid and Haematological Tumours by a Two-Level Approach of Biological and Clinical Classes: An Initiative of the Belgian ComPerMed Expert Panel. Froyen et al. Cancers, 2019 (PMID: 31888289) | | | | | | | X | 1 |

Opmerkingen: Een laboratorium meldt enkel de BELAC 2-405-NGS REV 1-2019 richtlijnen te gebruiken, terwijl deze niet de meest recente versie is. We raden echter aan om de meest recent gepubliceerde versie van deze richtlijnen te gebruiken.

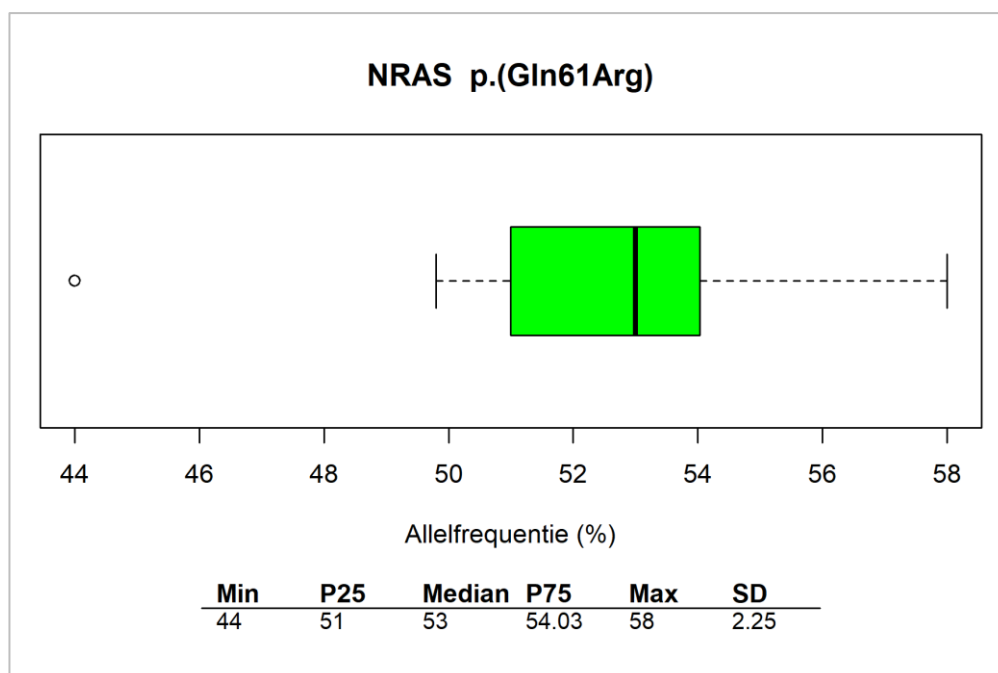
2.3. Overzicht van de resultaten

2.3.1. NGS-2020-1

| | |
|---------------------------------------|--|
| geslacht | M |
| geboortjaar | 1963 |
| type primaire tumor en histologie | melanoom |
| klinische informatie | recidief |
| anatomische lokalisatie van het staal | huid |
| staaltype | resectie |
| staal bewaring | genomisch DNA geëxtraheerd uit FFPE coupes |
| neoplastische cellen (%) | 80% |

Consensus voor de te-rapporteren varianten

NRAS NM_002524.4; c.182A>G; p.(Gln61Arg)



| NRAS NM_002524.4 c.182A>G p.(Gln61Arg) (Mediaan allelfrequentie: 53 %) | |
|--|----------|
| Biologische classificatie | N |
| Pathogeen | 13 |
| Vermoedelijk pathogeen | 1 |
| Totaal | 19 |
| Klinische classificatie | N |
| Tier I: Significant klinisch belang | 9 |
| Tier II: Mogelijk klinisch belang | 10 |
| Totaal | 19 |

Opmerkingen: De consensus bereikt voor dit staal is de identificatie van de variant NRAS NM_002524.4; c.182A>G; p.(Gln61Arg). De nomenclatuur p.Gln61Arg, gerapporteerd door 4 laboratoria, wordt niet aanbevolen volgens de HGVS richtlijnen. Voor de biologische classificatie, is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie pathogeen. De classificatie vermoedelijk pathogeen wordt als niet-aanvaardbaar beschouwd. In de Belgische richtlijnen staat deze variant in de tabel 'Consensus pathogenic variants (CPV) Solid / Myeloid list v2'. Voor de klinische classificatie is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie Tier II. De classificatie Tier I wordt niet aanbevolen maar is aanvaardbaar. Het zoeken naar NRAS mutaties wordt aanbevolen door de NCCN- en ESMO-richtlijnen. Er is momenteel echter geen door de FDA of EMA goedgekeurde behandeling geassocieerd met deze variant bij melanoom, noch zijn er ondersteunende onderzoeken die leiden tot een consensus van experts in het domein.

Consensus voor de niet-te-rapporteren varianten

KIT NM_000222.2; c.1712del (M.i.), c.1700del; p.Ile571Lysfs*19 (M.i.), p.Ile567Lysfs*19

| KIT NM_000222.2 c.1712del (M.i.), c.1700del p.Ile571Lysfs*19 (M.i.), p.Ile567Lysfs*19 (Mediaan allelfrequentie: 1.59 %) | |
|---|---|
| Biologische classificatie | N |
| VUS | 1 |
| Totaal | 1 |
| Klinische classificatie | N |
| Tier III: Ongekende klinische betekenis | 1 |
| Totaal | 1 |

Opmerkingen: Slechts één laboratorium heeft in dit staal de variant KIT NM_000222.2; c.1712del (M.i.), c.1700del; p.Ile571Lysfs*19 (M.i.), p.Ile567Lysfs*19 geïdentificeerd. Volgens de consensus voor de niet-te-rapporteren varianten, mag deze variant niet worden gerapporteerd. Biologische en klinische classificaties voor deze variant worden niet geëvalueerd.

Analyse van de conclusies

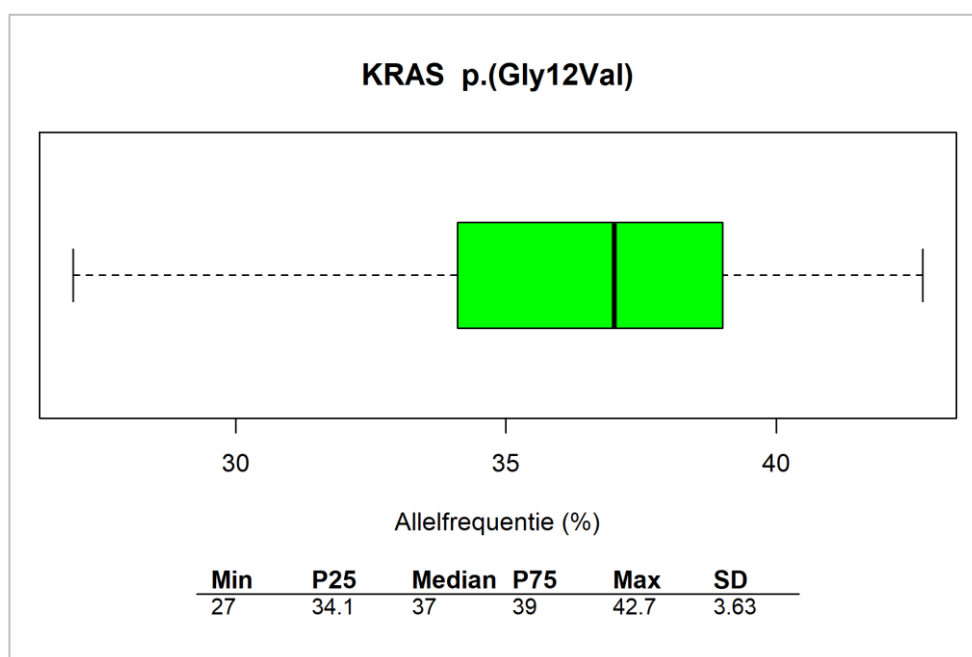
| Standaardinformatie opgenomen in de algemene conclusie door tenminste 2 laboratoria | Specifieke informatie van casus 1 | Laboratoria |
|---|---|-------------|
| Therapie | Geen indicatie voor therapie met anti-BRAF inhibitoren gelinkt aan de afwezigheid van een BRAF variant | 9 |
| | Geen indicatie voor therapie met tyrosine kinase inhibitoren gelinkt aan de afwezigheid van een BRAF variant | 3 |
| | Resistentie tegen anti-BRAF therapie gerelateerd aan de aanwezigheid van een NRAS variant | 3 |
| | Geen anti-NRAS therapie gekend | 2 |
| | (Potentiële) indicatie voor gevoeligheid aan anti-MEK therapie gelinkt aan de aanwezigheid van een NRAS variant (Binimétinib) | 9 |
| | Therapeutisch belang van anti-MEK therapie wordt in klinische studies uitgetest | 6 |
| Prognose | NRAS variant met een ongunstige prognose | 5 |
| | Predictieve en prognostische betekenis van de NRAS variant ongekend | 3 |
| Informatie over de geteste genen | Constitutieve activatie van de NRAS signaalweg | 6 |

2.3.2. NGS-2020-2

| | |
|---------------------------------------|--|
| geslacht | V |
| geboortejaar | 1947 |
| type primaire tumor en histologie | colorectaal adenocarcinoom |
| klinische informatie | classificatie TNM (2017): pT3N2a |
| anatomische lokalisatie van het staal | colon |
| staaltipe | resectie |
| staal bewaring | genomisch DNA geëxtraheerd uit FFPE coupes |
| neoplastische cellen (%) | 70% |

Consensus voor de te-rapporteren varianten

KRAS NM_004985.4; c.35G>T; p.(Gly12Val)



| KRAS NM_004985.4 c.35G>T p.(Gly12Val) (Mediaan allelfrequentie: 37 %) | |
|---|----------|
| Biologische classificatie | N |
| Pathogeen | 19 |
| Totaal | 19 |
| Klinische classificatie | N |
| Tier I: Significant klinisch belang | 17 |
| Tier II: Mogelijk klinisch belang | 2 |
| Totaal | 19 |

Opmerkingen: De consensus bereikt voor dit staal is de identificatie van de variant KRAS NM_004985.4; c.35G>T; p.(Gly12Val). De nomenclatuur p.Gly12Val, gerapporteerd door 3 laboratoria, wordt niet aanbevolen volgens de HGVS richtlijnen. Slechts één laboratorium heeft deze variant met de referentie cDNA c.35C>A gerapporteerd, dat overeenkomt met de niet-coderende DNA streng. De andere laboratoria hebben deze variant op de complementaire DNA streng gerapporteerd. Voor de biologische classificatie, is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie pathogeen. In de Belgische richtlijnen staat deze variant in de tabel 'Consensus pathogenic variants (CPV) Solid / Myeloid list v2'. Voor de klinische classificatie, is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie Tier I. De classificatie Tier II wordt als niet-aanvaardbaar beschouwd gezien het zeer hoge bewijsniveau van deze variant voor resistentie tegen anti-EGFR antistof therapie: FDA en EMA keuren varianten goed in exonen 2, 3 en 4 voor het KRAS gen (Tier I, level A).

Consensus voor de niet-te-rapporteren varianten

KRAS NM_004985.4; c.496_498delinsAAA (M.i.), c.*50_*52delinsAAA; p.His166Lys (M.i.), NA

| KRAS NM_004985.4 c.496_498delinsAAA (M.i.), c.*50_*52delinsAAA p.His166Lys (M.i.), NA (Mediaan allelfrequentie: 1.49 %) | |
|--|---|
| Biologische classificatie | |
| VUS | N |
| Totaal | 1 |
| Klinische classificatie | |
| Tier III: Ongekende klinische betekenis | N |
| Totaal | 1 |

Opmerkingen: Slechts één laboratorium heeft in dit staal de variant KRAS NM_004985.4; c.496_498delinsAAA (M.i.), c.*50_*52delinsAAA; p.His166Lys (M.i.), NA geïdentificeerd. Volgens de consensus voor de niet-te-rapporteren varianten, mag deze variant niet worden gerapporteerd. Biologische en klinische classificaties voor deze variant worden niet geëvalueerd.

Analyse van de conclusies

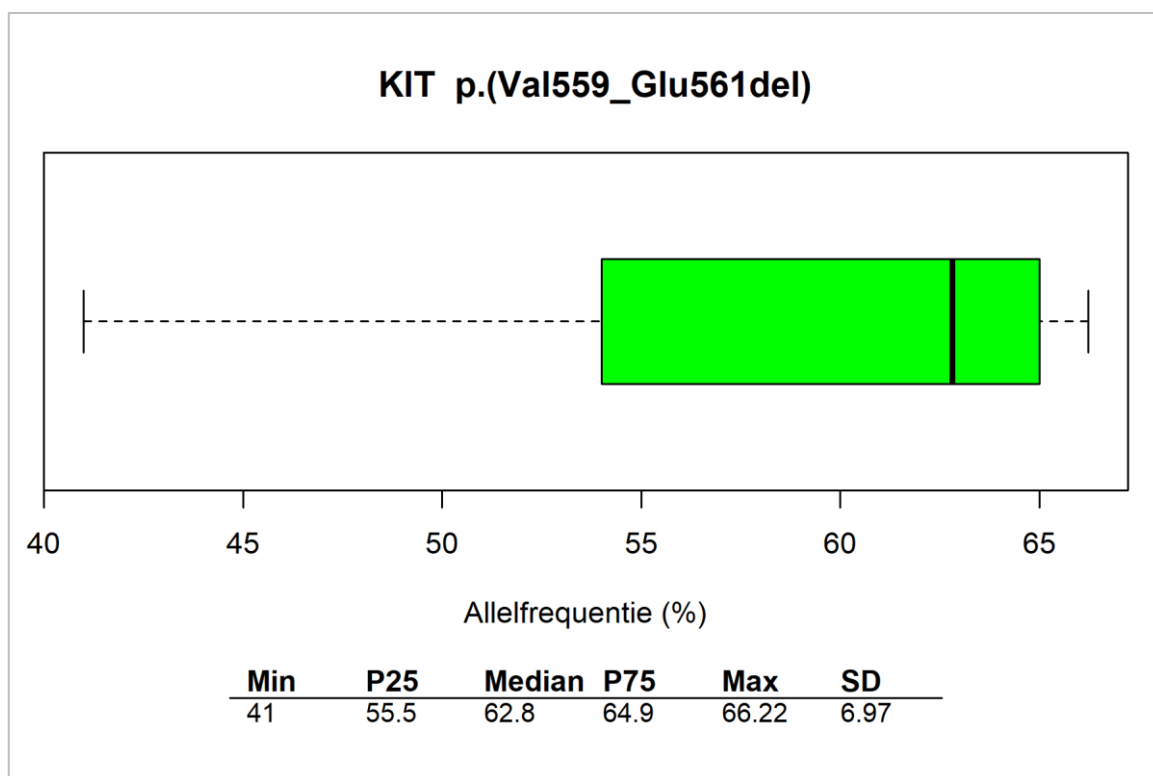
| Standaardinformatie opgenomen in de algemene conclusie door tenminste 2 laboratoria | Specifieke informatie van casus 2 | Laboratoria |
|---|---|-------------|
| Therapie | Resistentie tegen anti-EGFR therapie gerelateerd aan de aanwezigheid van een KRAS variant | 12 |
| | In gemetastaseerde colorectale tumoren, resistentie tegen anti-EGFR therapie gerelateerd aan de aanwezigheid van een KRAS variant | 5 |
| Prognose | Variant met ongunstige prognose | 3 |
| Informatie over de geteste genen | Constitutieve activatie van de RAS signaalweg | 6 |

2.3.3. NGS-2020-3

| | |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| geslacht | M |
| geboortejaar | 1948 |
| type primaire tumor en histologie | GIST |
| klinische informatie | classificatie TNM (2017): pT4N0 |
| anatomische lokalisatie van het staal | colon |
| staaltype | resectie |
| staal bewaring | coupes FFPE |
| neoplastische cellen (%) | niet gecommuniceerd |

Consensus voor de te-rapporteren varianten

KIT NM_000222.2; c.1676_1684del; p.(Val559_Glu561del)



| KIT NM_000222.2 c.1676_1684del p.(Val559_Glu561del) (Mediaan allelfrequentie: 62.8 %) | |
|--|----------|
| Biologische classificatie | N |
| Pathoogeen | 13 |
| Vermoedelijk pathoogeen | 5 |
| Totaal | 18 |
| Klinische classificatie | N |
| Tier I: Significant klinisch belang | 13 |
| Totaal | 18 |

Opmerkingen: De consensus bereikt voor dit staal is de identificatie van de variant KIT NM_000222.2; c.1676_1684del; p.(Val559_Glu561del). Deze deletie van 9 nucleotiden wordt in 5' en in 3' door een AGG-herhalingssequentie geflankeerd. Betreffende cDNA-referenties: De nomenclatuur c.1676_1684delTTGTTGAGG, gerapporteerd door 3 laboratoria, wordt geaccepteerd volgens de HGVS richtlijnen. De nomenclatuur c.1673_1681delAGGTTGTTG, gerapporteerd door 1 laboratorium, wordt niet aanbevolen door de HGVS richtlijnen, vanwege de 3' beschrijvingsregel van de referentie sequentie. De nomenclatuur c.1676_1684del9, gerapporteerd door 1 laboratorium, volgt niet de HGVS richtlijnen en de nomenclatuur c.1675_1683del9, gerapporteerd door 1 laboratorium, is niet correct. Betreffende eiwitreferenties: De nomenclatuur p.(Val559_Glu561delValValGlu) en p.Val559_Glu561del, gerapporteerd door 5 laboratoria, worden niet aanbevolen volgens de HGVS richtlijnen. Voor de biologische

classificatie, is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie pathogeen. De classificatie vermoedelijk pathogeen wordt als niet-aanvaardbaar beschouwd. In de Belgische richtlijnen staat deze variant in de tabel 'Consensus pathogenic variants (CPV) Solid / Myeloid list v2'. Voor de klinische classificatie, is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie Tier I.

Consensus voor de niet-te-rapporteren varianten

KIT NM_000222.2; c.1673_1681del; p.(Lys558_Glu561del)

| KIT NM_000222.2 c.1673_1681del p.(Lys558_Glu561del) (Mediaan allelfrequentie: 51.6 %) | |
|--|----------|
| Biologische classificatie | N |
| Pathogeen | 1 |
| Totaal | 1 |
| Klinische classificatie | N |
| Tier I: Significant klinisch belang | 1 |
| Totaal | 1 |

Opmerkingen: Eén laboratorium heeft de variant KIT NM_000222.2; c.1673_1681del; p.(Lys558_Glu561del) gerapporteerd in plaats van de variant KIT NM_000222.2; c.1676_1684del; p.(Val559_Glu561del) die effectief aanwezig was in dit staal. Het is een fout bij het identificeren van de variant op niveau van de eiwitreferentie. De biologische en klinische classificaties voor deze variant komen overeen met de verwachte classificaties voor de variant p.(Val559_Glu561del): pathogeen en Tier I.

KIT NM_000222.2; c.2361+72dup (M.i.), c.2349+72dup; NA

| KIT NM_000222.2 c.2361+72dup (M.i.), c.2349+72dup; NA (Mediaan allelfrequentie: 26.79 %) | |
|---|----------|
| Biologische classificatie | N |
| VUS | 1 |
| Totaal | 1 |
| Klinische classificatie | N |
| Tier III: Ongekende klinische betekenis | 1 |
| Totaal | 1 |

Opmerkingen: Slechts één laboratorium heeft in dit staal de variant KIT NM_000222.2; c.2361+72dup (M.i.), c.2349+72dup; NA geïdentificeerd. Volgens de consensus voor de niet-te-rapporteren varianten, mag deze variant niet worden gerapporteerd. Biologische en klinische classificaties voor deze variant worden niet geëvalueerd.

KIT NM_000222.2; c.2361+71_2361+72dup (M.i.), c.2349+71_2349+72dup; NA

| KIT NM_000222.2 c.2361+71_2361+72dup (M.i.), c.2349+71_2349+72dup; NA (Mediaan allelfrequentie: 14.29 %) | |
|---|----------|
| Biologische classificatie | N |
| VUS | 1 |
| Totaal | 1 |
| Klinische classificatie | N |
| Tier III: Ongekende klinische betekenis | 1 |
| Totaal | 1 |

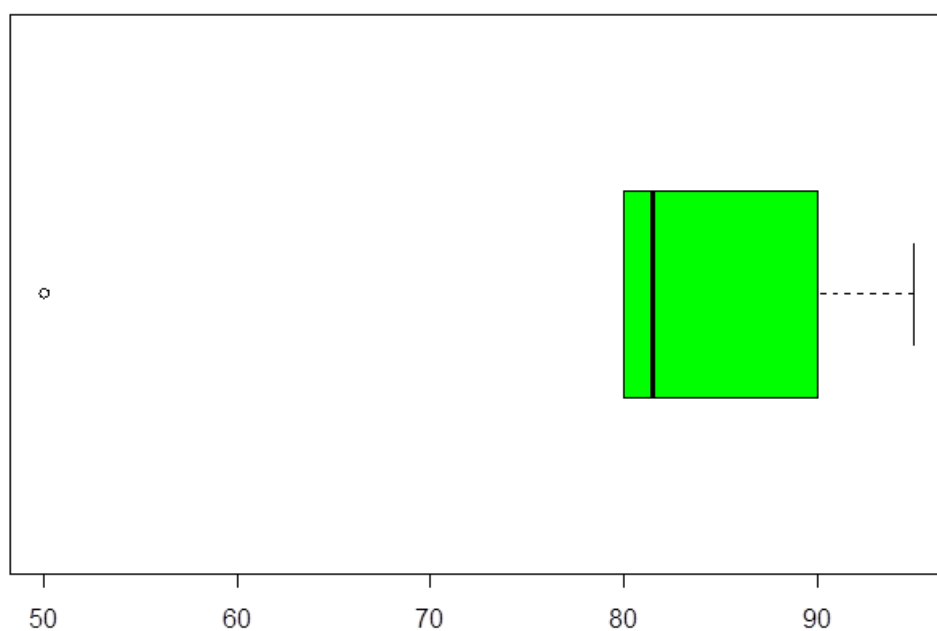
Opmerkingen: Slechts één laboratorium heeft in dit staal de variant KIT NM_000222.2; c.2361+71_2361+72dup (M.i.), c.2349+71_2349+72dup; NA geïdentificeerd. Volgens de consensus voor de niet-te-rapporteren varianten, mag deze variant niet worden gerapporteerd. Biologische en klinische classificaties voor deze variant worden niet geëvalueerd.

Analyse van de conclusies

| Standaardinformatie opgenomen in de algemene conclusie door tenminste 2 laboratoria | Specifieke informatie van casus 3 | Laboratoria |
|---|--|-------------|
| Therapie | Indicatie voor gevoeligheid aan tyrosine kinase inhibitoren | 17 |
| | Mogelijk verminderde respons met tweedelijnsbehandeling: sunitinib | 2 |
| Prognose | Variant met ongunstige prognose | 7 |
| Informatie over de geteste genen | Deletie in exon 11 van het KIT gen gedetecteerd | 15 |

Analyse van het percentage van de tumorcellen op de ontvangen coupes

Het percentage van de tumorcellen doorgestuurd door de deelnemers ligt voor dit staal tussen 50 en 95% met een gemiddelde van 83%.



| Min | P25 | Median | P75 | Max | SD |
|-----|-----|--------|-----|-----|------|
| 50 | 80 | 81.5 | 90 | 95 | 7.41 |

2.3.4. Slaagpercentage van de deelnemers

Consensus voor de te-rapporteren varianten

| Slaagpercentage gebaseerd op consensus voor de te-rapporteren varianten | N |
|---|----|
| 3/3 (100%) | 18 |
| 2/3 (66,67%) | 1 |
| Totaal slaagpercentage: 56/57 (98,25%) | |

Consensus voor de niet-te-rapporteren varianten

Vijf varianten werden gerapporteerd door minder dan een derde van de deelnemers.

- Voor het staal NGS-2020-3 meldde een laboratorium de variant KIT NM_000222.2; c.1673_1681del; p.(Lys558_Glu561del) in plaats van de variant KIT NM_000222.2; c.1676_1684del; p.(Val559_Glu561del). De DNA-sequentie op niveau van de variant is correct uitgelijnd in de bam-bestanden. We hebben echter een fout gevonden in de beschrijving van de variant op eiwitniveau.
- 4/5 consensus niet-te-rapporteren varianten werden door hetzelfde labo gerapporteerd.

Biologische en klinische classificaties

| Slaagpercentage van deelnemers voor de classificaties voor de consensus voor de te-rapporteren varianten * | N |
|--|----|
| Biologische classificaties | |
| 3/3 (100%) | 14 |
| 2/3 (66,67%) | 4 |
| 1/3 (33,33%) | 1 |
| Totaal slaagpercentage: - biologische classificaties : 51/57 (89,50%) | |
| Klinische classificaties ** | |
| 3/3 (100%) | 17 |
| 2/3 (66,67%) | 2 |
| Totaal slaagpercentage: - klinische classificaties : 55/57 (96,49%) | |

*De classificaties voor de niet-te-rapporteren variant KIT p.(Lys558_Glu561del) worden meegeteld in de slaagpercentages.

** De resultaten 'niet-aanbevolen maar aanvaardbaar' worden als succesvol beschouwd.

3. BIJLAGE

3.1. Overzicht van de klinische conclusies

Deze gegevens zijn de antwoorden ingegeven op de website <https://qml.wiv-isp.be/NGS/20201/> en werden hieruit geëxtraheerd. Om geen vertaalfouten te introduceren, werden de conclusies in de taal van het laboratorium behouden.

3.1.1. NGS-2020-1

| |
|---|
| <p>• NRAS [NM_002524.4: c.182A>G p.(Gln61Arg)] [VAF: 50.98%] [TIER 1]: Somatic mutations in NRAS have been found in approximately 13–25% of all malignant melanomas. The result of these mutations is constitutive activation of NRAS signaling pathways. NRAS mutations are found in all melanoma subtypes, but may be slightly more common in melanomas derived from chronic sun-damaged (CSD) skin. Currently, there are no direct anti-NRAS therapies available. NRAS Q61 mutations have been found in multiple myeloma, gastrointestinal stromal tumors, melanoma, and others. A melanoma patient harboring a mutation at this locus responded to treatment with the alkylating agent temozolomide (PMID: 21576590). However, in colorectal cancer patients, mutations at this locus have been shown to confer resistance to cetuximab. The prognostic impact of mutations at this locus is currently under study. VAF is suggestive of a germline variant. Therefore, it is recommended to check the presence of this variant in a blood sample. No variants in KIT and BRAF to be reported.</p> |
| <p>De aanwezigheid van NRAS mutatie p.(Gln61Arg) in deze patiënt is geassocieerd met een verhoogde respons op anti-MEK therapie en een slechtere prognose. Verder zijn er meerdere studies waarbij verhoogde resistentie tegen anti-BRAF therapie gemeld werd. Er werden geen mutaties gedetecteerd in BRAF en KIT.</p> |
| <p>Er werd geen pathogene mutatie aangetoond in BRAF. Dit betekent in het algemeen dat de patiënt niet gevoelig is aan BRAF V600 inhibitoren. Er werd wel een mutatie gedetecteerd in NRAS. Somatische mutaties in NRAS werden aangetoond in ~13-25% van alle maligne melanomen. Het resultaat van mutaties in codon 12, 13 of 61 is een constitutieve activatie van de NRAS signaalcascade. NRAS mutaties worden aangetroffen in alle melanoma subtypes, maar zijn iets meer voorkomend in melanomen ten gevolge van chronisch cumulatieve zonblootstelling. Op dit moment zijn geen geregistreerde anti-NRAS therapieën beschikbaar. NRAS mutaties zijn meestal mutually exclusive met BRAF mutaties.</p> |
| <p>Een mutatie predictief voor gevoeligheid aan BRAF-inhibitoren en de tyrosine kinase inhibitor imatinib kan NIET worden aangetoond.</p> <p>De predictieve/prognostische betekenis van de hotspotmutatie c.182A>G (p.(Gln61Arg)) in NRAS is op heden onvoldoende gekend maar wordt uitvoerig bestudeerd (Dummer et al. Binimetinib versus dacarbazine in patients with advanced NRAS-mutant melanoma (NEMO): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol 2017).</p> <p>Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.</p> |
| <p>Des études cliniques sont en cours pour démontrer l'impact thérapeutique des mutations NRAS dans les mélanomes.</p> |
| <p>Présence de cellules porteuses du variant p.(Gln61Arg) (p.(Q61R)) dans le gène NRAS. Ce variant (rs11554290) est classé biologiquement comme pathogénique selon les recommandations de Sciensano (COSM584) et est de signification clinique thérapeutique avérée dans cette pathologie. Binimetinib has evidence of efficacy in patients with NRAS Q61R in melanoma. Recommended for NRAS mutated tumors that have progressed after prior immune checkpoint inhibitor therapy (category 2B). https://www.mycancergenome.org/content/alteration/nras-q61r/ https://www.oncokb.org/gene/NRAS NCCN Clinical Practice Guidelines in oncology. Cutaneous melanoma. Version 1.2020.</p> |
| <p>Er werd een NRAS(NM_002524.4):c.182A>G (p.(Gln61Arg)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 3. De aanwezigheid van deze specifieke variant in melanoma heeft mogelijk klinisch belang (tier II) en geeft mogelijk een verhoogde sensitiviteit voor MEK inhibitor binimetinib (PMID: 24895460, 23414587 (fase II) en 28284557 (fase III)). Daarnaast is deze variant mogelijk ook geassocieerd met een slechtere prognose (PMID: 28860801). Er werden geen (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in de genen BRAF en KIT.</p> |
| <p>Binnen de grenzen van de methode, is er geen mutatie gevonden in exon 15 van het BRAF gen. Voor melanoma zonder BRAF mutatie is er een slechte respons voor BRAF-inhibitor therapie.</p> <p>De pathogene variant c.182A>G p.(Gln61Arg) werd gevonden in het NRAS gen exon 3 dat wordt geassocieerd met een resistentie voor BRAF inhibitoren (PMID: 23569304) en met een waarschijnlijke gevoeligheid voor MEK-inhibitor (Binimetinib) (PMID: 28284557) ; Clinical trials met Selumetinib (PMID: 22105174; PMID: 23406027)</p> |

Er werd een pathogene mutatie in het NRAS gen geïdentificeerd, NRAS c.182A>G (p.(Gln61Arg)). Dit is een recurrente mutatie in de context van melanoom, die tot activatie van oncogene signaalwegen leidt (PMID 28860801). Deze mutatie heeft een significant klinisch belang (Tier I). De aanwezigheid van deze mutatie kan resulteren in gevoeligheid voor behandeling met MEK1/2 kinase inhibitoren (PMID 28284557). Ook zou het voorkomen van een NRAS mutatie in melanoom geassocieerd zijn met een ongunstiger tumorbiologie en slechtere overleving (PMID 21615881 en 22180178). De afwezigheid van een BRAF Val600 mutatie en de afwezigheid van een KIT mutatie impliceert dat bij deze patiënt een behandeling met BRAF inhibitoren of KIT inhibitoren niet zinvol is (National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: cutaneous melanoma, version 1.2020).

In het onderzochte staal werd geen activerende BRAF-mutatie in codon 600 teruggevonden. Studies hebben aangetoond dat patiënten met wild-type BRAF p.Val600 tumoren geen baat zullen hebben bij een behandeling met een BRAF kinase inhibitor (BRIM studies: Chapman et al., 2011; Sosman et al., 2012).

Er werd een activerende NRAS mutatie in exon xx teruggevonden. Het is voorlopig nog onduidelijk in hoeverre dit een definitieve prognostische of predictieve waarde heeft.

Er werden geen mutaties gedetecteerd in het KIT gen.

Coverage van het staal voldoet aan de vooropgestelde criteria.

In het DNA geëxtraheerd uit de tumor van deze patiënt werd een pathogene mutatie gedetecteerd in exon 3 van het NRAS gen: c.182A>G (p.(Gln61Arg)) (VAF 49,8 %).

Tier I: Significant klinisch belang

Deze gekende driver mutatie in NRAS is bij melanomen geassocieerd met een ongunstige prognose. Een therapeutisch respons op MEK inhibitor therapie (zoals binimetinib) werd beschreven. Gezien de afwezigheid van een BRAF V600 mutatie, heeft deze patiënt waarschijnlijk geen baat BRAF-targeted therapie.

Bron:

<https://www.mycancergenome.org>

<https://ckb.jax.org>

PMID 21615881, PMID 22180178, PMID 30154648

NGS SeqCap solide tumor 69 genpanel:

- NRAS pathogene variant

De aanwezigheid van een activerende NRAS variant wordt in het algemeen geassocieerd met een mogelijke respons op MEK inhibitor behandeling waaronder binimetinib in melanoom, maar kan daarnaast resistentie geven aan BRAF inhibitor behandeling (Dummer et al. Lancet Oncol 2017, Nazarian et al. Nature 2010).

Absence de mutation activatrice BRAF associées avec une augmentation de la sensibilité aux inhibiteurs BRAF.

Présence d'une mutation activatrice (Q61R) au niveau du gène NRAS.

Des études pré-cliniques suggèrent une association entre les mutations activatrices NRAS et une sensibilité aux inhibiteurs MEK.

Dans ce prélèvement de mélanome cutané, infiltré à 80% par des cellules néoplasiques, dont le stade, les caractéristiques moléculaires et l'historique thérapeutique n'ont pas été précisés, présence d'une mutation NRAS c.182A>G, p.Gln61Arg pathogénique et d'impact clinique avéré (Tier I) de fréquence allélique 53%. Absence de variant BRAF au codon V600 et KIT détectés avec la technique NGS utilisée. Les mutations NRAS, de pronostic défavorable, sont retrouvées dans 15% des mélanomes cutanés et sont décrites comme prédictives de résistance lorsqu'elles sont détectées dans le décours de bihérapies anti-BRAF /anti-MEK combinées de mélanomes métastatiques BRAF V600 positifs. A noter que ce variant NRAS a été détecté dans les naevi pigmentés géants en tant que mutation constitutionnelle en mosaïque et dans les mélanomes neurocutanés.

Possibilité d'inclusion de ce patient dans une étude clinique de phase I (KULeuven) combinant anti-MEK/ anti-CDK4 et CDK6 et un anti-ERK.

Présence d'un variant probablement pathogénique d'impact clinique indéterminé (Tier III) FBXW7 c.1652dupG, p.(Ile552Tyfs*9) de fréquence allélique 31%.

Un variant ALK d'impact clinique indéterminé (VUS) c.121C>T p.Arg41Trp 51% est mentionné à titre d'information.

En fonction de la présentation clinique et de l'histoire familiale, ce cas doit être discuté en consultation multidisciplinaire oncologique et dans le cadre d'une consultation en génétique médicale éventuelle.

Nous avons recherché par séquençage à haut débit des mutations dans plusieurs régions d'intérêt selon les indications de la commission ComPerMed. Une mutation pathogénique du type p.(Gln61Arg) (Q61R) a été détectée dans NRAS. 15 à 20% des mélanomes sont porteurs d'une mutation de NRAS. Impact clinique potentiel* : Deux études cliniques de Phase I (Adjei et al. JCO 2008) et de Phase II (Ascierto et al., Lancet Oncol 2013) ont montré une réponse partielle suite à un traitement à base d'inhibiteurs de MEK chez des patients atteints d'un mélanome muté pour le résidu 61 de NRAS. Nous n'avons pas détecté d'autre mutation.*Selon les guidelines de l'ACMG et AMP, voir Li et al., JMD Vol 19 No.1, 2017 La liste complète des gènes couverts est consultable à l'adresse https://www.chu.ulg.ac.be/jcms/c_9635594/fr/informations-pratiques-relatives-aux-analyses

Er werd GEEN BRAF mutatie gedetecteerd. Dit resultaat is voor melanomen predictief voor een gebrek aan respons op BRAF-inhibitoren.

Er werd wel een NRAS mutatie type Q61R gedetecteerd. Inhibitie van de RAS-gemedieerde signaal transductie pathways (RAF/MAPK en PI3K/AKT) is onderwerp van klinische trials (MEK-inhibitoren, PI3K-inhibitoren).

Een mutatie predictief voor gevoeligheid aan BRAF-inhibitoren en de tyrosine kinase inhibitor imatinib kan NIET worden aangetoond.

Mutaties in NRAS codon 61 zijn recurrent in melanomen. De predictieve/prognostische betekenis van de hotspotmutatie c.182A>G (p.(Gln61Arg)) in NRAS is op heden onvoldoende gekend maar wordt uitvoerig bestudeerd (Dummer et al., 2017 Lancet Oncol, doi: 10.1016/S1470-2045(17)30180-8).

Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen, die zijn opgenomen in de NGS (Next Generation Sequencing) overeenkomst.

De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.

3.1.2. NGS-2020-2

| |
|--|
| <p>• KRAS [NM_004985.4: c.35G>T p.(Gly12Val)] [VAF: 39.6%] [TIER 1]</p> <p>KRAS is a gene that encodes one of the several proteins in the epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway that is important in the development and progression of cancer. KRAS can harbor oncogenic mutations that yield a constitutively active protein. Such mutations are found in approximately 30% to 50% of metastatic colorectal tumors and are common in other tumor types. Mutations in the KRAS gene may indicate poor prognosis and poor drug response with therapies targeted to EGFR. The absence of a KRAS mutation predicts a greater likelihood of response to EGFR-targeted therapies and improved survival with such treatment. The relevant KRAS mutation is in one of five codons (12 13, 61, 117 or 146). The presence of KRAS mutations in codon 12, 13 or 61 is associated with a high likelihood of resistance to therapies targeting EGFR. In addition, mutations at codons 117 and 146 may also be associated with reduced response to EGFR-targeted therapies. Results should be interpreted in conjunction with other laboratory and clinical findings. Drug resistance: Panitumumab Cetuximab.</p> <p>No variants in NRAS and BRAF to be reported.</p> <p>There is also a pathogenic heterozygous TP53 variant. However if only the genes KRAS, NRAS, and BRAF should be looked at, not sure if you should report this.</p> <p>• TP53 [NM_000546.5:c.818G>A p.(Arg273His)] [VAF: 54.59%] [PATHOGENIC]</p> <p>VAF is suggestive of a germline variant. Therefore, it is recommended to check the presence of this variant in a blood sample. Germline pathogenic variants leading to the diagnosis of a hereditary cancer syndrome that has an established guideline for clinical surveillance are here reported with recommendation of cancer genetic counseling.</p> |
| <p>In gemetastaseerde setting is de aanwezigheid van mutatie p.(Gly12Val) geassocieerd met resistentie tegen anti-EGFR therapie. Er werden verder geen mutaties gedetecteerd in NRAS en BRAF.</p> |
| <p>Er werd een mutatie in KRAS aangetoond. De aanwezigheid van deze mutatie in mCRC betekent in het algemeen resistentie aan anti-EGFR antistoffen.</p> |
| <p>De aanwezigheid van de klinisch relevante mutatie c.35G>T (p.(Gly12Val)) in KRAS is geassocieerd met resistentie aan anti-EGFR therapieën.</p> <p>Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.</p> |
| <p>Interprétations cliniques : Dans les adénocarcinomes colo-rectaux, la présence de mutations dans le gène KRAS est associée à une diminution de la sensibilité aux thérapies anti EGFR. Référence: College of American Pathologists (CAP, Biomarker testing for Carcinoma of the Colon and Rectum, décembre 2014).</p> |
| <p>Présence de cellules porteuses du variant p.(Gly12Val) (p.(G12V)) dans le gène KRAS. Ce variant (rs121913529) est classé biologiquement comme pathogénique selon les recommandations de Sciensano (COSM520) et est de signification clinique thérapeutique avérée dans cette pathologie. According to NCCN, mutations in KRAS have been associated with reduced responsiveness to EGFR TKI therapy (afatinib, dacomitinib, erlotinib, gefitinib, osimertinib) and also to cetuximab and panitumumab. https://www.mycancergenome.org/content/alteration/kras-g12v/ https://www.oncokb.org/gene/KRAS</p> |
| <p>Er werd een KRAS(NM_004985.4):c.35G>T (p.(Gly12Val)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 2. De aanwezigheid van deze variant in colorectaal adenocarcinoom heeft significant klinisch belang (tier I) en geeft in het algemeen resistentie tegen EGFR monoclonale antilichamen (NCCN guidelines colon cancer v2.2020 en PMID: 26438111). Er werden geen (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in de genen NRAS en BRAF.</p> |
| <p>De pathogene variant c.35G>T p.(Gly12Val) werd gevonden in het KRAS gen exon 2 dat wordt geassocieerd met een resistentie voor EGFR-TKI's en anti-EGFR antibodies. (PMID: 18946061; PMID: 20619739; PMID: 18316791; PMID: 20921465; PMID: 24024839)</p> |
| <p>Er werd een pathogene mutatie in het KRAS gen geïdentificeerd, KRAS c.35G>T (p.(Gly12Val)). Dit is een recurrenente mutatie in colorectaal carcinoom, die tot een constitutief actief KRAS eiwit leidt. Deze mutatie heeft een significant klinisch belang (Tier I): de aanwezigheid ervan resulteert in resistentie tegen behandeling met anti-EGFR monoklonale antilichamen (PMID 18202412 en 24024839; National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: colon cancer, version 2.2020).</p> |
| <p>In het onderzochte staal werd een activerende KRAS mutatie in exon 2 teruggevonden. Verschillende studies hebben aangetoond dat patiënten met tumoren met activerende mutaties in exonen 2, 3 en 4 van KRAS of NRAS geen baat zullen hebben bij anti-EGFR therapie (Douillard et al., 2013). Er werden geen mutaties gedetecteerd in het BRAF of NRAS gen.</p> <p>Coverage van het staal voldoet aan de vooropgestelde criteria.</p> |
| <p>In het DNA geëxtraheerd uit de tumor van deze patiënt werd een pathogene mutatie gedetecteerd in exon 2 van het KRAS gen: c.35G>T (p.(Gly12Val)) (VAF 34,2%). Tier I: Significant klinisch belang Deze activerende mutatie in KRAS wordt geassocieerd met een slechte respons op anti-EGFR therapie (zoals panitubumab en cetuximab). Voorts zijn KRAS mutaties bij colorectale carcinomen gecorreleerd met een ongunstige prognose. Bron: https://www.mycancergenome.org PMID 30854087, PMID 26347132, PMID 26275951</p> |

NGS SeqCap solide tumor 69 genpanel:
- KRAS pathogene variant

De aanwezigheid van een activerende variant in KRAS wordt in het algemeen geassocieerd met een slechte respons op anti-EGFR monoklonale antilichaam behandeling in gemetastaseerde colorectale tumoren (Douillard et al. NEJM 2013).

Une mutation activatrice (G12V) au niveau du gène KRAS a été détectée chez ce patient.

La réponse de ce patient a une thérapie ciblée d'anticorps monoclonaux contre EGFR est peu probable.

Il n'y a pas de traitements approuvés par la FDA pour les patients avec un cancer du colon avec une mutation activant RAS. Cependant, des données cliniques préliminaires suggèrent que les cancers mutés KRAS peuvent être sensible aux inhibiteurs ciblant MEK ou ERK.

Dans ce prélèvement d'adénocarcinome colorectal pT3N2a infiltré par 70% de cellules tumorales et dont l'historique thérapeutique, les caractéristiques moléculaires n'ont pas été précisées, présence d'un variant pathogénique KRAS c.35G>T, p.Gly12Val d'impact clinique potentiel (Tier II) pour les CCR stades III et détecté avec une fréquence allélique de 39%. Les mutations "RAS" sont considérées comme étant de mauvais pronostic dans les CCR stades III mais sans consensus absolu. Aucun variant pathogénique BRAF ou NRAS n'a été observé avec la technique NGS utilisée. Le statut MSI doit être également évalué en fonction de l'histoire clinique et familiale car le pronostic sera modifié en fonction du résultat MSI-H.

Présence également d'un variant pathogénique PIK3CA c.1633G>A, p.Glu545Lys de fréquence allélique 44% dont l'impact clinique est encore indéterminé (III) en tant que cible thérapeutique anti-mTOR dans les cancers colorectaux et pouvant servir de critères d'inclusion dans des études cliniques faisant usage d'acétylsalicylique.

Un variant NOTCH1 c.4598A>G p.Asp1533Gly de fréquence allélique de 40% d'impact clinique indéterminé (VUS) est mentionné à titre d'information.

Remarque: étant donné que le statut métastatique du patient n'est pas connu et s'il s'avère finalement stade IV dans le bilan d'extension, alors ce variant KRAS G12V est de pronostic défavorable et prédictif de résistance aux traitements par anti-EGFR dans les cancers colorectaux métastasés. Le statut MSI est dès lors indispensable à connaître étant donné que lorsque ces mutations sont associées à un statut de déficience dans les gènes de réparation (MSI-High) une réponse durable thérapeutique avec des checkpoint inhibiteurs peut être obtenue.

En fonction de la présentation clinique et de l'histoire familiale, ce cas doit être discuté en consultation multidisciplinaire oncologique et dans le cadre d'une consultation en génétique médicale éventuelle.

Nous avons recherché par séquençage à haut débit des mutations dans plusieurs régions d'intérêt selon les indications de la commission ComPerMed.

Une mutation pathogénique du type p.(Gly12Val) (G12V) a été détectée dans KRAS.

Impact clinique avéré* :

La présence de mutations acquises de l'oncogène KRAS a été corrélée avec l'absence de réponse aux inhibiteurs du récepteur à l'EGF (EGFR), dont le panitumumab (Vectibix®) et le cétuximab (Erbix®), chez les patients atteints de cancer colorectal (CCR) métastatique (Lièvre A et al, 2006 ; Tejpar S et al, 2008).

Nous n'avons pas détecté d'autre mutation.

*Selon les guidelines de l'ACMG et AMP, voir Li et al., JMD Vol 19 No.1, 2017

La liste complète des gènes couverts est consultable à l'adresse https://www.chu.ulg.ac.be/jcms/c_9635594/fr/informations-pratiques-relatives-aux-analyses

Er werd een KRAS mutatie type G12V gedetecteerd. Dit resultaat is voor colorectale carcinomen predictief voor een gebrek aan respons op anti-EGFR therapie.

Een BRAF V600E mutatie, welke prognostisch ongunstig is in colorectale carcinomen, werd evenmin gedetecteerd.

De aanwezigheid van de klinisch relevante hotspot mutatie c.35G>T (p.(Gly12Val)) in KRAS is geassocieerd met resistentie aan anti-EGFR therapieën. Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen, die zijn opgenomen in de NGS (Next Generation Sequencing) overeenkomst. De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.

3.1.3. NGS-2020-3

| |
|--|
| <p>• KIT [NM_000222.2: c.1676_1684del p.(Val559_Glu561del)] [VAF: 66.22%] [TIER 1] KIT mutations occur in approximately 80% of patients with gastrointestinal stromal tumors. The major region of KIT mutation in GIST is within exon 11, occurring in about 65% of patients. KIT exon 11 mutations are activating mutations and are typically sensitive to treatment with Imatinib (PMIDs: 26040420, 23127174, 19164557). VAF is suggestive of a germline variant. Therefore, it is recommended to check the presence of this variant in a blood sample. No variants in PDGFRA to be reported. • PDGFRA-related fusion variations cannot be detected by this method.</p> |
| <p>De aanwezigheid van de cKIT deletie p.(Val559_Glu561del) in deze patiënt is geassocieerd met verhoogde progressie-vrije overleving bij tyrosine kinase inhibitoren. Verder is de mutatie geassocieerd met een verminderde prognose. Er werden verder geen mutaties gevonden in PDGFRA.</p> |
| <p>Er werd door de test een mutatie aangetoond in KIT: dit ondersteunt de diagnose van GIST. De aanwezigheid van dit type mutatie in het KIT gen in tumoraal weefsel betekent een verhoogde sensitiviteit aan tyrosine kinase inhibitoren.</p> |
| <p>De mutatie c.1676_1684del (p.(Val559_Glu561del)) in KIT is recurrent in GIST en is geassocieerd met gevoeligheid aan de tyrosine kinase inhibitor imatinib.</p> |
| <p>Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.</p> |
| <p>Dans les GISTs, la présence de mutations dans le gène KIT des exons 9,11, 13 et 17, confèrent une sensibilité aux inhibiteurs des tyrosine kinases (TKIs). De plus, les mutations dans l'exon 11 sont associées à une progression plus rapide et à une survie plus courte (valeur pronostique).Référence: College of American Pathologists (CAP, Biomarker testing for Gastrointestinal Stromal Tumor, février 2015).</p> |
| <p>Présence de cellules porteuses du variant p.(Val559_Glu561del) (p.(V559_E561del) : délétion de 3 acides aminés dans l'exon 11) dans le gène KIT. Ce variant est classé biologiquement comme pathogénique selon les recommandations de Sciensano (COSM1250) et est de signification clinique thérapeutique avérée dans cette pathologie. Sunitinib, imatinib, nilotinib, regorafenib, and sorafenib have evidence of efficacy in patients with KIT mutation in gastrointestinal stromal tumor. https://www.mycancergenome.org/content/disease/gastrointestinal-stromal-tumor/ https://www.oncokb.org/gene/KIT</p> |
| <p>Présence d'une délétion dans l'exon 11 du gène KIT</p> |
| <p>Er werd een KIT(NM_000222.2):c.1676_1684del (p.(Val559_Glu561del)) vermoedelijk pathogene in frame deletie variant geïdentificeerd in exon 11. De aanwezigheid van dit type variant (exon 11 deletie) in GIST heeft mogelijk klinisch belang (tier II) en is mogelijks geassocieerd met een slechtere prognose (PMID: 27350754). De ESMO guidelines (2018) geven een significante correlatie weer met een verhoogde sensitiviteit voor imatinib (tier I). Een recente studie (PMID: 30792534) verfijnt deze behandeling al naargelang er resistentie varianten ontstaan in KIT met een verhoogde sensitiviteit voor regorafenib (indien imatinib-resistentie wegens extra variant in exon 17 of 18) of voor sunitinib (indien imatinib-resistentie wegens extra variant in exon 13 of 14). Er werden geen (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in het PDGFRA gen.</p> |
| <p>De vermoedelijk pathogene variant c.1676_1684del9 p.(Val559_Glu561del) werd gevonden in het KIT gen exon 11 en wordt geassocieerd met een gevoeligheid voor imatinib, Sunitinib en Regorafenib. (PMID: 28196207; PMID: 18955451; PMID: 18955451; PMID: 18235122; PMID: 17046465; PMID: 23177515). De PDGFRA, exon 18 variant c.2525A>T p.(Asp842Val) kon niet worden aangetoond.</p> |
| <p>Er werd een pathogene mutatie in het KIT gen geïdentificeerd, KIT c.1676_1684del (p.(Val559_Glu561del)). Mutaties in het KIT gen worden in ongeveer 80 % van de gastro-intestinale stromale tumoren gedetecteerd. Een in-frame deletie in exon 11, zoals bij deze patiënt, tast het juxtamembranair domein aan en resulteert in een constitutief actief KIT kinase (PMID 15897563). Deze mutatie heeft een significant klinisch belang (Tier I): gezien de aanwezigheid van deze mutatie kan gevoeligheid aan imatinib en andere KIT inhibitoren verwacht worden (PMID 15897563 en 29846513).</p> |
| <p>In het onderzochte staal werd een mutatie in exon 11 van het KIT gen teruggevonden. Studies hebben aangetoond dat patiënten met KIT exon 11 mutaties, in vergelijking met patiënten met KIT exon9 mutaties en met wild type KIT, een kortere ziektevrjje en totale overleving hebben. Deze tumoren zijn echter het meest gevoelig aan behandeling met imatinib. Patiënten met exon 11 mutaties, hebben minder kans op respons op tweedelijjn sunitinib (5% RR; Heinrich et al., 2008).Er werden geen mutaties gedetecteerd in het PDGFRA gen.Coverage van het staal voldoet aan de vooropgestelde criteria.</p> |

In het DNA geëxtraheerd uit de tumor van deze patiënt werd een pathogene mutatie gedetecteerd in exon 11 van het KIT gen: c.1676_1684del (p.(Val559_Glu561del) (VAF 64%).

Tier I: Significant klinisch belang

Door de aanwezigheid van een mutatie in KIT exon 11 heeft de patiënt hoogstwaarschijnlijk baat bij een tyrosine kinase inhibitor (zoals imatinib). Voorts is een mutatie in exon 11 van het KIT gen gecorreleerd met een ongunstige prognose.

Bron:

<https://www.mycancergenome.org>

WHO classification of tumours, Digestive system tumours, 5th edition (2019)

PMID 28334365, PMID 26349547

NGS SeqCap solide tumor 69 genpanel:

- KIT exon 11 pathogene variant

De aanwezigheid van een KIT variant in exon 11 wordt in het algemeen geassocieerd met een goede respons op TKI behandeling waaronder imatinib bij GIST patiënten (mycancergenome, NCCN soft tissue sarcoma v2.2018).

Présence d'une délétion dans l'exon 11 du gène cKIT.

Les inhibiteurs KIT et PDGFRA tels que imatinib, sunitinib et regorafenib sont des traitements approuvés par la FDA pour les patients avec des tumeurs stromales gastrointestinales (GIST) avec des mutations dans l'exon 11 du gène cKIT.

La macrodissection n'a pu être effectuée sur ce prélèvement car nous n'avons reçu que 3 lames blanches. Il n'y a donc pas eu de coloration HE.

Dans ce prélèvement de tumeur gastro-intestinale stromale (GIST) infiltré à 90% de cellules tumorales, présence majoritaire d'un variant probablement pathogénique KIT d'impact clinique avéré (Tier I), c.1673_1681delAGGTTGTTG, p.Val559_Gly561del observé avec une fréquence allélique de 62% avec la technique NGS utilisée. Les mutations KIT de l'exon 11 sont prédictives de sensibilité au traitement par inhibiteur de tyrosine-kinase (Imatinib) en adjuvantthérapie après résection ou en palliatif dans les cas avancés de GIST (en l'absence de mutations de résistance PDGFRA ou KIT et en présence d'expression SDHB). A noter que ces mutations de l'exon 11 sont également considérées comme étant de pronostic défavorable.

Remarque: à noter la présence de variants minoritaires pathogéniques KIT de très faible fréquence allélique mais non décrits comme étant prédictifs de résistance associée. Cela traduit vraisemblablement l'hétérogénéité de la tumeur.

Nous avons recherché par séquençage à haut débit des mutations dans plusieurs régions d'intérêt selon les indications de la commission ComPerMed. Une délétion a été détectée dans l'exon 11 de KIT. L'exon 11 de KIT est muté dans environ 70% des GIST. Impact clinique avéré*: La présence de mutations acquises de l'exon 11 du gène c-KIT est associée à une survie globale et une survie sans rechute raccourcie par rapport aux patients sans mutation ou avec mutation de l'exon 9 de KIT. Toutefois, ces mutations sont associées à une sensibilité élevée à l'imatinib et la durée médiane de bénéfice clinique a été rapportée à 23 mois. Les mutations de l'exon 11 de c-KIT sont considérées comme représentant un facteur pronostic négatif, tout spécialement les délétions entreprenant les codons 557 et 558 du fait de l'intensité du signal prolifératif qu'elles induisent. De plus, les mutations de l'exon 11 sont moins susceptibles de répondre aux inhibiteurs de seconde génération tel que le sunitinib (voir Heinrich et al., 2008). Chez les patients présentant une mutation de l'exon 9 de KIT, il est recommandé de porter la dose d'imatinib à 800 mg (Corless, 2007). Nous n'avons pas détecté d'autre mutation.*Selon les guidelines de l'ACMG et AMP, voir Li et al., JMD Vol 19 No.1, 2017. La liste complète des gènes couverts est consultable à l'adresse https://www.chu.ulg.ac.be/jcms/c_9635594/fr/informations-pratiques-relatives-aux-analyses

Met Next Generation Sequencing werd een pathogene KIT exon 11 mutatie gedetecteerd. KIT mutaties komen voor in +/- 85 % van de GIST tumoren. Het voorkomen ervan in GIST is predictief voor een goede respons op imatinib (en andere TKI's). Patiënten met in het bijzonder KIT exon 11 mutaties vertonen de langste (progressie-vrije) overleving onder imatinib therapie.

De mutatie c.1673_1681del (p.(Lys558_Glu561del)) in KIT exon 11 is recurrent in GIST en is geassocieerd met gevoeligheid aan de tyrosine kinase inhibitor imatinib.

Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen, die zijn opgenomen in de NGS (Next Generation Sequencing) overeenkomst.

De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.

3.2. Interpretatie van het individueel rapport

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

De volgende gegevens worden vermeld:

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

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

U kan meer details vinden in de 3 brochures die beschikbaar zijn op onze website op het volgende adres:

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

(kies "BROCHURES" in het voorgestelde menu)

of rechtstreeks op het volgende adres:

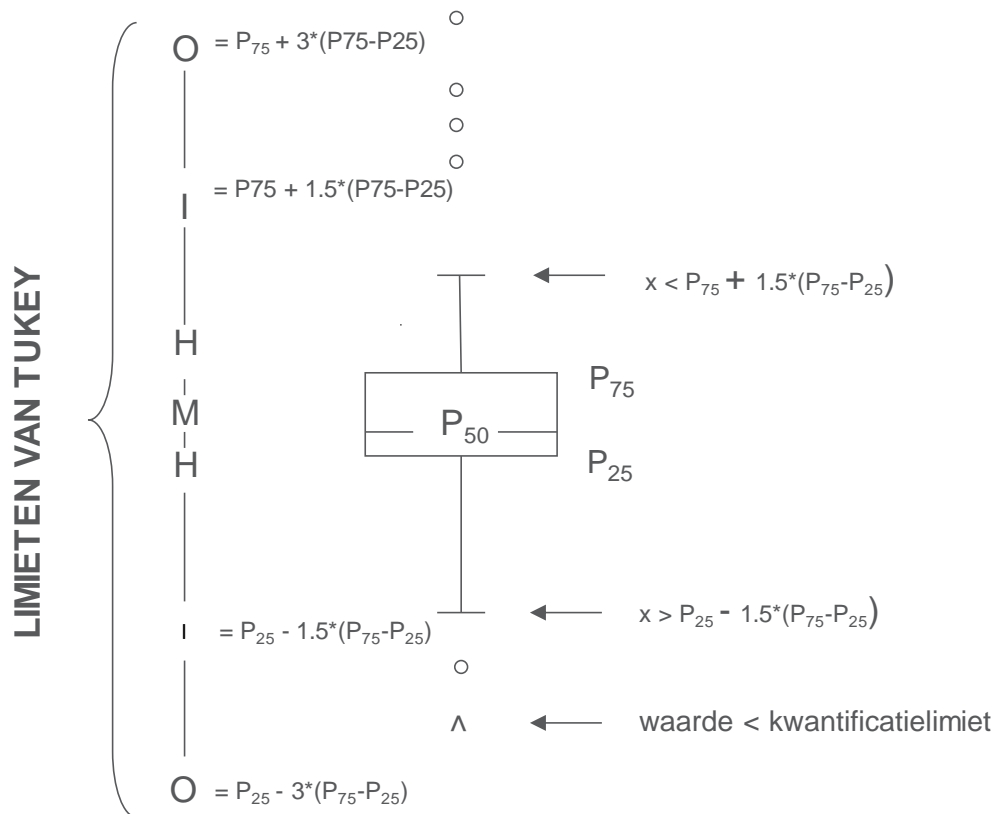
https://www.wiv-isp.be/QML/activities/external_quality/brochures/_nl/brochures.htm

- 1) Informatiebrochure over de externe kwaliteitsevaluatieprogramma's voor klinische laboratoria (Algemene informatiebrochure over de externe evaluatie).
- 2) Statistische brochure (Algemene statistische berekeningsprocedure opgesteld door Professor Albert).
- 3) Verwerking van gecensureerde waarden (Statistische berekeningsprocedure toegepast op de gecensureerde waarden opgesteld door Professor Albert).

Grafische voorstelling

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

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



Overeenkomstige limieten in geval van een normale verdeling

EINDE

© Sciensano, Brussel 2020.

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