

**EXPERTISE EN DIENSTVERLENING  
KWALITEIT VAN LABORATORIA**

***AD HOC* EXPERTENCOMITE**

**BENCHMARKING TRIAL**

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

**Hematologische maligniteiten**

**2020/2**

**Sciensano/NGS benchmarking trial/7-NL**

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

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

**AD HOC EXPERTENCOMITE**

<b>Sciensano</b>					
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	Vervanger 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>				
Elke Boone	AZ Delta Hospital Roeselare				
Katrien De Mulder	AZ-St-Lucas Hospital Ghent				
Barbara Denys	UZ Ghent				
Barbara Dew aele	UZ Leuven				
Laurent Dew ispelaere	LHUB-ULB				
Guy Froyen	Jessa Hospital Hasselt				
Barbara Lambert	IPG				
Marie Le Mercier	UZ Antwerp				
Matthijs Vynck	AZ Sint-Jan Brugge				
Thomas Delcourt	Sciensano				
Nicolas Loucheu	Sciensano				
Aline Hébrant	Sciensano				
Els Van Valckenborgh	Sciensano				
Mohamed Rida Soumali	Sciensano				
Marc Van Den Bulcke	Sciensano				

De voorlopige versies van dit rapport werden voorgelegd aan de experten op: 18/12/2020, 05/01/2021, 28/01/2021, 01/02/2021 en 02/02/2021.

Dit rapport werd besproken in de vergadering van het *ad hoc* expertencomité van: 18/01/2021.

**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-benchmarking trial, op 16/03/2021.

Alle rapporten zijn tevens te raadplegen 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 – hematologische maligniteiten.....	5
1.2. Uitbestede activiteit.....	5
1.3. Materiaal.....	5
1.4. Vraag.....	5
1.5. Evaluatiecriteria.....	7
<b>2. RESULTATEN.....</b>	<b>8</b>
2.1. Deelname aan de NGS benchmarking trial.....	8
2.2. Overzicht van de methoden.....	8
2.3. Overzicht van de resultaten.....	11
2.3.1. NGS 2020-4.....	11
2.3.2. NGS-2020-5.....	15
2.3.3. NGS-2020-6.....	22
2.3.4. Slaagpercentage van de deelnemers.....	24
<b>3. BIJLAGE.....</b>	<b>25</b>
3.1. Overzicht van de klinische conclusies.....	25
3.1.1. NGS-2020-4.....	25
3.1.2. NGS-2020-5.....	28
3.1.3. NGS-2020-6.....	34
3.2. Interpretatie van het individueel rapport.....	38

## 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/docs/Roadbook%20PersMed%20NGS%20NL\\_0.pdf](https://www.compermed.be/docs/Roadbook%20PersMed%20NGS%20NL_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>

### 1.1. **Doel van de NGS-benchmark trial – hematologische maligniteiten**

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

### 1.2. **Uitbestede activiteit**

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

### 1.3. **Materiaal**

Het materiaal voor deze studie bestond uit:

- 3 tubes genomisch DNA (Volume: 10µl, Concentratie: ongeveer 50 ng/µl), afkomstig van 3 verschillende stalen met de volgende referentie: NGS-2020-4, NGS-2020-5 en NGS-2020-6.

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

### 1.4. **Vraag**

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

NGS-2020-4: Myelodysplastisch syndroom EB2 (MDS-EB2)

NGS-2020-5: Acute myeloïde leukemie (AML)

NGS-2020-6: Primaire myelofibrose (PMF)

Voor elk staal werd er gevraagd om alle varianten die volgens de geldende procedures van het laboratorium zouden worden gerapporteerd in het klinisch rapport van de patiënt, te antwoorden,

maar enkel voor die regio's die zijn beschreven in de NGS overeenkomst en volgens de ComPerMed workflows (dus niet de andere eventueel geïdentificeerde varianten) :

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

staal	tumor	genen
NGS-2020-4	MDS-EB2	<i>SF3B1</i> (exon 14, exon 15) <i>TET2</i> (exon 3, exon 9-11) <i>SRSF2</i> (exon 1-codon 95) <i>ASXL1</i> (exon 13=laatste exon) <i>DNMT3A</i> (exon 8-23) <i>RUNX1</i> (exon 2-9=volledig) <i>U2AF1</i> (exon 2-codon 34, exon 6-codon 157) <i>TP53</i> (exon 3-9) <i>EZH2</i> (exon 2-20=volledig)
NGS-2020-5	AML	<i>ASXL1</i> (exon 13=laatste exon) <i>CEBPA</i> (exon 1=volledig) <i>DNMT3A</i> (exon 8-23) <i>FLT3</i> (exon 14, exon 15, exon 20-codon 835) <i>IDH1</i> (exon 4-hotspot) <i>IDH2</i> (exon 4-hotspot) <i>KIT</i> (exon 8, exon 10, exon 17) <i>NPM1</i> (exon 11-codon 288) <i>RUNX1</i> (exon 2-9=volledig) <i>TET2</i> (exon 3, exon 9-11) <i>TP53</i> (exon 3-9) <i>WT1</i> (exon 7, exon 9)
NGS-2020-6	PMF	<i>JAK2</i> (exon 12-F537_I546), exon 14-codon 617) <i>MPL</i> (exon 10) <i>CALR</i> (exon 9) <i>ASXL1</i> (exon 13=laatste exon) <i>EZH2</i> (exon 2-20=volledig) <i>TET2</i> (exon 3, exon 9-11) <i>IDH1</i> (exon 4-hotspot) <i>IDH2</i> (exon 4-hotspot) <i>SRSF2</i> (exon 1-codon 95) <i>SF3B1</i> (exon 14, exon 15)

Op de antwoordwebsite: <https://qml.wiv-isp.be/NGS/20202> werd er aan de deelnemers gevraagd:

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

## 1.5. Evaluatiecriteria

Dit rapport bevat de resultaten van de 17 deelnemende laboratoria. Voor de identificatie van de varianten, zijn de evaluatiecriteria gebaseerd op de consensus van de laboratoria met een drempelwaarde van 2/3 van de deelnemers.

In detail zijn de evaluatiecriteria:

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

Opmerkingen: De varianten gerapporteerd tussen 1/3 en 2/3 van de laboratoria worden ook gedetailleerd beschreven in dit rapport en worden enkel ter informatie weergegeven: geen consensus. De varianten gelinkt aan de genetische achtergrond van de stalen en aanwezig in de 3 stalen worden ook niet geëvalueerd en zijn ter informatie in dit rapport opgenomen. Ten slotte kan een variant met een consensus niet geëvalueerd worden indien de groep van experts de consensus die de laboratoria voor die variant hebben gevonden, niet valideert.

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), 'aanvaardbaar resultaat' (in geel), 'niet-aanbevolen maar aanvaardbaar' (in oranje), 'niet-aanvaardbaar resultaat' (in rood) en 'niet-geëvalueerd resultaat' (in grijs). 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 geëvalueerd op basis van standaardinformatie die door ten minste twee laboratoria werd opgenomen.

## 2. RESULTATEN

### 2.1. Deelname aan de NGS benchmarking trial

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

#### Overzicht van de deelnemers

Regio	N
Vlaams Gewest	12
Brussels Hoofdstedelijk Gewest	3
Waals Gewest	2
Totaal	17

Laboratorium	N
Pathologische anatomie	1
Klinische biologie	13
Humane genetica	3
Totaal	17

### 2.2. Overzicht van de methoden

#### Q1. Referentiegenoom gebruikt voor de analyse

Antwoorden	N
hg18	1
hg19/GRCh37	15
hg38/GRCh38	1

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

Antwoorden	N
Illumina - MiSeq	13
Illumina - NextSeq 550	2
Illumina - NextSeq 550Dx	1
Illumina - NovaSeq 6000	1

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

Antwoorden	N
TruSight Myeloid Sequencing panel, Illumina	3
AmpliSeq Myeloid panel, Illumina	1
Myeloid Solution (MYS), Sophia Genetics	1
Archer VariantPlex Myeloid	1
Custom panel, QIASeq, Qiagen	5
Custom panel, SeqCap EZ HyperCap, Roche	2
Custom panel, SeqCap, Roche	1
Custom panel, Haloplex, Agilent	1
Custom panel, Ion AmpliSeq, ThermoFisher	1
Custom panel, not specified	1

#### Q4. Welke verrijkingstrategie wordt gebruikt voor NGS analyses van hematologische maligniteiten op DNA?

Antwoorden	N
Amplicon-based	11
Probe-based	6

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

Antwoorden	N
Paired-end	17



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

Antwoorden	N
100	1
150	9
151	1
251	1
340	2
360	1
variabel	2

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

Antwoorden	N
CLC Genomics Workbench, Qiagen	5
SeqNext, JSI medical systems	5
Variant Studio Software, Illumina	3
QCI Interpret-Somatic Cancer, Qiagen	2
Sophia DDM, Sophia Genetics	2
Archer DX software	1
Open source/in-house development	5

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

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

LOD	2%	5%	Totaal
Indels	3	14	17
SNV (Single nucleotides variants)	3	14	17

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

Antwoorden	N
Beenmerg	17
Bloed	17
Paraffineweefsel	4
Vers weefsel	4
Vriesmateriaal	4
Wangslimvies	1

**Q10. Wanneer u, in de routine, somatische varianten in hematologische maligniteiten opspoot op DNA, sequencet u dan een normaal staal van dezelfde patiënt in parallel met het tumorstaal?**

Antwoorden	N
Nee	16
In sommige gevallen, bij verdenking van germline in RUNX1, CEBPA genen	1

**Q11. Wat is de minimum hoeveelheid genomisch DNA vereist in uw laboratorium voor het uitvoeren van een NGS analyse op hematologische maligniteiten?**

Antwoorden	N
0-10ng	3
11-50ng	7
51-100ng	4
101-200ng	1
plus de 201ng	2

**Q12. Welke methode wordt gebruikt voor de kwantificatie van DNA?**

Antwoorden	N
Qubit	9
NanoDrop	4
DropSens	2
Quantus	2

**Q13. Welke richtlijnen worden gebruikt voor de interpretatie van de somatische varianten?**

Antwoorden	N
BELAC 2-405-NGS Rev0-2018	1
BELAC 2-405-NGS Rev1-2019	1
BELAC 2-405-NGS Rev2-2019	16
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)	13
World Health Organization guidelines	10
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)	9
European LeukemiaNet guidelines	9
National Comprehensive Cancer Network Guidelines	7
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)	6

## 2.3. Overzicht van de resultaten

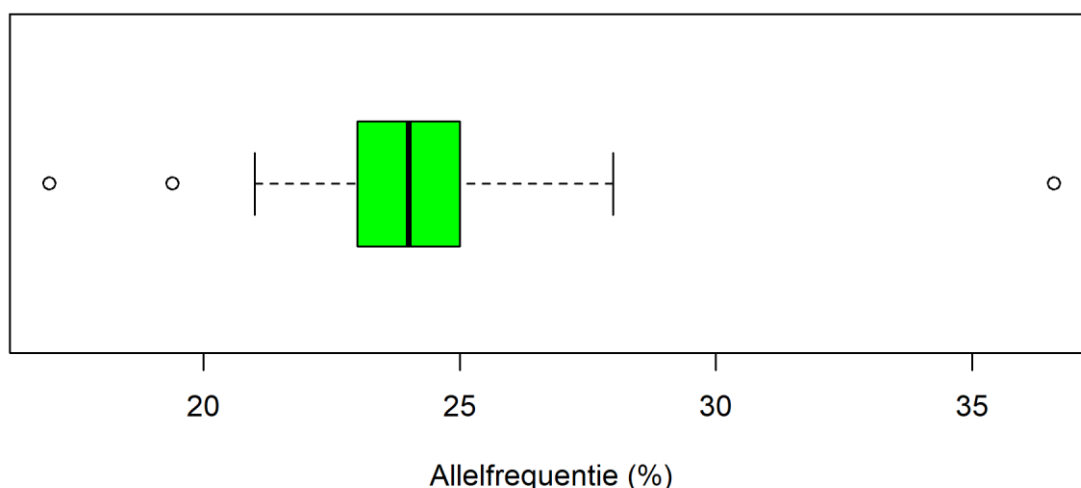
### 2.3.1. NGS-2020-4

geslacht	V
geboortejaar	1963
medische informatie	Myelodysplastisch syndroom EB2 (MDS-EB2)
staaltype	beenmerg

#### Consensus voor te-rapporteren varianten

- [SF3B1 NM\\_012433.3 c.1998G>T p.\(Lys666Asn\)](#)

#### SF3B1 NM\_012433.3 c.1998G>T p.(Lys666Asn)



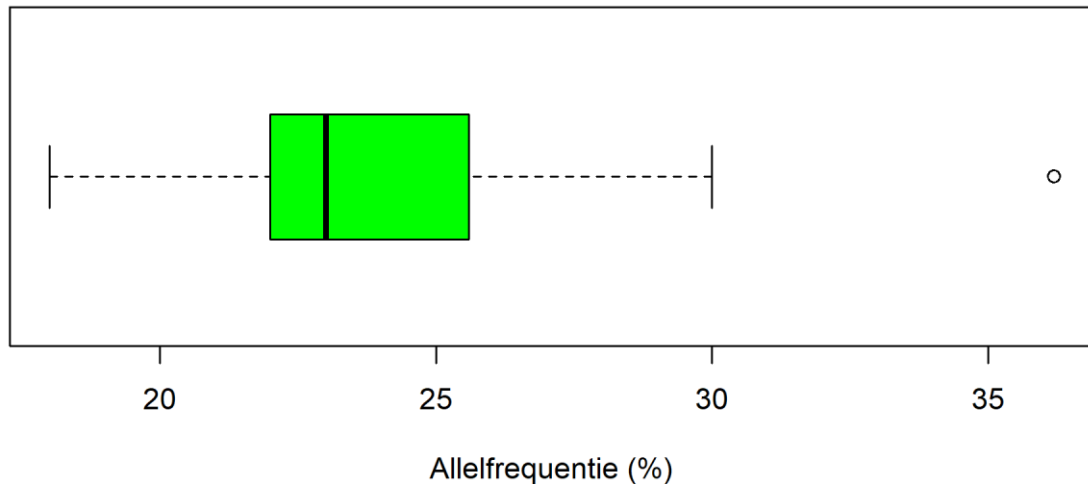
Min	P25	Median	P75	Max	SD
17	23	24	25	36.6	1.48

SF3B1 NM_012433.3 c.1998G>T p.(Lys666Asn) (Mediaan allelfrequentie: 24 %)	
<b>Identificatie van de variant</b>	<b>N</b>
Ja	17
Neen	0
<b>Biologische classificatie</b>	<b>N</b>
Pathogeen	17
Totaal	17
<b>Klinische classificatie</b>	<b>N</b>
Tier I: Significant klinisch belang	17
Totaal	17

**opmerkingen:** Voor dit staal is de bereikte consensus de identificatie van de variant SF3B1 NM\_012433.3; c.1998G>T; p.(Lys666Asn). De nomenclatuur p.Lys666Asn, gerapporteerd door één laboratorium, wordt niet aanbevolen volgens de HGVS richtlijnen. Een ander laboratorium rapporteerde de variant c.1998C>T in plaats van de variant c.1998G>T. Dit betreft waarschijnlijk een fout bij het ingeven van de variant via onze website, aangezien de mutatie correct werd geïdentificeerd in de ruwe data (BAM en VCF) van het betreffende laboratorium. Voor de biologische classificatie, is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie pathogeen. Voor de klinische classificatie is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie Tier I.

- [SF3B1 NM\\_012433.3 c.2098A>G p.\(Lys700Glu\)](#)

### SF3B1 NM\_012433.3 c.2098A>G p.(Lys700Glu)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
18	22	23	25.6	36.2	2.67

SF3B1 NM_012433.3 c.2098A>G p.(Lys700Glu) (Mediaan allelfrequentie: 23 %)	
<b>Identificatie van de variant</b>	<b>N</b>
Ja	17
Neen	0
<b>Biologische classificatie</b>	<b>N</b>
Pathogeen	17
Totaal	17
<b>Klinische classificatie</b>	<b>N</b>
Tier I: Significant klinisch belang	17
Totaal	17

**opmerkingen:** De consensus bereikt voor dit staal is de identificatie van de variant SF3B1 NM\_012433.3; c.2098A>G; p.(Lys700Glu). De nomenclatuur p.Lys700Glu, gerapporteerd door één laboratorium, wordt niet aanbevolen volgens de HGVS richtlijnen. Voor de biologische classificatie, is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie pathogeen. Voor de klinische classificatie is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie Tier I.

### Consensus voor de niet-te-rapporteren varianten

- [ASXL1 NM\\_015338.5 c.2879G>A Trp960\\*](#)

ASXL1 NM_015338.5 c.2879G>A Trp960* (Mediaan allelfrequentie: 9 %)	
<b>Identificatie van de variant</b>	<b>N</b>
Ja	1
Neen	16
<b>Biologische classificatie</b>	<b>N</b>
Vermoedelijk pathogeen	1
Totaal	1
<b>Klinische classificatie</b>	<b>N</b>
Tier II: Mogelijk klinisch belang	1
Totaal	1

**opmerkingen:** Slechts één laboratorium heeft in dit staal de variant ASXL1 NM\_015338.5; c.2879G>A; Trp960\* geïdentificeerd. Deze variant is niet aanwezig in de ruwe data van andere laboratoria. Volgens de consensus, mag deze variant niet worden gerapporteerd. Biologische en klinische classificaties voor deze variant worden niet geëvalueerd. Bovendien herinneren we u eraan dat de HGVS richtlijnen aanbevelen deze nucleotidesequentie als p.(Trp960\*) te beschrijven.

- [EZH2 NM\\_004456.4 c.728delA p.\(Lys243Asnfs\\*22\)](#)

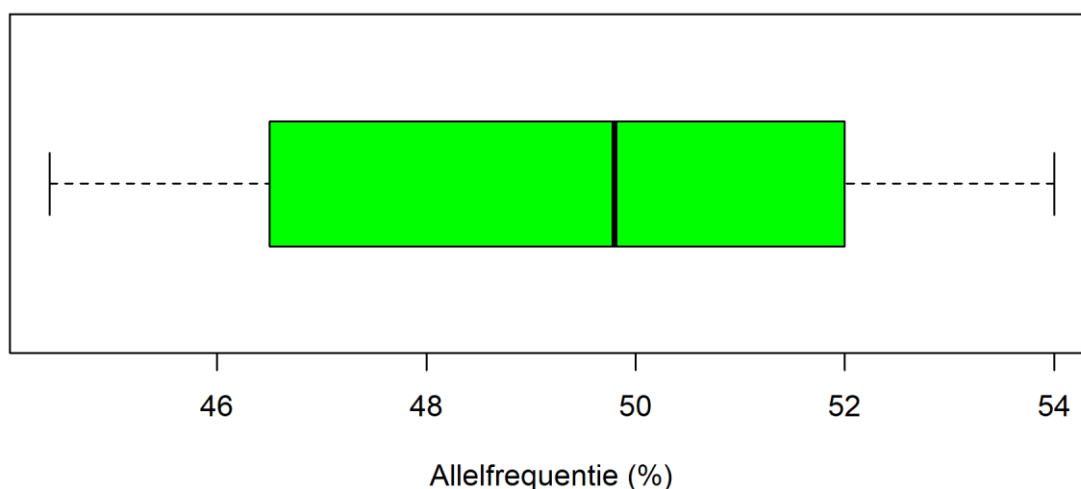
EZH2 NM_004456.4 c.728delA p.(Lys243Asnfs*22) (Mediaan allelfrequentie: 11 %)	
<b>Identificatie van de variant</b>	<b>N</b>
Ja	1
Neen	16
<b>Biologische classificatie</b>	<b>N</b>
VUS	1
Totaal	1
<b>Klinische classificatie</b>	<b>N</b>
Tier III: Ongekende klinische betekenis	1
Totaal	1

**opmerkingen:** Slechts één laboratorium heeft in dit staal de variant EZH2 NM\_004456.4; c.728delA; p.(Lys243Asnfs\*22) geïdentificeerd. Deze variant is niet aanwezig in de ruwe data van andere laboratoria. Volgens de consensus, mag deze variant niet worden gerapporteerd. Biologische en klinische classificaties voor deze variant worden niet geëvalueerd.

#### Niet-geëvalueerde varianten

- [DNMT3A NM\\_175629.2 c.2732G>A p.\(Cys911Tyr\)](#)

#### DNMT3A NM\_175629.2 c.2732G>A p.(Cys911Tyr)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
44.4	46.75	49.8	52	54	3.89

<b>DNMT3A NM_175629.2 c.2732G&gt;A p.(Cys911Tyr) (Mediaan allelfrequentie: 49.8 %)</b>	
<b>Identificatie van de variant</b>	<b>N</b>
Ja	16
Neen	1
<b>Biologische classificatie</b>	<b>N</b>
Vermoedelijk pathogeen	2
VUS	14
Totaal	16
<b>Klinische classificatie</b>	<b>N</b>
Tier I: Significant klinisch belang	1
Tier II: Mogelijk klinisch belang	1
Tier III: Ongekende klinische betekenis	14
Totaal	16

**opmerkingen:** De variant DNMT3A NM\_175629.2; c.2732G>A; p.(Cys911Tyr) is gelinkt aan de genetische achtergrond van de cellijn die werd gebruikt voor de productie van de stalen en is aanwezig in alle 3 de stalen. Om deze reden wordt deze variant niet geëvalueerd. Deze variant werd door een laboratorium geëlimineerd uit de gerapporteerde varianten wegens zijn aanwezigheid in de 3 stalen. Biologische en klinische classificaties voor deze variant worden ter informatie gegeven. De biologische en klinische classificatie door de experts gevalideerd, zijn dus de classificaties VUS en Tier III.

### Analyse van de conclusies

<b>Standaardinformatie</b>	<b>Specifieke informatie van casus 5 en opgenomen in de algemene conclusie door tenminste 2 laboratoria (opmerkingen over DNMT3A niet geëvalueerd)</b>	<b>Laboratoria</b>
Diagnose	SF3B1 varianten recurrent in MDS - mutationeel profiel compatibel met een MDS diagnose	13
	SF3B1 varianten worden vaak geassocieerd met de aanwezigheid van ring sideroblasten (MDS-RS) - mutationeel profiel dat een MDS-RS diagnose suggereert	15
	SF3B1 varianten worden (zelden) waargenomen bij MDS met excess aan blasten (MDS-EB) - Mutationeel profiel compatibel met de diagnose MDS-EB2	4
Prognose	SF3B1 varianten met een gunstige prognose	16
	Geen prognostische waarde aangetoond van de SF3B1 varianten in MDS-EB	4
	SF3B1 p.(Lys666Asn) variant geassocieerd met een verhoogde progressie en een verminderde overleving	2
Therapie	Intensievere therapie voorgesteld wegens de aanwezigheid van de SF3B1 p.(Lys666Asn) variant	2
Informatie over de geteste genen	SF3B1 varianten aanwezig in exon 14 en exon 15	2
Andere	Voorgestelde aanvullende analyses: karyotype, beenmergmorfologie, ijzerkleuring, hematologische parameters, etc.	2

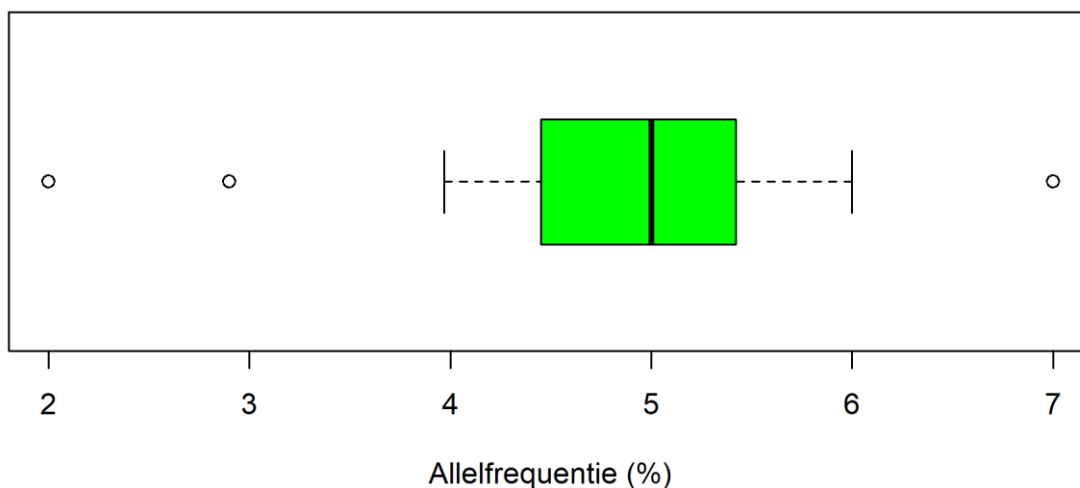
2.3.2. NGS-2020-5

geslacht	M
geboortejaar	1968
medische informatie	Acute myeloïde leukemie (AML)
staaltype	beenmerg

**Consensus voor te-rapporteren varianten**

- [FLT3 NM\\_004119.2 c.2503G>T p.\(Asp835Tyr\)](#)

**FLT3 NM\_004119.2 c.2503G>T p.(Asp835Tyr)**



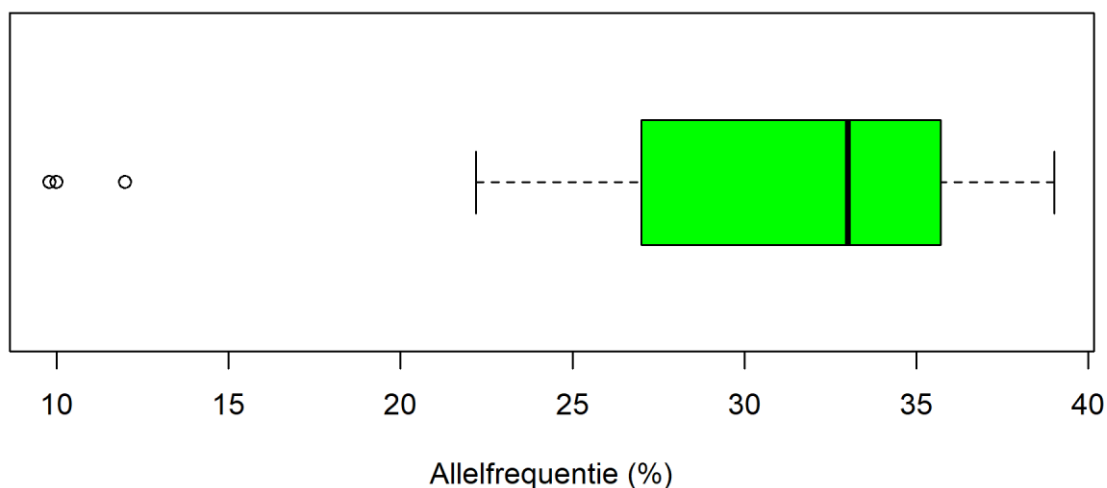
Min	P25	Median	P75	Max	SD
2	4.45	5	5.42	7	0.72

FLT3 NM_004119.2 c.2503G>T p.(Asp835Tyr) (Mediaan allelfrequentie: 5 %)	
<b>Identificatie van de variant</b>	<b>N</b>
Ja	15
Neen	2
<b>Biologische classificatie</b>	<b>N</b>
Pathogeen	15
Totaal	15
<b>Klinische classificatie</b>	<b>N</b>
Tier I: Significant klinisch belang	14
Tier II: Mogelijk klinisch belang	1
Totaal	15

**opmerkingen:** Voor dit staal is de bereikte consensus de identificatie van de variant FLT3 NM\_004119.2; c.2503G>T; p.(Asp835Tyr). Twee laboratoria hebben deze variant met een mediane allelfrequentie van 5% niet gerapporteerd. Deze laboratoria hebben een detectielimiet van 5% vastgelegd voor SNV. De allelfrequentie van de mutatie ligt op hun detectielimiet. Voor de biologische classificatie, is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie pathogeen. Voor de klinische classificatie is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie Tier I. De classificatie Tier II wordt als niet-aanvaardbaar beschouwd gezien het zeer hoge bewijsniveau van deze variant.

- [NPM1 NM\\_002520.6 c.860\\_863dup p.\(Trp288Cysfs\\*12\)](#)

### NPM1 NM\_002520.6 c.860\_863dup p.(Trp288Cysfs\*12)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
9.8	27	33	35.7	39	6.45

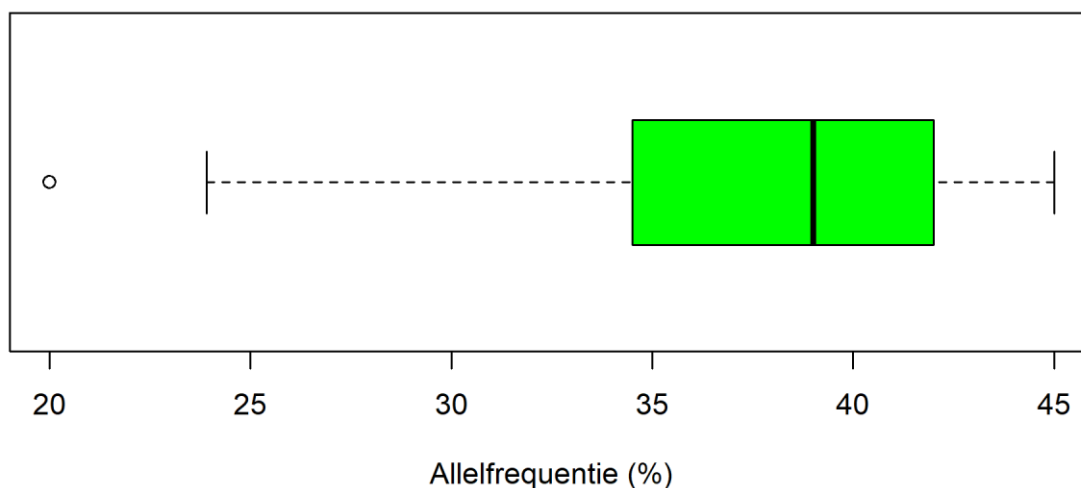
NPM1 NM_002520.6 c.860_863dup p.(Trp288Cysfs*12) (Mediaan allelfrequentie: 33 %)	
<b>Identificatie van de variant</b>	<b>N</b>
Ja	17
Neen	0
<b>Biologische classificatie</b>	<b>N</b>
Pathogeen	17
Totaal	17
<b>Klinische classificatie</b>	<b>N</b>
Tier I: Significant klinisch belang	17
Totaal	17

**opmerkingen:** De consensus bereikt voor dit staal is de identificatie van de variant NPM1 NM\_002520.6; c.860\_863dup; p.(Trp288Cysfs\*12). Betreffende DNA-referenties: de nomenclatuur c.860\_863dupTCTG, gerapporteerd door 6 laboratoria, wordt niet aanbevolen volgens de HGVS richtlijnen. Deze beschrijving is langer, bevat overbodige informatie en verhoogt de kans op fouten. Betreffende eiwitreferenties: de nomenclatuur Trp288Cysfs\*12, gerapporteerd door één laboratorium, wordt niet aanbevolen volgens de HGVS richtlijnen. De nomenclatuur p.(Trp288Cysfs?\*12), gerapporteerd door één laboratorium, is niet geldig volgens de HGVS richtlijnen. De nomenclatuur p.(Trp288Cysfs\*?), gerapporteerd door 2 laboratoria, betekent dat de voorspelde frameshift-sequentie niet leidt tot het tegenkomen van een prematuur stopcodon, in tegenstelling tot de verwachte nomenclatuur die het tegenkomen van een stopcodon na 12 aminozuren voorziet. Deze nomenclatuur is niet correct. Voor de biologische classificatie, is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie pathogeen. Voor de klinische classificatie is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie Tier I.



- [ASXL1 NM\\_015338.5 c.1934dup p.\(Gly646Trpfs\\*12\)](#)

### ASXL1 NM\_015338.5 c.1934dup p.(Gly646Trpfs\*12)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
20	34.75	39	42	45	5.37

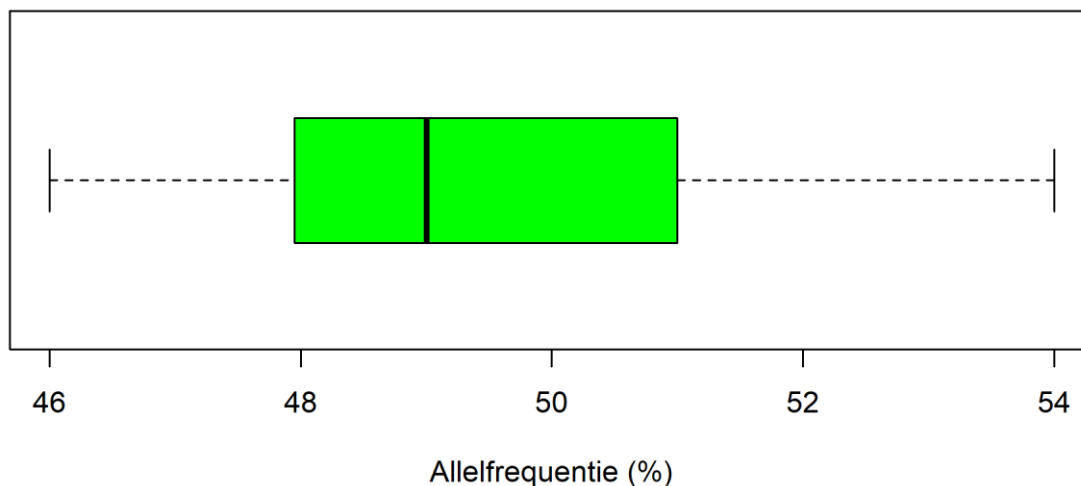
ASXL1 NM_015338.5 c.1934dup p.(Gly646Trpfs*12) (Mediaan allelfrequentie: 39 %)	
<b>Identificatie van de variant</b>	<b>N</b>
Ja	16
Neen	1
<b>Biologische classificatie</b>	<b>N</b>
Pathogeen	3
Vermoedelijk pathogeen	13
Totaal	16
<b>Klinische classificatie</b>	<b>N</b>
Tier I: Significant klinisch belang	10
Tier II: Mogelijk klinisch belang	6
Totaal	16

**opmerkingen:** De consensus bereikt voor dit staal is de identificatie van de variant ASXL1 NM\_015338.5; c.1934dup; p.(Gly646Trpfs\*12). Slechts één laboratorium heeft deze variant niet gerapporteerd, ondanks de aanwezigheid ervan in de ruwe data van het betreffende laboratorium (VCF file). Een ander laboratorium rapporteerde de variant c.1941dupG in plaats van de variant c.1934dup. Dit betreft waarschijnlijk een fout bij het ingeven van de variant via onze website, aangezien de mutatie correct werd geïdentificeerd in de ruwe data (BAM en VCF) van het betreffende laboratorium. Betreffende DNA-referenties: de nomenclatuur c.1934dupG, gerapporteerd door 8 laboratoria, wordt niet aanbevolen volgens de HGVS richtlijnen. Deze beschrijving is langer, bevat overbodige informatie en verhoogt de kans op fouten. Betreffende eiwitreferenties: de nomenclatuur p.Gly646Trpfs\*12, gerapporteerd door één laboratorium, wordt niet aanbevolen volgens de HGVS richtlijnen. De nomenclatuur p.(Gly646TrpFs\*?12), gerapporteerd door één laboratorium, is niet geldig volgens de HGVS richtlijnen. Voor de biologische classificatie, is het verwachte resultaat voor deze variant vermoedelijk pathogeen. In de Belgische richtlijnen: een Loss-of-Function (LoF) van het type frameshift in een Tumor Suppressor (TS) gen is geclassificeerd als vermoedelijk pathogeen. De classificatie pathogeen wordt als niet-aanvaardbaar beschouwd. De frameshifts in het gen ASXL1 zijn niet aanwezig in de tabel 'Consensus pathogenic variants (CPV) Solid / Myeloid list'. Deze regels zullen bij de volgende herziening van de richtlijnen gehandhaafd blijven. Voor de klinische classificatie, is er geen consensus tussen de laboratoria. De classificaties Tier I en Tier II werden niet geëvalueerd door de experts vanwege het ontbreken van duidelijke richtlijnen voor de classificaties van de prognostische varianten.

## Niet-geëvalueerde varianten

- DNMT3A NM\_175629.2 c.2732G>A p.(Cys911Tyr)

### DNMT3A NM\_175629.2 c.2732G>A p.(Cys911Tyr)



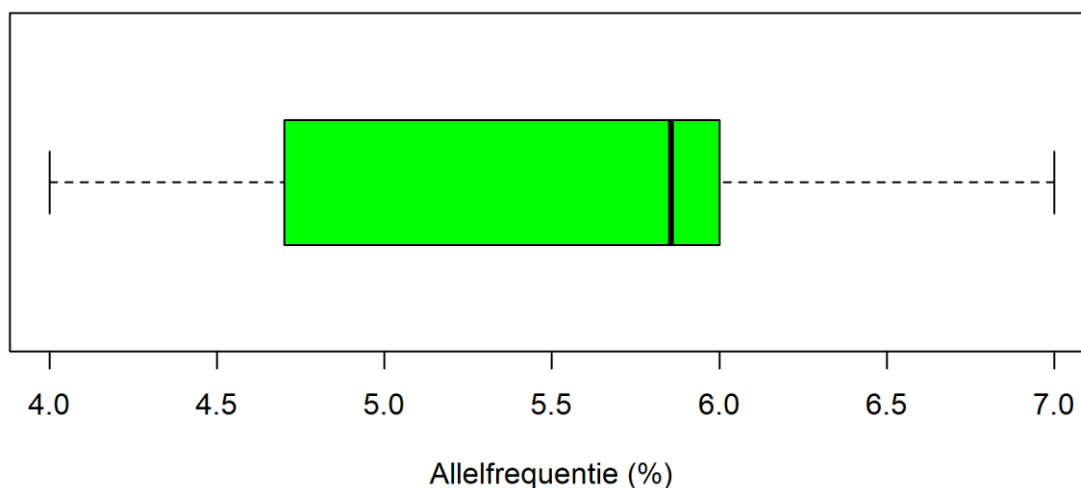
Min	P25	Median	P75	Max	SD
46	47.98	49	51	54	2.24

DNMT3A NM_175629.2 c.2732G>A p.(Cys911Tyr) (Mediaan allelfrequentie: 49.8 %)	
<b>Identificatie van de variant</b>	<b>N</b>
Ja	16
Neen	1
<b>Biologische classificatie</b>	<b>N</b>
Vermoedelijk pathogeen	2
VUS	14
Totaal	16
<b>Klinische classificatie</b>	<b>N</b>
Tier I: Significant klinisch belang	1
Tier II: Mogelijk klinisch belang	1
Tier III: Ongekende klinische betekenis	14
Totaal	16

**opmerkingen:** De variant DNMT3A NM\_175629.2; c.2732G>A; p.(Cys911Tyr) is gelinkt aan de genetische achtergrond van de cellijn die werd gebruikt voor de productie van de stalen en is aanwezig in alle 3 de stalen. Om deze reden wordt deze variant niet geëvalueerd. Deze variant werd door een laboratorium geëlimineerd uit de gerapporteerde varianten wegens zijn aanwezigheid in de 3 stalen. Biologische en klinische classificaties voor deze variant worden ter informatie gegeven. De biologische en klinische classificatie door de experts gevalideerd, zijn dus de classificaties VUS en Tier III.

- NPM1 NM\_002520.6 c.859delinsGTCTG p.(Leu287Valfs\*13)

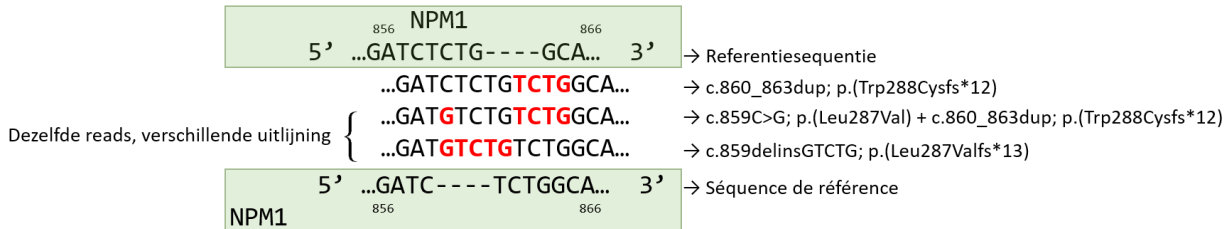
### NPM1 NM\_002520.6 c.859delinsGTCTG p.(Leu287Valfs\*13)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
4	4.73	5.86	6	7	0.95

NPM1 NM_002520.6 c.859delinsGTCTG p.(Leu287Valfs*13) (Mediaan allelfrequentie: 5.86 %)	
<b>Identificatie van de variant</b>	<b>N</b>
Ja	10
Neen	7
<b>Biologische classificatie</b>	<b>N</b>
Pathogeen	9
Vermoedelijk pathogeen	1
Totaal	10
<b>Klinische classificatie</b>	<b>N</b>
Tier I: Significant klinisch belang	8
Tier II: Mogelijk klinisch belang	2
Totaal	10

**opmerkingen:** De variant NPM1 NM\_002520.6; c.859delinsGTCTG werd gerapporteerd door 10 laboratoria. 7 laboratoria rapporteerden deze variant met de eiwitreferentie p.(Leu287Valfs\*13), één laboratorium met de referentie Leu287Valfs\*13, één laboratorium met de referentie p.(Leu287Valfs\*14) en één laboratorium met de referentie p.(Leu287Valfs\*?). Na bio-informatica analyse kan deze variant ook overeenkomen met de combinatie van de twee varianten afzonderlijk beschreven als NPM1 NM\_002520.6; c.859C>G; p.(Leu287Val) en NPM1 NM\_002520.6; c.860\_863dup; p.(Trp288Cysfs\*12). Aangezien deze twee varianten op dezelfde reads aanwezig zijn, kunnen ze ook in één gemeenschappelijke nomenclatuur worden gerapporteerd. De HGVS nomenclatuur beveelt aan om twee varianten gescheiden door 1 of meer nucleotiden afzonderlijk te beschrijven en niet als "delins". In de beschrijving c.(859C> G; 860\_863dup) is de afstand tussen de 2 varianten kleiner dan 1. Afhankelijk van hoe de uitlijning wordt uitgevoerd, kan de afstand tussen deze twee varianten echter ook als 4 nucleotiden worden beschouwd (zie figuur blz.20). De HGVS nomenclatuur is momenteel onduidelijk op dit punt. Vanwege de dubbelzinnigheid in de annotatie van deze variant, hebben de experts besloten deze niet te evalueren. Biologische en klinische classificaties voor deze variant worden ter informatie gegeven.



Figuur die demonstreert hoe de twee types reads aligneren tegen de referentiesequentie van het NPM1 gen in de ruwe data bestanden van alle labs, met hun corresponderende HGVS annotatie.

- NPM1 NM\_002520.6 c.859C>G p.(Leu287Val)

NPM1 NM_002520.6 c.859C>G p.(Leu287Val) (Mediaan allelfrequentie: 6.7%)	
<b>Identificatie van de variant</b>	<b>N</b>
Ja	3
Neen	14
<b>Biologische classificatie</b>	<b>N</b>
Pathogeen	1
VUS	2
Totaal	3
<b>Klinische classificatie</b>	<b>N</b>
Tier I: Significant klinisch belang	1
Tier III: Ongekende klinische betekenis	2
Totaal	3

**opmerkingen:** In dit staal identificeerden slechts 3 laboratoria de variant NPM1 NM\_002520.6; c.859C>G; p.(Leu287Val) correct. Na analyse van de uitlijning van de reads van deze laboratoria is deze variant aanwezig in hun ruwe data (BAM en VCF) en in de data van alle andere deelnemers. 10 andere laboratoria rapporteerden deze variant gecombineerd met de variant NPM1 NM\_002520.6; c.860\_863dup; p.(Trp288Cysfs\*12) onder de referentie NPM1 NM\_002520.6; c.859delinsGTCTG; p.(Leu287Valfs\*13). Aangezien deze twee varianten op dezelfde reads aanwezig zijn, kunnen ze inderdaad ook in één gemeenschappelijke nomenclatuur worden gerapporteerd. De HGVS nomenclatuur beveelt aan om twee varianten gescheiden door 1 of meer nucleotiden afzonderlijk te beschrijven en niet als "delins". In de beschrijving c.(859C>G; 860\_863dup) is de afstand tussen de 2 varianten kleiner dan 1. Afhankelijk van hoe de uitlijning wordt uitgevoerd, kan de afstand tussen deze twee varianten echter ook als 4 nucleotiden worden beschouwd (zie figuur hierboven). De HGVS nomenclatuur is momenteel onduidelijk op dit punt. Vanwege de dubbelzinnigheid in de annotatie van deze variant, hebben de experts besloten deze niet te evalueren. Biologische en klinische classificaties voor deze variant worden ter informatie gegeven.

## Analyse van de conclusies

Standaardinformatie	Specifieke informatie van casus 6 en opgenomen in de algemene conclusie door tenminste 2 laboratoria (opmerkingen over DNMT3A niet geëvalueerd)	Laboratoria
Diagnose	Mutationeel profiel compatibel met een AML diagnose	12
	Aparte diagnostische entiteit in de WHO-classificatie: 'AML with NPM1 mutated'	9
	Aanwezigheid van ASXL1 varianten indicatief voor secundaire AML	3
Prognose	gunstige prognose door NPM1 variant in afwezigheid van FLT3-ITD variant	13
	Extra gunstige prognose door NPM1 variant in aanwezigheid van FLT3-TKD variant	5
	Ongunstige prognose door ASXL1 variant - potentieel negatief effect op de prognose door de aanwezigheid van ASXL1 variant	12
	Geen invloed op de gunstige prognose door NPM1 variant in aanwezigheid van ASXL1 variant	3
	ongunstige prognose door FLT3-TKD variant	3
Therapie	Gevoeligheid aan FLT3 tyrosine kinase inhibitoren gelinkt aan de aanwezigheid van FLT3-TKD variant	13
	Potentiële resistentiemechanismen tegen sommige inhibitoren - Geen effect van type II tyrosine kinase inhibitoren	3
Informatie over de geteste genen	NPM1 type A variant	4
	FLT3-TKD variant aanwezig in exon 20	2
	NPM1 variant met insertie in exon 11	2
	Aanwezigheid van een kleine FLT3-TKD+ subclon	2
Andere	Voorgestelde aanvullende analyses: FLT3-ITD onderzoek met een onafhankelijke methode, cytogenetische analyse, bevestiging van varianten met VAF <5%	3

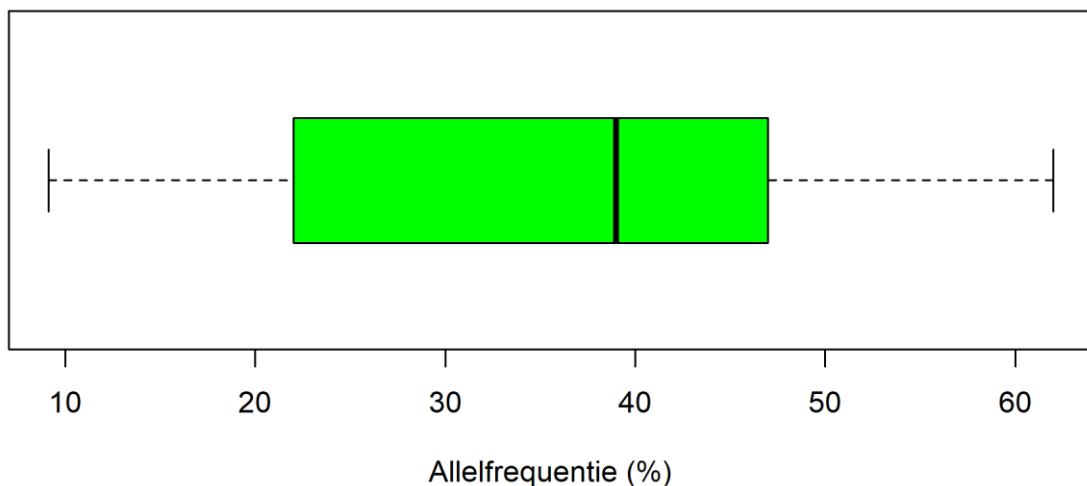
### 2.3.3. NGS-2020-6

geslacht	M
geboortejaar	1947
medische informatie	Primaire myelofibrose (PMF)
staaltype	beenmerg

#### Consensus voor te-rapporteren varianten

- [CALR NM\\_004343.3 c.1099\\_1150del p.\(Leu367Thrfs\\*46\)](#)

#### CALR NM\_004343.3 c.1099\_1150del p.(Leu367Thrfs\*46)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
9.13	22	39	47	62	18.53

CALR NM_004343.3 c.1099_1150del p.(Leu367Thrfs*46) (Mediaan allelfrequentie: 39 %)	
<b>Identificatie van de variant</b>	<b>N</b>
Ja	17
Neen	0
<b>Biologische classificatie</b>	<b>N</b>
Pathogeen	17
Totaal	17
<b>Klinische classificatie</b>	<b>N</b>
Tier I: Significant klinisch belang	17
Totaal	17

**opmerkingen:** De consensus bereikt voor dit staal is de identificatie van de variant CALR NM\_004343.3; c.1099\_1150del; p.(Leu367Thrfs\*46). Betreffende DNA-referenties: de nomenclatuur c.1099\_1150del52, gerapporteerd door één laboratorium, is niet geldig volgens de HGVS richtlijnen. Een ander laboratorium rapporteerde de variant c.1092\_1143del in plaats van de variant c.1099\_1150del. Inderdaad, een identieke sequentie van 7 nucleotiden, aanwezig aan het begin en onmiddellijk na de 52 bp-deletie, maakt het mogelijk de deletie in de positie 1092 uit te lijnen. Deze nomenclatuur is echter niet correct volgens de HGVS richtlijnen, vanwege de 3' beschrijvingsregel van de referentie sequentie. Betreffende eiwitreferenties: de nomenclatuur p.(Leu367ThrfsTer46), gerapporteerd door één laboratorium, wordt niet aanbevolen volgens de Belgische richtlijnen. De nomenclatuur p.(Leu367Thrfs?46), gerapporteerd door één laboratorium, is niet geldig volgens de HGVS richtlijnen. De nomenclatuur p.(Leu367Thrfs\*),

gerapporteerd door 2 laboratoria, betekent dat de voorspelde frameshift-sequentie niet leidt tot het tegenkomen van een prematuur stopcodon, in tegenstelling tot de verwachte nomenclatuur die het tegenkomen van een stopcodon na 46 aminozuren voorziet. Deze nomenclatuur is niet correct. Voor de biologische classificatie, is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie pathogeen. Voor de klinische classificatie is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie Tier I.

### Consensus voor de niet-te-rapporteren varianten

- [CALR NM\\_004343.3 c.1144delG p.\(Ala382Glnfs\\*48\)](#)

CALR NM_004343.3 c.1144delG p.(Ala382Glnfs*48) (Mediaan allelfrequentie: 31.4 %)	
<b>Identificatie van de variant</b>	<b>N</b>
Ja	1
Neen	16
<b>Biologische classificatie</b>	<b>N</b>
Pathogeen	1
Totaal	1
<b>Klinische classificatie</b>	<b>N</b>
Tier I: Significant klinisch belang	1
Totaal	1

**opmerkingen:** Slechts één laboratorium heeft in dit staal de variant CALR NM\_004343.3; c.1144delG; p.(Ala382Glnfs\*48) geïdentificeerd. Een foute alignment van de reads werd waargenomen in de ruwe data van het betrokken laboratorium. Dit is een technische fout te wijten aan de bioinformatics-workflow. Deze variant komt eigenlijk overeen met de consensus variant c.1099\_1150del; p.(Leu367Thrfs\*46). Volgens de consensus, mag deze variant niet worden gerapporteerd. Biologische en klinische classificaties voor deze variant worden niet geëvalueerd. Bovendien herinneren we u eraan dat voor deleties de HGVS richtlijnen aanbevelen om de verwijderde nucleotidesequentie niet te beschrijven (c.1144del in plaats van c.1144delG).

### Analyse van de conclusies

Standaardinformatie	Specifieke informatie van casus 7 en opgenomen in de algemene conclusie door tenminste 2 laboratoria	Laboratoria
Diagnose	CALR variant recurrent in MPN type PMF en ET - Mutationeel profiel compatibel met een MPN, PMF en ET diagnose	16
Prognose	In PMF, gunstige prognose door CALR (type 1) variant - gunstiger dan JAK2, MPL, triple-negatieve varianten of CALR type 2 variant	16
	Toename risico op transformatie naar myelofibrose gelinkt met CALR variant (in ET)	2
	Geïntegreerde prognostische modellen voor PMF: MIPSS70 en GIPSS risicoscores	4
Informatie over de geteste genen	CALR type 1 variant	15
	CALR variant met deletie in exon 9	3
Andere	Voorgestelde aanvullende analyses nodig voor MIPSS70 en GIPSS risicoscores: karyotype, hematologische parameters, etc.	2

#### 2.3.4. Slaagpercentage van de deelnemers

##### Consensus voor de te-rapporteren varianten

Slaagpercentage gebaseerd op consensus voor de te-rapporteren varianten	N
6/6 (100%)	14
5/6 (83,33%)	3
<b>Totaal slaagpercentage: 99/102 (97,06%)</b>	

##### Consensus voor de niet-te-rapporteren varianten

Drie varianten werden gerapporteerd door minder dan een derde van de deelnemers en werden in de categorie van niet-te-rapporteren varianten geclassificeerd. Deze drie varianten worden gerapporteerd door drie verschillende laboratoria.

##### Biologische en klinische classificaties

Slaagpercentage van deelnemers voor de classificaties voor de consensus voor de te-rapporteren varianten *	N
<b>Biologische classificaties *</b>	
6/6 of 5/5 (100%)	17
<b>Totaal slaagpercentage: - biologische classificaties : 99/99 (100%)</b>	
<b>Klinische classificaties</b>	
5/5 of 4/4 (100%)	16
4/5 (80%)	1
<b>Totaal slaagpercentage: - klinische classificaties : 82/83 (98,80%)</b>	

\* 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/20202/> en werden hieruit geëxtraheerd. Om geen vertaalfouten te introduceren, werden de conclusies in de taal van het laboratorium behouden.

##### 3.1.1. NGS-2020-4

<p>Varianten in SF3B1, zoals de gedetecteerde hotspotmutaties c.2098A&gt;G (p.(Lys700Glu)) en c.1998G&gt;T (p.(Lys666Asn)), zijn recurrent in myelodysplastisch syndroom en worden geassocieerd met een gunstige prognose. SF3B1 varianten worden sterk geassocieerd met MDS met ring sideroblasten. (Malcovati et al., 2020 SF3B1-mutant MDS as a distinct disease subtype: a proposal from the International Working Group for the Prognosis of MDS. Blood 136: 1578-170.)</p> <p>De biologische en klinische betekenis van de variant c.2732G&gt;A (p.(Cys911Tyr)) is niet gekend (VUS, variant of unknown significance).</p>	1
<p>De gevonden varianten in het gen SF3B1 zijn recurrent in de context van MDS (vaak geassocieerd met de aanwezigheid van ring sideroblasten). De aanwezigheid van een variant in het SF3B1 gen wordt geassocieerd met een gunstige prognose (Ref: Swerdlow et al., WHO 2017; Kennedy and Ebert, J Clin Onc 2017. 35(9):968-974).</p>	2
<p>Mutaties in SF3B1 komen vooral voor in MDS en zijn geassocieerd met ringsideroblasten (80-90%) en een betere prognose (Patnaik et al., AJH 2016; NCCN MDS guidelines 1.2020).</p>	3
<p>Aanwezigheid van 2 pathogene SF3B1 varianten, geassocieerd met MDS RARS of RCMD-RS (81%). Wijst op betere overleving en del(5q).</p>	4
<p>Er werd een SF3B1 (NM_012433.3(SF3B1):c.1998G&gt;T (p.(Lys666Asn)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 14. Er werd een SF3B1 (NM_012433.3(SF3B1):c.2098A&gt;G (p.(Lys700Glu)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 15. De aanwezigheid van dit type varianten heeft significant klinische betekenis in MDS (tier I). SF3B1 mutaties komen voor in 80-90% van de MDS-RS-SLD cases en zijn geassocieerd met een betere prognose (PMID: 25957392, 32347921 WHO p. 110, NCCN guidelines MDS). SF3B1 varianten samen met eventuele additionele mutaties in TET2 of DNMT3A varianten zijn ook frequenter bij MDS-RS MLD dan in MDS-RS SLD (PMID: 25957392, WHO). Er is echter ook een verhoogde kans op progressie naar AML in aanwezigheid van een SF3B1 variant (PMID: 29988143).</p> <p>Er werden geen andere (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in het STHT myeloïde subpaneel (inclusief TET2, SRSF2, ASXL1, DNMT3A, RUNX1, U2AF1, TP53 en EZH2). Daarnaast werd ook 1 variant met ongekende biologische en klinische betekenis geïdentificeerd in DNMT3A, cfr tabel.</p>	5
<p>Présence de variants des gènes SF3B1 et ASXL1.</p> <p>Les variants SF3B1 sont retrouvés dans 20-30% des syndromes myélodysplasiques (MDS) et constituent les atteintes cardinales des syndromes myélodysplasiques avec sidéroblastes en anneaux (MDS-RS) et des syndromes mixtes avec sidéroblastes en anneaux et thrombocytose (MDS/MPN-RS-T).1,2 Dans ces 2 entités, ces variants sont présents dans &gt;80% des cas. Dans les syndromes myélodysplasiques au sens large, la présence de variants du gène SF3B1 est associée à un bon pronostic et un risque moindre de transformation en leucémie aigüe.1,2,3 A ce titre, le statut mutationnel du gène SF3B1 est inclus dans le score pronostique des SMD de la Taussing Cancer Institute (score incluant l'âge, le score IPPS-R et les statuts SF3B1, TP53 et EZH2.3</p> <p>Les variants du gène ASXL1 sont retrouvés dans 15-25% des syndromes myélodysplasiques.1 Ces variants sont indépendamment associés à une péjoration du pronostic dans les toutes les pathologies myéloïdes.1</p> <p>En conclusion, ce patient présente un profil moléculaire suggestif de syndrome myélodysplasique de type MDS-RS en évolution. En cas de transformation leucémique secondaire, ce profil serait associé à un pronostic péjoratif.1,4</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. NCCN Guidelines Version 1.2021 Myelodysplastic Syndromes</li> <li>2. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. D. Arber et al. Blood 2016</li> <li>3. Incorporation of molecular data into the Revised International Prognostic Scoring System in treated patients with myelodysplastic syndromes. A. Nazha et al. Leukemia. 2016</li> <li>4. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. E. Papaemmanuil. 2016</li> </ol>	6

<p>In deze casus worden 2 varianten gevonden in het SF3B1 gen, beiden Tier klasse I, significant klinisch belang.</p> <p>In de globale ziekte-entiteit MDS zijn varianten in het spliceome gen SF3B1 aanwezig in 20-30% van de gevallen en hangen ze samen met een eerder gunstige prognose. Varianten in SF3B1 gaan specifiek gepaard met het ontstaan van ringsideroblasten.</p> <p>Recente literatuur suggereert de SF3B1 gemuteerde MDS als aparte entiteit te beschouwen, op basis van risico stratificatie en therapeutische implicaties (zie Malcovati et al.), al lijkt deze gunstige invloed niet meer van toepassing in de ziekte fase MDS-EB2 cfr huidige casus.</p> <p>Daarnaast wordt een variant in het DNMT3A gen gevonden. Deze wordt beschouwd als Tier klasse I, significant klinisch belang.</p> <p>Varianten in DNMT3A zijn vaak voorkomend bij MDS (ongeveer 10-15% van de gevallen), waarbij ze geassocieerd zijn met een verminderde prognose. Voorzichtigheid is echter wel geboden, aangezien varianten in DNMT3A evenwel ook voorkomen in een normale oudere populatie.</p> <p>Referenties</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Arber et al. Blood 2016;127:2391-4052</li> <li>2. Malcovati et al. Blood 2015;126:233-41</li> <li>3. Patnaik et al. Am J Hematol 2015;90:549-59</li> <li>4. Cazzola et al. Blood 2013;121:260-9</li> <li>5. Bejar et al. Haematologica 2014;99:956-64</li> <li>6. Haferlach et al. Leukemia 2014;28:241-7</li> <li>7. Malcovati et al. Blood 2020;136:157-70</li> </ol>	7
<p>NGS analyse toont de aanwezigheid van 2 varianten met significant klinisch belang (TIER I):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- SF3B1 c.2098A&gt;G p.(Lys700Glu) (allel frequency 26%) en</li> <li>- SF3B1 c.1998G&gt;T p.(Lys666Asn) (allel frequency 21%)</li> </ul> <p>Deze mutaties komen in 20-30% van de patiënten met MDS voor en zijn geassocieerd met de aanwezigheid van ringsideroblasten en met een gunstige prognose (WHO revised 4th edition; LYON 2017). Recent werd beschreven dat SF3B1 p.(Lys666Asn) geassocieerd is met hoog-risico MDS, transformatie naar AML, trombocytopenie en gedaalde overleving. Dit impliceert dat deze groep patiënten een agressievere behandeling nodig hebben, zeker bij een lage IPSS-R categorie (PMID 32211880).</p> <p>Verder werd een variant met onduidelijke klinische betekenis (VUS) in het DNMT3A gen gedetecteerd.</p>	8
<p>Klinische indicatie: MDS-EB2</p> <p>NGS toont aanwezigheid aan van varianten in de genen SF3B1 en DNMT3A:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Twee gekende, consensus pathogene varianten in het SF3B1 gen (Lys666Asn met VAF 23% en Lys700Glu met VAF 20%): SF3B1 varianten worden teruggevonden bij ongeveer 10% van de patiënten met MDS-EB (6% MDS-EB-1 en 4% MDS-EB-2). In tegenstelling tot de andere MDS sub-categoriën is er geen positief effect op de algemene overleving of het risico op ziekte progressie bij MDS-EB patiënten (Malcovati et al., Blood 2020).</li> <li>2) Een missens variant-met-onbekende-betekenis (VUS) in het DNMT3A gen (VAF 50%): het effect van de variant op de eiwit functie is niet duidelijk waardoor er ook geen evaluatie kan gemaakt worden i.v.m. de klinische impact van deze variant.</li> </ol> <p>Er konden geen varianten met een VAF &gt;5% teruggevonden worden in de andere bij MDS belangrijke genen (ASXL1, EZH2, RUNX1, SRSF2, TET2, TP53 en U2AF1 (opmerking: wegens sub-optimale coverage van de gen regio overeenkomend met AZ Asp33 tot Gly50 in RUNX1 en AZ Met1 tot Glu82 in EZH2 kunnen varianten in dit gebied gemist worden)).</p> <p>Besluit:</p> <p>NGS profiel in overeenstemming met aanwezigheid van MDS-EB-2.</p> <p>Gezien ontbreken van karyotype en hematologische parameters is het niet mogelijk om de IPSS-R risico analyse en de mogelijke impact van varianten op deze classificatie zoals beschreven door verschillende groepen te evalueren (Hou et al., Blood Cancer Journal 2018, Tefferi A. et al. Am J Hematol 2017, NCCN guideline v2.2020).</p> <p>Ook het geïntegreerd moleculair/klinisch prognostisch model 'Mayo Alliance Prognostic Model for MDS' kan hierdoor niet worden toegepast (Tefferi et al., 2018 Mayo Clin Proc.).</p>	9

<p>Er werden twee pathogene mutaties in het SF3B1 gen geïdentificeerd: SF3B1 c.1998G&gt;T p.(Lys666Asn) en SF3B1 c.2098A&gt;G p.(Lys700Glu). Deze mutaties hebben een significant klinisch belang (Tier I). Dit zijn recurrente mutaties in de context van myelodysplastisch syndroom (MDS). SF3B1 mutaties komen voor in 20-30 % van de gevallen van MDS, zijn vaak geassocieerd met de aanwezigheid van ringsideroblasten en zijn in de meeste studies geassocieerd met een betere prognose [1, 2]. Specifiek voor de SF3B1 p.(Lys666Asn) mutatie is er echter recente evidentie voor een associatie met verhoogde progressie van MDS en verminderde overleving, wat een argument zou kunnen vormen voor een meer intensieve behandeling dan bij MDS met andere SF3B1 mutaties [3]. Daarnaast werd een variant van onduidelijke betekenis (VUS) gedetecteerd: DNMT3A c.2732G&gt;A p.(Cys911Tyr). Aan deze variant kunnen momenteel geen klinische implicaties gekoppeld worden (Tier III: ongekende klinische betekenis).</p> <p>Referenties:  1. Swerdlow SH et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (revised 4th edition). IARC: Lyon 2017.  2. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: myelodysplastic syndromes, version 1.2021.  3. PMID 32211880.</p>	10
<p>Les mutations des éléments du spliceosome ont été rapportées dans les MDS de type SMD-RS ainsi que dans les MDS/MPN de type SMD/NMP-RS-T.  La prévalence est de 20-30% dans les SMD.  La mise en évidence de mutation de SF3B1 est associée à une VPP d'un phénotype associé à la présence de sidéroblastes annulaires de 97.7%, l'inverse étant également vrai pour la VPN.  Pour les cas sans mutation de SF3B1, un minimum de 15% de sidéroblastes médullaires est requis pour retenir le diagnostic.  A contrario, le diagnostic de SMD-RS peut-être posé en cas d'identification d'une mutation de SF3B1 dès le seuil de 5% de sidéroblastes annulaires dépassés.  Association classique avec un pronostic favorable. Toutefois, Tang et al. n'ont pu mettre en évidence d'impact sur l'OS (Tang et al., Crit Rev in Oncology / Hematology 133 (2019).  Critical Reviews in Oncology/Hematology 133 · August 2018. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2018.07.013</p>	11
<p>- DNMT3A (NM_175629.2) : Variant probablement pathogène selon les bases de données pour ce gène repris dans la convention NGS. Mutation missense au niveau de l'exon 23 de ce gène suppresseur de tumeurs conférant un pronostic défavorable en cas de syndrome myélodysplasique.  - SF3B1 (NM012433.3) : Variants pathogènes repris dans la convention NGS. Mutations missense au niveau de l'exon 14 et 15 respectivement, conférant un pronostic favorable en cas de syndrome myélodysplasique.  Résultats compatibles avec un syndrome myélodysplasique avec excès de blastes 2 de pronostic défavorable.</p>	12
<p>SF3B1 mutaties komen frequent (20-30%) voor bij MDS, echter deze worden zelden waargenomen bij MDS met excess aan blasten (CAVE: deze worden ook waargenomen bij MDS/MPN en CLL). Met deze techniek is het niet mogelijk te bepalen of beide varianten zich op hetzelfde allel bevinden. Mutaties in SF3B1 zijn sterk (&gt;80%) gelinkt aan de aanwezigheid van ringsideroblasten. Itt tot het gunstig prognostisch belang van deze mutatie bij MDS met &lt;5% blasten onafhankelijk van de IPSS-R risico score, werd er geen duidelijk prognostisch belang van deze mutatie aangetoond bij MDS met excess blasten. (Nasda et al. 2017, WHO 2016)</p>	13
<p>Er werden 2 varianten gevonden in SF3B1.  Mutaties in SF3B1 in MDS zijn geassocieerd met de aanwezigheid van ring sideroblasten (MDS-RS) en zijn geassocieerd met een goede prognose (Arber Blood 2016).</p>	14
<p>Met NGS werden twee SF3B1 mutaties gedetecteerd die recurrent voorkomen in MDS en die dus de diagnose kunnen bevestigen. Meer bepaald zijn deze SF3B1 mutaties in MDS geassocieerd aan het voorkomen van ringsideroblasten (RS). Te correleren met de beenmergmorfologie (+ ijzerkleuring). Enkelvoudige SF3B1 mutaties zijn in MDS-RS zonder blastenexces prognostisch gunstig. De prognostische impact bij blastenexces en van het samen voorkomen van twee SF3B1 mutaties is niet gekend.  Geen targets voor therapie gedetecteerd.</p>	15
<p>Sur les 39 gènes séquencés, seuls les 16 gènes cibles suivants ont été interprétés : ASXL1, CEBPA, DNMT3A, EZH2, FLT3, IDH1, IDH2, KIT, NPM1, RUNX1, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF1, WT1. Toutefois, les éventuels variants pathogènes (ou probablement pathogènes observés dans les 23 autres gènes seront rapportés ci-dessous dans le résumé du rapport s'ils ont un impact clinique avéré dans le cadre d'un SMD EB2. Pour la description de chaque mutation se référer au tableau des résultats ci-joint.</p> <p>-Présence dans l'oncogène SF3B1 des mutations pathogéniques p.(Lys666Asn) et p.(Lys700Glu) décrites dans la littérature dans le cadre des SMD et dont l'impact clinique est avéré. Les mutations dans SF3B1 sont observées très fréquemment dans les MDS-RS (incidence : 80%) et sont fortement associées aux "ring sideroblasts". Dans le cadre des SMD, les mutations dans SF3B1 seraient associées à un pronostic plutôt favorable (NCCN-v1.2020; WHO 2017)).</p> <p>-Présence dans le gène DNMT3A du variant p.(Cys911Tyr) de signification biologique et donc clinique indéterminé.</p>	16
<p>SF3B1 mutatie als evidentie voor MDS.</p>	17

<p>SF3B1 mutaties geassocieerd met de aanwezigheid van ringsideroblasten en eerder gunstig klinisch verloop.</p> <p>Referenties:  Malcovati L et al. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. Blood 2015</p> <p>Malcovati L et al. SF3B1-mutant MDS as a distinct disease subtype: a proposal from the International Working Group for the Prognosis of MDS. Blood 2020</p>	
--	--

### 3.1.2. NGS-2020-5

<p>Varianten in NPM1 en ASXL1 ondersteunen de diagnose van acute myeloïde leukemie (AML). Varianten in ASXL1 worden geassocieerd met een slechte prognose. (Pratcorona et al. 2012. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. Haematologica. 97(3): 388–392.)</p> <p>De aanwezigheid van de hotspotmutatie c.2503G&gt;T (p.(Asp835Tyr)), slechts teruggevonden in 3.97% van de reads, (dus lager dan de detectielimiet van onze test, = 5.00%) moet bevestigd worden met een onafhankelijke techniek.</p> <p>De biologische en klinische betekenis van de variant c.2732G&gt;A (p.(Cys911Tyr)) in DNMT3A is niet gekend (VUS, variant of unknown significance).</p>	1
<p>De gevonden varianten in de genen NPM1 (o.a. type A), FLT3 (puntmutatie, geen ITD) en ASXL1 zijn recurrent in de context van AML.</p> <p>De aanwezigheid van een variant in het NPM1 gen zonder bijkomende FLT3-ITD (high)-mutatie wordt beschouwd als prognostisch gunstig.</p> <p>De aanwezigheid van een variant in het ASXL1 gen wordt echter geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).</p> <p>Door de aanwezigheid van een FLT3 puntmutatie variant kan een "doelgerichte" therapie gebruikt worden.</p>	2
<p>Mutaties in ASXL1 komen frequent voor bij MDS en AML en zorgen voor een adverse risk volgens de ELN criteria (Döhner et al., Blood 2017).</p> <p>Volgens de ELN guidelines zijn NPM1 mutaties in de afwezigheid van FLT3-ITD gecorreleerd met een gunstige prognose (Döhner et al., Blood 2017). Een bijkomende DNMT3A mutatie bij NPM1-positieve patiënten wordt echter door Gale et al (JCO 2015) en Ley et al (NEJM 2010) als een ongunstige marker voor prognose gezien. In een recentere studie van Metzeler et al. Blood 2016 wordt deze negatieve impact van een additionele DNMT3A mutatie enkel bij jongere NPM1+ patiënten (&lt; 60 jaar) bevestigd, ook in afwezigheid van een FLT3-ITD.</p> <p>De combinatie van een NPM1 mutatie en een FLT3-TKD mutatie is gecorreleerd met een betere prognose dan wanneer enkel de NPM1 mutatie aanwezig is (Boddu et al., Blood Adv 2017 / Papaemmanuil et al., NEJM 2016). De FLT3-TKD mutatie is een mogelijk target voor FLT3 inhibitoren.</p>	3
<p>Aanwezigheid van een pathogene NPM1 type A variant, geassocieerd met AML (22-29%). Prognostisch gunstig indien niet geassocieerd met FLT3 ITD variant, slechtere prognose dan niet-type A varianten (Alpermann T. et al., Hematologica, 2016, 101:e57)</p> <p>Aanwezigheid van een vermoedelijk pathogene ASXL1 variant, geassocieerd met MDS (11-15%), CMML (40%) en AML (5-10%) met slechtere prognose.</p> <p>Te bespreken op MOC: aanwezigheid van 2 pathogene varianten met VF &lt;5% (worden normaal niet gerapporteerd)</p> <p>1. Aanwezigheid van pathogene FLT3 TKD variant met VF van slechts 2.9%, geassocieerd met AML en slechtere prognose (Staudt D; et al., Int. J. Mol. Sc., 2018)</p> <p>2. Aanwezigheid van een pathogene NPM1 niet-type A variant met VF% van slechts 4.7%</p>	4

<p>Er werd een FLT3 (NM_004119.2(FLT3):c.2503G&gt;T (p.(Asp835Tyr)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 20.</p> <p>De aanwezigheid van deze variant (FLT3-TKD) heeft significant klinisch belang (tier I) en is geassocieerd met AML met in het algemeen een goede respons op gilteritinib (FDA approved) (PMID: 31665578). In de aanwezigheid van de NPM1 out-of-frame insertie in exon 11 is de prognose gunstiger vergeleken met een geïsoleerde FLT3-TKD variant (PMID: 17965322) .</p> <p>Er werd een NPM1 (NM_002520.6(NPM1):c.860_863dup (p.(Trp288Cysfs*12)) pathogene frameshift variant geïdentificeerd in exon 11.</p> <p>Er werd een NPM1 (NM_002520.6(NPM1):c.859delinsGTCTG (p.(Leu287Valfs*14)) pathogene frameshift variant geïdentificeerd in exon 11.</p> <p>De aanwezigheid van deze variant heeft significant klinisch belang (tier I). De variant is geassocieerd met AML en heeft in het algemeen een goede prognose in de afwezigheid van FLT3-internal tandem duplicatie (NCCN guidelines AML v3 2020,ESMO guidelines en PMID: 27367478).</p> <p>Er werd een ASXL1 (NM_015338.5(ASXL1):c.1934dupG (p.(Gly646Trpfs*12)) vermoedelijk pathogene frameshift variant geïdentificeerd in exon 14.</p> <p>De aanwezigheid van een ASXL1 variant in AML heeft significant klinisch belang (tier I) en geeft in het algemeen een slechtere prognose (NCCN guidelines AML v3 2020,PMID: 27276561).</p> <p>Er werden geen andere (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in het STHT myeloïde subpaneel (inclusief CEBPA, IDH1, IDH2, KIT, RUNX1, TET2, TP53, WT1).</p> <p>Daarnaast werd ook 1 variant met ongekende biologische en klinische betekenis geïdentificeerd in DNMT3A, cfr tabel.</p>	5
<p>Les variants du gène NPM1 constituent les atteintes ponctuelles les plus fréquentes dans les leucémies aiguës myéloïdes(LAM) et en l'absence d'anomalie cytogénétique et de variants des gènes FLT3 et TP53, définissent une pathologie de risque moléculaire faible, de bon pronostic. 1,2,3</p> <p>Les variants du gène ASXL1 sont retrouvés dans une proportion variable des LAM (5-35%) et dans moins de 15% des LAM NPM1 mutées. Ces anomalies sont généralement associées à une péjoration du pronostic dans les LAM mais leur impact n'est pas clairement défini dans le cadre des pathologies NPM1 mutées. 1,2</p> <p>EN CONCLUSION ce patient présente une pathologie de profil mutationnel associé à un pronostic favorable en raison de la présence d'un variant NPM1. Néanmoins la présence additionnelle d'un variant ASXL1 pourrait avoir un effet péjoratif sur le pronostic.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia, Eli Papaemmanui &amp; al. NEJM 2016</li> <li>2. NCCN Guidelines Version 1.2021 Acute Myeloid Leukemia (Age &gt;18 years)</li> <li>3. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. D. Arber et al. Blood. 2016</li> </ol>	6

<p>In deze casus wordt een variant in het NPM1 gen aangetroffen, Tier klasse I, significant klinisch belang.</p> <p>Varianten in NPM1 zijn een van de meest voorkomende genetische afwijkingen in AML (45-64% van de gevallen met normaal karyotype) en zijn relatief specifiek voor AML. De aanwezigheid van een NPM1 variant resulteert in de classificatie AML met gemuteerd NPM1 volgens WHO 2016 en is vaak geassocieerd met myelomonocytair of monocytair kenmerken.</p> <p>In deze entiteit wordt over het algemeen een goede respons op inductie chemotherapie gezien.</p> <p>Daarnaast wordt een variant in het DNMT3A gen teruggevonden, Tier klasse I, significant klinisch belang.</p> <p>Varianten in DNMT3A komen bij AML vaak voor tesamen met varianten in NPM1. Ze hebben een eerder negatieve impact op prognose.</p> <p>Daarnaast wordt een variant in het ASXL1 gen aangetroffen, Tier klasse I, significant klinisch belang.</p> <p>Varianten in ASXL1 zijn frequent voorkomend bij AML. Hun impact op prognose en outcome is negatief. Voorzichtigheid is evenwel geboden, aangezien varianten in ASXL1 eveneens worden aangetroffen in een normale oudere populatie.</p> <p>Referenties</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Arber et al. Blood 2016;127:2391-4052</li> <li>2. Döhner et al. Blood 2005;106:3740-6</li> <li>3. Falini et al. N Engl J Med 2005;352:254-66</li> <li>4. Thiede et al. Blood 2006;107:4011-20</li> <li>5. Ohgami et al. Mod Pathol 2015;28:706-14</li> <li>6. The Cancer Genome Atlas Research Network. N Engl J Med 2013;368:2059-74</li> <li>7. Ley et al. N Engl J Med 2010;363:2424-33</li> </ol>	7
<p>NGS analyse toont de aanwezigheid van 3 varianten met significant klinisch belang (TIER I):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- NPM1 c.859delinsGTCTG p.(Leu287Valfs*13) (allel frequency 7%)</li> <li>- NPM1 c.860_863dupTCTG p.(Trp288Cysfs*12) (allel frequency 34%)</li> <li>- FLT3 c.2503G&gt;T p.(Asp835Tyr) (allel frequency 7%)</li> </ul> <p>Er is 1 variant aangetoond met mogelijk klinisch belang (TIER II):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ASXL1 c.1934dupG p.(Gly646Trpfs*12) (allel frequency 41%)</li> </ul> <p>NPM1 gemuteerde AML is een AML met recurrenente mutatie volgens WHO en klinisch geassocieerd met een gunstige prognose (WHO revised 4th edition; LYON 2017). De co-aanwezigheid van een mutatie in het tyrosine kinase domein (TKD) van FLT3 (FLT3 c.2503G&gt;T p.(Asp835Tyr)) heeft een extra gunstig effect op de ziektevrije overleving (National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: acute myeloid leukemia, version 4.2020; PMID 29296796). FLT3-TKD mutaties komen voor in ongeveer 7% van de patiënten met AML en hebben een therapeutisch belang (FLT3 inhibitoren, vb. midostaurine) (National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: acute myeloid leukemia, version 4.2020; PMID 28644114). Resistentiemechanismen tegen bepaalde FLT3 inhibitoren werden beschreven (PMID 28576946).</p> <p>ASXL1 mutaties komen voor in 5-11% van de patiënten met AML en is een onafhankelijk ongunstige prognostische merker (PMID 30927018).</p> <p>Verder werd er een variant gevonden met onduidelijke klinische betekenis (VUS) in het DNMT3A gen gedetecteerd.</p>	8

Klinische indicatie: AML

NGS toont aanwezigheid aan van varianten in de genen ASXL1, DNMT3A, FLT3 en NPM1:

- 1) Een vermoedelijk pathogene frameshift variant in het ASXL1 gen (VAF 20%): ASXL1 varianten worden teruggevonden bij 5-17% van de AML patiënten. Bij AML is de aanwezigheid van ASXL1 varianten indicatief voor sAML of de novo 'elderly' AML/tAML met clinicopathologische eigenschappen van sAML (Lindsley et al., Blood 2015). ASXL1 varianten zijn geassocieerd met een ongunstige prognose en verminderde overleving in AML (Chou et al. Blood, 2010 en Patel et al. NEJM, 2012).
- 2) De gekende consensus pathogene missense variant Asp835Tyr (VAF 2%) in het tyrosine kinase domein (TKD) van het FLT3 gen. Gezien de lage VAF betreft het hier een sub-kloon. FLT3-TKD varianten worden teruggevonden in 5-10% van de AML patiënten. Door deze FLT3-TKD mutatie komt de patiënt in aanmerking voor behandeling met de Type I kinase inhibitor midostaurin, in combinatie met chemotherapy (FAGG, compassionate use programma Novartis) waarbij een betere algemene overleving wordt verwacht (Stone et al., NEJM, 2017). Echter gezien de lage VAF is het effect van de TKI behandeling mogelijk minder effectief. Belangrijk, type II kinase inhibitoren (e.g. quizartinib) hebben geen effect op deze FLT3-TKD varianten (zie review Antar et al., Leukemia 2020). Het effect van deze variant op prognose is niet duidelijk (Martelli et al., Blood Rev 2013; Mead et al, Blood 2007; Whitman et al., Blood 2008).
- 3) De gekende consensus pathogene variant p.(Trp288Cysfs\*12) in het NPM1 gen (VAF 12%): de variant is een subtype A 4bp insertie variant. AML met gemuteerde NPM1 is een afzonderlijke WHO entiteit. 27% tot 35% van de AML patiënten zijn NPM1 positief en meer dan 70% van deze patiënten bevatten ook varianten in DNA methylatie of hydroxymethylatie genen (DNMT3A, IDH1, IDH2-R140 en TET2).
- 4) Een tweede consensus pathogene variant p.(Leu287Valfs\*13) in het NPM1 gen (VAF 4%): de variant is een complexe deletie-insertie variant die verschillend is van de 3 meest voorkomende NPM1 subtypes (Type A, B en D). Deze variant werd nog niet beschreven in de COSMIC databank maar geeft eveneens aanleiding tot eenzelfde wijziging in de laatste aminozuren als bv. de Type A variant.
- 5) Een missens variant-met-onbekende-betekenis (VUS) in het DNMT3A gen (VAF 50%): het effect van de variant op de eiwit functie is niet duidelijk waardoor er ook geen evaluatie kan gemaakt worden i.v.m. de klinische impact van deze variant.

Er konden geen varianten met een VAF >5% teruggevonden worden in de andere bij AML klinisch belangrijke genen (CEBPA, IDH1/2, KIT, RUNX1, TET2, TP53 en WT1 (opmerking: wegens sub-optimale coverage bij het CEBPA gen en van de gen regio overeenkomend met AZ Asp33 tot Gly50 in RUNX1 kunnen varianten in dit gebied gemist worden. Ook grote ITD varianten bij FLT3 worden gemist, voor FLT3 en CEBPA zie daarom ook resultaten fragment analyse).

Besluit:

NGS profiel in overeenstemming met aanwezigheid van AML.

Gezien aanwezigheid van de NPM1 varianten behoort deze patiënt tot de WHO groep 'AML with NPM1' en, onder voorbehoud van afwezigheid van een FLT3-ITD met hoge allelische ratio, tot de gunstige risico groep zoals beschreven in de ELN en NCCN guidelines (Döhner et al., Leukemia 2017, NCCN guideline version 3.2020, AML).

De aanwezigheid van de FLT3-TKD variant is een therapeutische target (zie hierboven).

<p>Er werden twee pathogene mutaties in het NPM1 gen, een pathogene mutatie in het FLT3 gen en een vermoedelijk pathogene mutatie in het ASXL1 gen geïdentificeerd. De NPM1 c.859delinsGTCTG p.(Leu287Valfs*13), NPM1 c.860_863dup p.(Trp288Cysfs*12) en FLT3 c.2503G&gt;T p.(Asp835Tyr) mutaties hebben een significant klinisch belang (Tier I). De ASXL1 c.1934dup p.(Gly646Trpfs*12) mutatie heeft een mogelijk klinisch belang (Tier II).</p> <p>Mutaties in NPM1, FLT3 en ASXL1 worden in acute myeloïde leukemie (AML) recurrent aangetroffen. De aanwezigheid van een NPM1 mutatie definieert een aparte diagnostische entiteit in de WHO-classificatie van AML en is geassocieerd met een betere prognose [1, 2].</p> <p>In tegenstelling tot bij het gelijktijdig voorkomen van een interne tandem duplicatie (ITD) in FLT3 wordt de gunstige prognostische betekenis van een NPM1 mutatie niet ongedaan gemaakt door de simultane aanwezigheid van een mutatie in het tyrosine kinase domein (TKD) van FLT3, zoals FLT3 c.2503G&gt;T p.(Asp835Tyr). Mogelijk hebben patiënten met zowel een NPM1 mutatie als een FLT3-TKD mutatie zelfs een betere ziektevrije overleving dan patiënten met enkel een NPM1 mutatie [1, 3]. Om een correcte prognostische inschatting te maken, is het aanbevolen om bij deze patiënt nog aanvullend de aanwezigheid van een lange FLT3-ITD mutatie uit te sluiten via een bijkomende techniek.</p> <p>Ook klinisch belangrijk is dat de aanwezigheid van een FLT3-TKD mutatie resulteert in gevoeligheid voor behandeling met bepaalde FLT3 inhibitoren, zoals midostaurine, dat daardoor een plaats heeft bij inductie- en consolidatietherapie (in combinatie met chemotherapie) en bij onderhoudsbehandeling (als monotherapie) [1, 4]. Sommige andere FLT3 inhibitoren zijn daarentegen niet effectief bij een FLT3-TKD mutatie [5].</p> <p>De aanwezigheid van een ASXL1 mutatie mag niet als een ongunstige prognostische marker gebruikt worden, aangezien de overige, hierboven geschetste, bevindingen wijzen op een AML met een gunstig risicoprofiel en binnen dit risicoprofiel de simultane aanwezigheid van een ASXL1 mutatie geen prognostisch ongunstige impact heeft [1]. In het geval dat de resultaten van de andere onderzoeken (bv. cytogenetica) het risicoprofiel alsnog veranderen naar een intermediair of ongunstig risico, dan is de aanwezigheid van een ASXL1 mutatie wel geassocieerd met een slechtere overleving en vloeit hieruit een bijkomend ongunstig prognostisch effect voort (met finale classificatie van het risicoprofiel als ongunstig tot gevolg) [1].</p> <p>Daarnaast werd een variant van onduidelijke betekenis (VUS) gedetecteerd: DNMT3A c.2732G&gt;A p.(Cys911Tyr). Aan deze variant kunnen momenteel geen klinische implicaties gekoppeld worden (Tier III: ongekende klinische betekenis).</p> <p>Referenties:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: acute myeloid leukemia, version 4.2020.</li> <li>2. Swerdlow SH et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (revised 4th edition). IARC: Lyon 2017.</li> <li>3. PMID 17965322.</li> <li>4. PMID 28644114.</li> <li>5. PMID 28576946.</li> </ol>	10
<p>1) FLT3 c.2503G&gt;T: Impact prédictif: les patients porteurs de mutations somatiques du gène FLT3 sont susceptibles de répondre à un traitement ciblé par Midostaurine ou gilteritinib ou une molécule équivalente. L'EMA et la FDA ont reconnu l'indication de ces traitements chez les patients porteurs de mutations du gène FLT3.</p> <p><a href="https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/midostaurin">https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/midostaurin</a>  <a href="https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rydapt">https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rydapt</a>  <a href="https://www.fda.gov/drugs/fda-approves-gilteritinib-relapsed-or-refractory-acute-myeloid-leukemia-aml-flt3-mutation">https://www.fda.gov/drugs/fda-approves-gilteritinib-relapsed-or-refractory-acute-myeloid-leukemia-aml-flt3-mutation</a>  <a href="https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/summaries-opinion/xospata">https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/summaries-opinion/xospata</a></p> <p>- Prédictif: Plusieurs études cliniques ont montré la sensibilité des patients porteurs de mutations du gène FLT3 aux inhibiteurs de tyrosine kinase de type : Midostaurine/Sorafenib/Quizartinib. L'indication de la Midostaurin chez les patients porteurs de mutation.</p> <p>2) NPM1 c860_863dup: - Diagnostic OMS 2016: LAM avec mutation de NPM1c+ (ICDO: 9877/3). - Pronostic: ELN 2017: Favorable (?) (NPM1c+/FLT3-ITD+-neg)</p> <p>3) ASXL1 c.1934dupG: La prévalence des mutations d'ASXL1 est de 5-17%, dans les AML (Patel et al, 2017). Ces mutations sont mutuellement exclusive avec les mutations de NPM1 mais on note une co-occurrence fréquente avec les mutations de FLT3-ITD, CEBPA, RUNX1, SRSF2 et IDH2. La survie globale est généralement réduite chez les porteurs. Pour une évaluation détaillée de l'impact selon le caryotype, voir Arber et al., Blood 2016, supplementary data). Une association avec un pronostic péjoratif est également mentionnée dans les guidelines NCCN (NCCN guidelines AML v 3.2020 MS-8). La fréquence des mutations d'ASXL1 est corrélée de façon directe à l'accroissement d'âge. EFS et OS réduite semblent être retrouvées dans toutes les classes d'âges caractérisées par cette mutation.</p>	11



<p>- DNMT3A (NM_175629.2) : Variant probablement pathogène selon les bases de données pour ce gène repris dans la convention NGS. Mutation missense au niveau de l'exon 23 de ce gène suppresseur de tumeurs conférant un pronostic controversé en cas de leucémie myéloïde aigue.</p> <p>- NPM1 (NM_002520.6) : Variant pathogène repris dans la convention NGS. Mutation frameshift au niveau de l'exon 11 de ce gène suppresseur de tumeurs. La présence de cette mutation doit faire revoir le diagnostic en « AML with NPM1 mutated » de pronostic favorable, en l'absence d'autres mutations.</p> <p>- FLT3 (NM_004119.2) : Variant pathogène repris dans la convention NGS. Mutation missense au niveau de l'exon 20 de cet oncogène conférant un pronostic défavorable mais pouvant être ciblée par une thérapeutique.</p> <p>Résultats compatibles avec une leucémie myéloïde aigue de pronostic défavorab</p>	12
<p>Volgens de WHO 2016 classificatie behoort deze AML tot de klasse 'AML met gemuteerd NPM1'. In afwezigheid van een FLT3-ITD mutatie, behoort dit type leukemie tot een vorm met gunstige prognostisch profiel. Bijkomend wordt een FLT3-TKD mutatie waargenomen, wat behandeling met FLT3 inhibitoren mogelijk maakt. Echter betreft het een kleine subclon aan ruim 5% VAF. Ondanks het ongunstig prognostisch profiel van FLT3-TKD mutaties in andere gevallen, zorgt de aanwezigheid van een FLT3-TKD bij AML met NPM1 mutatie (&lt;5% van de AMLs) voor een nog gunstiger effect op de PFS dan AML NPM1mut/FLT3wt. ASXL1 mutaties komen vnl voor bij MDS en MDS/MPN en zeldzaam bij de novo AML. Aanwezigheid van ASXL1 mutatie bij AML met NPM1 mutatie is eerder zeldzaam en is suggestief voor een secundaire AML. ASXL1 mutaties op zich hebben een onafhankelijke slechte prognose en een negatief effect op de overleving, echter ASXL1 mutaties zouden het gunstige prognostische profiel van AML-NPM1 niet negatief beïnvloeden. (Papaemmanuil et al N Engl J Med 2016, Boddu et al Blood Adv 2017, Bacher et al. Blood 2008, Dohner et al. Blood 2016, Patel et al. N Engl J Med 2012).</p>	13
<p>Er werden drie varianten gevonden in NPM1, FLT3 (FLT3-TKD mutatie) en ASXL1. Volgens de WHO 2017 kan deze AML geklasseerd worden als AML met gemuteerd NPM1. Deze klasse heeft een gunstige prognose (risk stratification "favorable" volgens Döhner et al., Blood 2017). Mutaties in ASXL1 zijn in AML meestal geassocieerd met een lagere overleving maar door de aanwezigheid van de NPM1 mutatie, blijft deze AML in de "Favorable" risico group (Dohner et al, Blood 2017; WHO 2017). De aanwezigheid van FLT3-TKD in AML is geassocieerd met een sensitiviteit voor de FLT3 tyrosine kinase inhibitors midostaurine en gilteritinib (Stone et al., NEJM 2017; Perl et al., NEJM 2019).</p>	14
<p>Met NGS werd een NPM1 mutatie gedetecteerd, passend bij de diagnose van een AML met gemuteerde NPM1 (WHO 2016). Bijkomend werden ook (vermoedelijk) pathogene mutaties gedetecteerd in FLT3 en ASXL1: beide prognostisch ongunstig in AML. Het voorkomen van een FLT3 mutatie in AML is predictief voor een goede respons op FLT3-inhibitie therapie (midostaurin).</p>	15

<p>Sur les 39 gènes séquencés, seuls les 12 gènes cibles suivants ont été interprétés: ASXL1, CEBPa, DNMT3A, FLT3, IDH1, IDH2, KIT, NPM1, RUNX1, TET2, TP53, WT1. Toutefois, les éventuels variants pathogènes (ou probablement pathogènes) observés dans les 27 autres gènes seront rapportés ci-dessous dans le résumé du rapport s'ils ont un impact clinique avéré dans le cadre d'une LMA. Pour la description de chaque mutation se référer au tableau des résultats ci-joint.</p> <p>- Présence dans le gène suppresseur de tumeur ASXL1 du variant pathogénique p.(Gly646Trpfs*12) "frameshift" de type "perte de fonction" décrit dans la littérature dans le cadre des LMA. L'impact clinique des mutations "frameshift" du gène ASXL1 est avéré dans les LMA. Les mutations dans ASXL1 confèrent un pronostic défavorable (Döhner 2017, PMID 27895058).</p> <p>-Présence dans le gène NPM1 du variant pathogénique p.(Trp288Cysfs*12), mutation de type A (la plus fréquente ~72%), dont l'impact clinique est avéré et compatible avec le diagnostic de LMA.</p> <p>-Présence également dans le gène NPM1 du variant pathogénique p.(Leu287Valfs*13) "frameshift" dont l'impact clinique est avéré et compatible avec le diagnostic de LMA.</p> <p>Les variants dans le gène NPM1 confèrent :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- un pronostic favorable pour les LMA à caryotype normal si FLT3- ITD low (FA &lt;50%) ou absent (Falini -Blood 2011 PMID 21030560 ; Döhner-Blood 2017 PMID 27895058)).</li> <li>- un pronostic intermédiaire pour les LMA à caryotype normal si FLT3- ITD high (FA &lt; 50%) (Falini - Blood 2011 PMID 21030560 ; Döhner-Blood 2017 PMID 27895058)).</li> </ul> <p>La recherche des mutations FLT3 -ITD doit être réalisée par une autre analyse (PCR) car notre NGS ne permet pas de détecter des duplications supérieures à 30 pb. Il convient également de se référer au protocole de cytogénétique pour le caryotype.</p> <p>-Présence dans l'oncogène FLT3 du variant pathogénique p.(Asp835Tyr) au niveau du domaine tyrosine kinase (FLT3-TKD), décrit dans la littérature dans le cadre des LMA et compatible avec le diagnostic de LMA. La présence de ce variant ouvre la voie à des thérapies ciblées (ex : Gilteritinib), (NCCN v3 2020AML).</p> <p>-Présence dans le gène DNMT3A du variant p.(Cys911Tyr) de signification biologique et donc clinique indéterminé.</p>	16
<p>NPM1 mutatie als de novo AML merker in tegenstelling tot ASXL1 mutatie als gekende secundaire (post-MDS) AML merker. Geen eenduidige AML ontogenese mogelijk op basis van dit moleculair profiel.</p> <p>FLT3 mutatie indicatief voor gebruik van multikinase inhibitoren (e.g. midostaurin, gilteritinib) in AML.</p> <p>Referenties: Lindsley RC et al. AML ontogeny is defined by distinct somatic mutations. Blood 2015. Perl AE et al. Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML. NEJM 2019. Stone RM et al. Midostaurin plus Chemotherapy for AML with a FLT3 Mutation. NEJM 2017.</p>	17

### 3.1.3. NGS-2020-6

<p>De aanwezigheid van een CALR mutatie past bij de diagnose van Primaire myelofibrose (PMF). De gevonden variant c.1099_1150del (p.(Leu367Thrfs*46)) is de CALR type 1 hotspotmutatie, dewelke prognostisch gunstig is in vergelijking met JAK2 of MPL gemuteerde PMF en JAK2/MPL/CALR wild-type (triple negative) PMF (Passamonti &amp; Maffioli. Update from the latest WHO classification of MPNs: a user's manual. 2016 Hematology Am Soc Hematol Educ Program; Tefferi et al., Driver mutations and prognosis in primary myelofibrosis: Mayo-Careggi MPN alliance study of 1,095 patients. 2018 Am J Hematol).</p>	1
<p>De gevonden variant in het gen CALR (type 1) is recurrent in de context van MPN, type primaire myelofibrose (PMF). In PMF wordt een "driver" mutatie in CALR geassocieerd met een gunstigere prognose dan JAK2/MPL. Geen bijkomende varianten.</p> <p>Er zijn dus geen ongunstige factoren in de MIPSS70, MIPSS70-plus en GIPPS scores. (Ref: Guglielmelli et al, J Clin Oncol. 2018 36(4):310-318, Tefferi et al, Leukemia, 2018. 2(7):1631-1642)</p>	2

<p>Er wordt een Type I mutatie in CALR gedetecteerd. PMF patiënten met een CALR mutatie hebben een meer indolent klinisch verloop en een betere overleving in vergelijking met PMF patiënten met een JAK2 of MPL mutatie (Rumi et al, Blood 2014 - Rotunno et al, Blood 2014 - Tefferi et al, Leukemia 2014).</p>	3
<p>Aanwezigheid van CALR variant type 1: geassocieerd met primaire myelofibrose (met betere prognose dan met JAK2 of MPL mutatie) of ET (70-84%). Geeft hoger risico op transformatie naar myelofibrose.</p>	4
<p>Er werd een CALR (NM_004343.3):c.1092_1143del (p.(Leu367Thrfs*46)) pathogene frameshift variant geïdentificeerd in exon 9.</p> <p>De aanwezigheid van deze variant in PMF heeft significant klinisch belang (tier I) vermits CALR mutaties voorkomen bij 15-25% van de ET, 20-25% van de PMF en 70% van de ET of PMF patiënten die geen mutatie vertonen in JAK2 of MPL (PMID: 25301336)).</p> <p>CALR-gemuteerde PMF vertonen een betere overleving dan JAK2 of MPL gemuteerde PMF of triple negatieve PMF en hebben een lager risico op thrombosis dan JAK2 gemuteerde PMF (PMID: 31630335).</p> <p>Bovendien vertoont dit type variant CALR mutaties (type 1, deletie) bij PMF een betere overleving dan PMF met CALR mutaties type 2 (insertie) (PMID: 25301336).</p> <p>Er werden geen andere (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in het STHT myeloïde subpaneel (inclusief JAK2, MPL, ASXL1, EZH2, TET2, IDH1, IDH2, SRSF2, SF3B1).</p>	5
<p>Les mutations du gène CALR sont présentes dans +/- 25% des myélofibroses primaires (PMF). Les mutations de type 1 (déletion de 52pb) représentent +/- 75% des mutations du gène CALR dans les PMF.</p> <p>Dans les PMF, la survie globale (OS) est supérieure chez les patients présentant une mutation du gène CALR de type 1 par rapport à ceux porteurs d'une mutation des gènes JAK2 ou MPL ou ceux ne présentant pas de mutation des gènes JAK2, CALR ou MPL (PMF « triple négatives »).</p> <p>Le bilan des PMF fait désormais l'objet de scores intégrant les données cliniques, moléculaire et cytogénétiques pour évaluer le pronostic. (cf. MIPSS70* et GIPSS**)</p> <p>EN CONCLUSION ce patient présente une pathologie de profil mutationnel compatible avec une myélofibrose de pronostic favorable. Ce résultat est à compléter du celui de la clinique et du caryotype pour évaluer le pronostic de manière complète (score MIPSS70 et GIPSS).</p> <p>* Tefferi A et al: MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. JCO 36, no. 17 :1769-1770, 2018</p> <p>** Tefferi A et al : GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. Leukemia volume 32, pages1631–1642(2018)</p>	6
<p>In deze casus wordt een variant in het CALR gen teruggevonden, Tier klasse I, significant klinisch belang.</p> <p>Een CALR variant komt voor in ongeveer 30% van de patiënten met PMF. De aanwezigheid ervan vormt een majeur diagnostisch criterium voor PMF (WHO2016). De prognose van patiënten met PMF wordt gunstig beïnvloed door de aanwezigheid van een CALR variant.</p> <p>Referenties</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Arber et al. Blood 2016;127:2391-405</li> <li>2. Tefferi et al. Leukemia 2010;24:1128-38</li> <li>3. Tefferi et al. Blood 2014;124:2507-13</li> <li>4. Tefferi et al. Leukemia 2014;28:1472-7</li> </ol>	7
<p>NGS analyse toont de aanwezigheid van één variant met significant klinisch belang (TIER I):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- CALR c.1099_1150del p.(Leu367Thrfs*46) (allel frequency 22%)</li> </ul> <p>Een CALR mutatie komt bij ongeveer 30% van de patiënten met primaire myelofibrose voor en bevestigt hierbij de diagnose (WHO revised 4th edition; LYON 2017). CALR c.1099_1150del is één van de meest voorkomende mutaties en betreft een type 1 CALR mutatie (Cancergenome). Type 1 CALR mutaties zijn geassocieerd met een betere overleving in vergelijking met patiënten met een JAK2 mutatie, type 2 CALR mutatie en JAK2/CALR/MPL triple negatieve status (PMID 29164670; PMID 24569778; PMID 24997152).</p>	8

<p>Klinische indicatie: PMF</p> <p>NGS toont aanwezigheid aan van een variant in het CALR gen:</p> <p>De gekende, consensus pathogene 52bp deletie variant (type 1) in het CALR gen (VAF 22%): aanwezigheid van deze variant is compatibel met aanwezigheid van een myeloproliferatieve neoplasmie (ET of PMF). Type 1 CALR varianten zijn preferentieel geassocieerd met een myelofibrose fenotype en een significant hoger risico op myelofibrotische transformatie bij een essentiële trombocytose (Pietra et al., Leukemia, 2016). Ongeveer 25% PMF patiënten zijn positief voor CALR (zie review Palandri et al. Annals of Hematol 2019). Aanw ezigheid van CALR type 1 varianten heeft bij PMF geen negatief effect op algemene overleving, in tegenstelling, de afw ezigheid van deze varianten is een DIPPS plus-onafhankelijke risicofactor voor lagere overall survival in PMF (Tefferi et al., Am J Hematol 2017, Mayo-Careggi MPN Alliance study: Tefferi, Am J Hematol 2016).</p> <p>Er konden geen varianten met &gt;5% VAF teruggevonden worden in de andere bij MPN klinisch belangrijke genen (ASXL1, EZH2, IDH1/2, JAK2, MPL, SF3B1, SRSF2, TET2 en TP53 (opmerking: wegens sub-optimale coverage van de gen regio overeenkomend met AZ Met1 tot Glu82 in EZH2 kunnen varianten in dit gebied gemist worden)).</p> <p>Besluit: NGS profiel in overeenstemming met aanwezigheid van een PMF. Gezien ontbreken van karyotype en hematologische parameters is het niet mogelijk om de moleculair geïntegreerde prognostische modellen MIPSS70, MIPSS70-plus v2.0 of GIPSS toe te passen (Guglielmelli et al., JCO 2018; Tefferi et al., JCO 2018 en Tefferi et al., Leukemia 2018). Ook de indeling van patiënten met MPN zoals beschreven door Grinfeld et al. (NEJM 2018) en mogelijke evaluatie van prognose en risico op transformatie kan hierdoor niet toegepast worden.</p>	9
<p>Er werd een pathogene mutatie in het CALR gen geïdentificeerd: CALR c.1099_1150del p.(Leu367Thrfs*46). Deze mutatie heeft een significant klinisch belang (Tier I). CALR mutaties komen voor in 20-35 % van de gevallen van primaire myelofibrose (PMF) [1, 2]. De aanwezigheid van een CALR mutatie vormt een majeur WHO-criterium voor diagnose van PMF [1]. De aangetroffen deletie van 52 basenparen wordt ook omschreven als een type 1 CALR mutatie, die bij PMF geassocieerd is met een betere overleving in vergelijking met een type 2 CALR mutatie, een JAK2 p.(Val617Phe) mutatie of een JAK2/CALR/MPL triple negatieve mutatiestatus [1, 2].</p> <p>Referenties: 1. Swerdlow SH et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (revised 4th edition). IARC: Lyon 2017. 2. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: myeloproliferative neoplasms, version 1.2020.</p>	10
<p>La présence d'une mutation frameshift de CALR est pathognomonique du diagnostic de néoplasie myéloproliférative (MPN). On retrouve généralement ces mutations chez les patients répondants aux critères diagnostiques de TE ou PMF selon l'OMS.</p> <p>La présence d'une mutation de CALR de type 1-Type 1-like (del 52 pb) est considérée de "bon pronostic" étant associée avec une OS prolongée et un risque diminué d'acutisation (PMF) en comparaison avec des patients porteurs de mutation V617F de JAK2 ou CALR de type-2 (PMF) (Tefferi et al., 2017).</p> <p>Par rapport aux patients V617F+, le risque de thrombose est réduit pour les TE avec mutation de CALR.</p>	11
<p>- CALR (NM_004343.3) : Variant pathogène repris dans la convention NGS. Mutation frameshift au niveau de l'exon 9, soutenant le diagnostic de myélofibrose primitive de pronostic favorable. Résultat compatible avec une myélofibrose primitive de pronostic favorable.</p>	12
<p>CALR mutaties komen voor bij ET (15-24%) en IMF (25-35%). Voor IMF is de aanwezigheid van een CALR mutatie één van de diagnostische criteria. In vergelijking met JAK2 en MPL gemuteerde myeloproliferatieve aandoeningen kennen patiënten met een CALR mutatie, en met name de type 1 variant, een milder klinisch verloop en een langere overleving. Tevens is de CALR type 1 mutatie opgenomen in de MIPSS70+ risico score als gunstige prognostische merker. (WHO 2016, Rumi et al. Blood 2017, Tefferi et al. AJH 2018)</p>	13

<p>Er werd een variant gevonden in CALR (52bp deletie: Type I variant). CALR is een majeur criterium in de diagnose van MPN. In PMF, CALR type I mutaties zijn geassocieerd met een gunstigere prognose (Tefferi et al., Blood 2014; Tefferi et al., Am J Hematol 2018).</p>	14
<p>Met NGS werd een CALR type 1 mutatie gedetecteerd passend bij de diagnose van een MPN type PMF. CALR type 1 mutaties zijn prognostisch gunstig in PMF. Er werden geen bijkomende mutaties gedetecteerd met negatieve impact op de prognose, noch die kunnen dienen als therapie target.</p>	15
<p>Sur les 39 gènes séquencés, seuls les 11 gènes cibles suivants ont été interprétés: ASXL1, CALR, EZH2, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, SRSF2, SF3B1, TET2, TP53. Toutefois, les éventuels variants pathogènes (ou probablement pathogènes) observés dans les 28 autres gènes seront rapportés ci-dessous dans le résumé du rapport s'ils ont un impact clinique avéré dans le cadre d'une NMP. Pour la description de chaque mutation se référer au tableau des résultats ci-joint.</p> <p>-Présence dans l'oncogène CALR d'un variant pathogénique type 1 like (deletion de 52bp) p.(Leu367Thrfs*46) "gain de fonction" situé dans l'exon 9 d'intérêt. Ce variant est décrit dans la littérature dans le cadre des NMP et son impact clinique est avéré. En cas de myélofibrose, la présence de CALR est associée à un pronostic plus favorable que les patients triple négatifs ou JAK2 muté ou MPL muté (Tefferi et al., BLOOD 2015, PMID 25037629).</p>	16
<p>CALR mutatie als merker voor MPN. CALR mutaties zijn mutueel exclusief met JAK2 en MPL mutaties en zijn geassocieerd met eerder gunstig klinisch verloop. Referenties: Tefferi A et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. Leukemia 2014.</p>	17

### 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  **$|Z| > 3$** .
- 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](https://www.wiv-isp.be/QML/index_nl.htm)

(kies "BROCHURES" in het voorgestelde menu)

of rechtstreeks op het volgende adres:

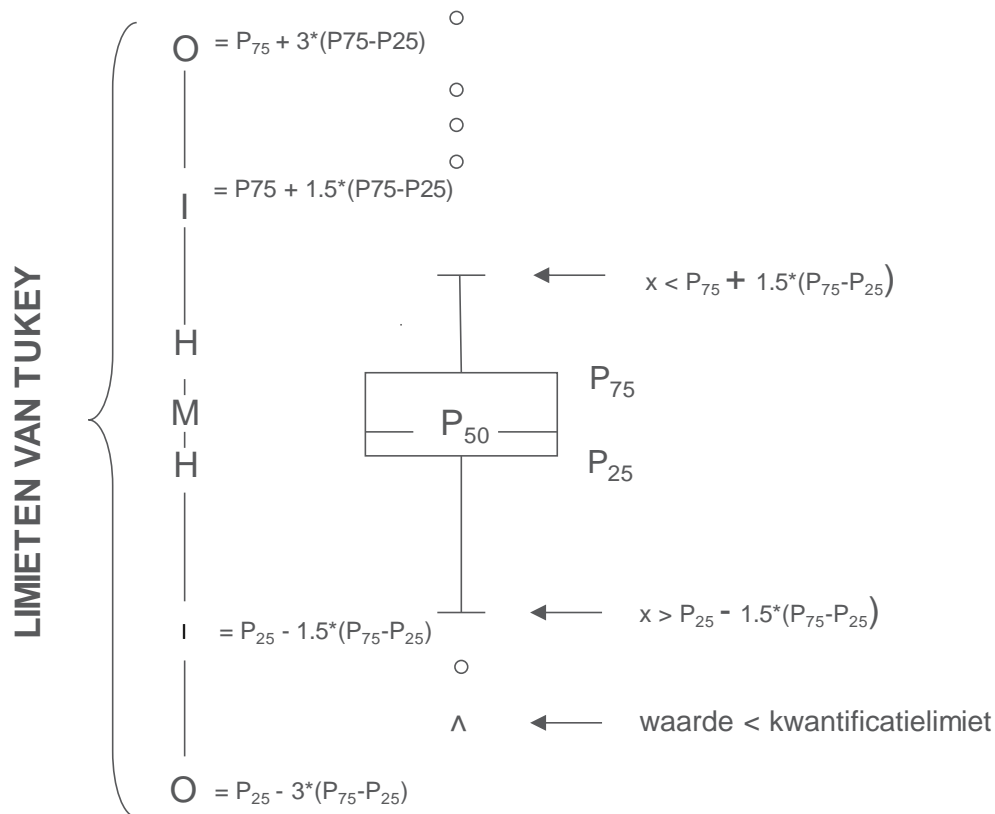
[https://www.wiv-isp.be/QML/activities/external\\_quality/brochures/nl/brochures.htm](https://www.wiv-isp.be/QML/activities/external_quality/brochures/nl/brochures.htm)

- 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

© Sciensano, Brussel 2021.

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.