#  Onderwerp

Deze procedure beschrijft de registratie en post-analytische aspecten voor het Heilighart ziekenhuis Lier. Deze processen zijn slechts gedeeltelijk te standaardiseren binnen het regionaal NGS consortium. Dit document zal gedeeld worden via de gedeelde Sharepoint site van Briant Klinische laboratoria.

1. **Toepassingsgebied**

Het toepassingsgebied van deze procedure geldt voor alle stalen waarbij in het labo NGS voor hematologische maligniteiten wordt geregistreerd. Dit is een samenwerking met het Centrum Menselijke Erfelijkheid van het UZ Leuven.

1. **Definities en termen**

NGS: Next Generation Sequencing

CME: Centrum Menselijke Erfelijkheid

1. **Registratie**

Alle stalen voor NGS worden geregistreerd via de alfabetische lijst. Hier wordt de test “NGS Hemato” geselecteerd of “3001” geregistreerd. In de pop-up wordt het staaltype geselecteerd.

Glims creëert de bepaling NGS.hem.nodig. De persoon die registreert, zorgt dat het aanvraagformulier tot bij de verantwoordelijke klinisch bioloog komt. Deze beslist of NGS mag uitgevoerd worden of niet. Indien beslist wordt om NGS uit te voeren, registreert Glims automatisch de overige bepalingen.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Menomic | Naam | Functie |
| NGS.hem.nodig | NGS hemato aanvraag | Hier vult de klinisch bioloog “ja” in via de keuzelijst indien NGS uitgevoerd mag worden of “neen” indien NGS niet moet uitgevoerd worden.  |
| NGS.staal.hem | NGS staaltype | Het staaltype wordt ingevuld aan de hand van een pop-up. Indien perifeer bloed gekozen wordt, registreert Glims automatisch een complet formule. |
| NGS.vraag.hem | NGS vraagstelling | Keuzeveld voor diagnose of follow-up.  |
| NGS.ind.hem | NGS indicatie | Keuzeveld om de specifieke indicatie te selecteren.  |
| NGS.kl.info.hem | NGS klinische info | Vrije tekst waar de KB extra klinische info in noteert.  |
| NGS.MOC.hem | NGS MOC advies | Keuzeveld voor MOC advies niet vereist; MOC advies volgt, graag bewaring; MOD advies: positief; MOC advies: negatief.  |
| NGS.myelo.hem | NGS hematologische aandoeningen: panel | Keuzeveld waar de KB het panel kiest (lymfoïd/myeloïd/beiden). Aan de hand van dit veld wordt na confirmatie een achtergrondtekst aan het besluit gekoppeld.  |
| NGS.var.hem | NGS aantal pathogene varianten | Vrije tekst waar de KB het aantal gevonden pathogene varianten invult. |
| NGS.var.verm.hem | NGS vermoedelijke varianten | Vrije tekst waar de KB het aantal vermoedelijk pathogene varianten invult. |
| NGS.besluit | NGS opmerkingen en besluit | Vrije tekst waar de KB aan de hand van de varianten en de klinische gegevens een besluit vormt. Hier wordt in externe commentaar een vaste tekst meegegeven met de bepaalde genen.  |
| NGS.Pitter.hem | NGS Pitter registratie  | Vrije tekst waarin de Pitter registratiecode wordt ingevuld. Wordt automatisch geregistreerd en stopgezet indien niet nodig.  |

De teksten die automatische aan de bepaling NGS.opm.hem worden gekoppeld zijn een lijst met de bepaalde genen. Dit is variabel tussen lymfoid of myeloid.

|  |  |
| --- | --- |
| Keuze | Tekst |
| Lymfoid | Aan de hand van targeted capture Next-Generation-Sequencing op de Illumina NovaSeq (detectielimiet: 5% mutante allelen; 10% tumorcellen)) werd van volgende genen de volledige coderende regio onderzocht op afwijkingen: ANKRD26, ASXL1, BCOR, BCORL1, BRAF, CALR, CBL, CEBPA, CSF3R, DDX41, DIS3, DNMT3A, ELANE, ETNK1, ETV6, EZH2, FLT3, GATA1, GATA2, GFI1, HAX1, HRAS, IDH1, IDH2, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, KMT2A, KRAS, MPL, NF1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PHF6, PPM1D, PTEN, PTPN11, RAD21, RUNX1, SAMD9, SAMD9L, SETBP1, SF3B1, SMC1A, SMC3, SRP72, SRSF2, STAG1, STAG2, TET2, TP53, U2AF1, WAS, WT1 en ZRSR2. Voor meer details over de doelwitregio's, de gebruikte transcripten en de classificatie van varianten verwijzen we naar: https://www.uzleuven.be/nl/centrum-menselijke-erfelijkheid/vraag-een-diagnostische-test onder 'aanvraagformulieren - Hemato-oncologische aandoeningen'. Een coverage van 350x per amplicon wordt vooropgesteld. De huidige versie van de analysepijplijn is gcap21\_09. Varianten van de genen ANKRD26, CBL, CEBPA, CSF3R, DDX41, ELANE, ETV6, GATA2, MPL, SAMD9, SAMD9L, PTPN11, RUNX1, SRP72 en TP53 bij maligne aandoeningen kunnen somatisch zijn (d.w.z. verworven tijdens het leven) of constitutioneel (d.w.z. aanwezig in de kiemlijn (germline)) b.v. in de context van een familiale kankerpredispositie. Op basis van deze test kan men geen onderscheid maken tussen een verworven en germlinevariant. |
| Myeloid | Aan de hand van targeted capture Next-Generation-Sequencing op de Illumina NovaSeq (detectielimiet: 5% mutante allelen; 10% tumorcellen)) werd van volgende genen de volledige coderende regio onderzocht op afwijkingen: ANKRD26, ASXL1, BCOR, BCORL1, BRAF, CALR, CBL, CEBPA, CSF3R, DDX41, DIS3, DNMT3A, ELANE, ETNK1, ETV6, EZH2, FLT3, GATA1, GATA2, GFI1, HAX1, HRAS, IDH1, IDH2, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, KMT2A, KRAS, MPL, NF1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PHF6, PPM1D, PTEN, PTPN11, RAD21, RUNX1, SAMD9, SAMD9L, SETBP1, SF3B1, SMC1A, SMC3, SRP72, SRSF2, STAG1, STAG2, TET2, TP53, U2AF1, WAS, WT1 en ZRSR2. Voor meer details over de doelwitregio's, de gebruikte transcripten en de classificatie van varianten verwijzen we naar: https://www.uzleuven.be/nl/centrum-menselijke-erfelijkheid/vraag-een-diagnostische-test onder 'aanvraagformulieren - Hemato-oncologische aandoeningen'. Een coverage van 350x per amplicon wordt vooropgesteld. De huidige versie van de analysepijplijn is gcap21\_09. Varianten van de genen ANKRD26, CBL, CEBPA, CSF3R, DDX41, ELANE, ETV6, GATA2, MPL, SAMD9, SAMD9L, PTPN11, RUNX1, SRP72 en TP53 bij maligne aandoeningen kunnen somatisch zijn (d.w.z. verworven tijdens het leven) of constitutioneel (d.w.z. aanwezig in de kiemlijn (germline)) b.v. in de context van een familiale kankerpredispositie. Op basis van deze test kan men geen onderscheid maken tussen een verworven en germlinevariant. |
| Myeloid en Lymfoid  | Aan de hand van targeted capture Next-Generation-Sequencing op de Illumina NovaSeq (detectielimiet: 5% mutante allelen; 10% tumorcellen)) werd van volgende genen de volledige coderende regio onderzocht op afwijkingen: ACTG1, ANKRD26, ARID1A, ASXL1, ATM, B2M, BCL2, BCOR, BCORL1, BIRC3, BRAF, BTK, CALR, CARD11, CBL, CD28, CD79B, CDKN2A, CEBPA, CREBBP, CRLF2, CSF3R, CXCR4, CYLD, DDX41, DIS3, DNMT3A, EBF1, EGR1, ELANE, EP300, ETNK1, ETV6, EZH2, FAM46C, FBXW7, FGFR3, FLT3, FOXO1, GATA1, GATA2, GFI1, GNA13, HAX1, HRAS, ID3, IDH1, IDH2, IKZF1, IL7R, IRF4, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, KLF2, KMT2A, KRAS, MEF2B, MPL, MYD88, NFKBIE, NOTCH1, NOTCH2, NF1, NPM1, NR3C1, NRAS, PDGFRA, PHF6, PLCG1, PLCG2, POT1, PPM1D, PRDM1, PRKD2, PTEN, PTPN11, PTPRD, RAD21, RB1, RHOA, RUNX1, SAMD9, SAMD9L, SETBP1, SETD2, SF3B1, SMC1A, SMC3, SP140, SRP72, SRSF2, STAG1, STAG2, STAT3, STAT5B, STAT6, TCF3, TET2, TNFAIP3, TP53, TRAF2, TRAF3, U2AF1, WAS, WT1, XPO1, ZRSR2 Voor meer details over de doelwitregio's, de gebruikte transcripten en de classificatie van varianten verwijzen we naar: [https://www.uzleuven.be/nl/centrum-menselijke-erfelijkheid/vraag-een-diagnostische-test](https://eur02.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fwww.uzleuven.be%2Fnl%2Fcentrum-menselijke-erfelijkheid%2Fvraag-een-diagnostische-test&data=05%7C02%7CHelena.Claerhout%40heilighartlier.be%7C61e4b247f28c4d9e428008dc6b684104%7Cd00a355a7c73411f8f00b273b7786ffd%7C1%7C0%7C638503342711147035%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWIjoiMC4wLjAwMDAiLCJQIjoiV2luMzIiLCJBTiI6Ik1haWwiLCJXVCI6Mn0%3D%7C0%7C%7C%7C&sdata=yJvS0o%2B9y6fD7Mt1KGIlscM4oAEi%2FuPcWYiqL62GIYY%3D&reserved=0) onder 'aanvraagformulieren - Hemato-oncologische aandoeningen'. Een coverage van 350x per amplicon wordt vooropgesteld. De huidige versie van de analysepijplijn is gcap21\_09. Varianten van de genen ANKRD26, ATM, CBL, CEBPA, CSF3R, DDX41, ELANE, ETV6, GATA2, MPL, SAMD9, SAMD9L, PTPN11, RUNX1, SRP72 en TP53 bij maligne aandoeningen kunnen somatisch zijn (d.w.z. verworven tijdens het leven) of constitutioneel (d.w.z. aanwezig in de kiemlijn (germline)) b.v. in de context van een familiale kankerpredispositie. Op basis van deze test kan men geen onderscheid maken tussen een verworven en germlinevariant. |

1. **Indicaties**

De lijst met indicaties voor NGS is terug te vinden onder de meest recente versie van bijlage 2 op de RIZIV website: <https://www.riziv.fgov.be/nl/professionals/verzorgingsinstellingen-en-diensten/laboratoria/hemato-oncologie-terugbetaling-van-moleculair-biologische-testen-met-next-generation-sequencing>

1. **Verzenden klinische inlichtingen**

Klinische inlichtingen worden meegestuurd met het doorstuurformulier ofwel verzendt de klinisch bioloog verantwoordelijk voor de verzending een e-mail met klinische inlichtingen naar het CME (cme.hemato@uzleuven.be). Deze e-mail moet meer klinische achtergrond informatie bevatten die het mogelijk moet maken een juiste interpretatie te doen van de NGS.

1. **MOC aanvragen**

Indien de patiënt op de MOC besproken moet worden i.k.v. de NGS aanvraag, stuurt de verantwoordelijke klinisch bioloog een mail naar moc\_secretariaat@heilighartlier.be

1. **Rapportage**
	1. **Interpretatie van resultaten**

De run files worden gedownload door een eerste moleculair bioloog en slaat deze op op de M-schijf. Deze voert dan een eerste biologische interpretatie uit in een kopie van de run files die wordt hernoemd met de initialen van de eerste moleculair bioloog.

Een tweede moleculair bioloog (of bevoegd klinisch bioloog) voert een onafhankelijke tweede biologische interpretatie uit. Ook deze interpretatie wordt opgeslagen na hernoemen met de initialen van de tweede bioloog.

De tweede bioloog bekijkt dan of de twee biologische interpretaties volledig concordant zijn. Indien dit het geval is wordt het bestand opgeslagen met de extensie “\_FINAAL”.
Zijn er toch discordanties, dan worden deze onderling besproken. Indien geen consensus bereikt kan worden zal er een second opinion gevraagd worden bij het CME.

De verantwoordelijke klinisch bioloog voert een laatste controle van de biologische interpretatie uit en stelt een klinische interpretatie op.

* 1. **Rapportage van resultaten**

De verantwoordelijke bioloog voert in het LIS alle resultaten in en autoriseert deze. De resultaten worden ingevuld aan de hand van een standaardtekst ter hoogte van de bepaling “NGS.besluit”.

Deze standaardtekst laat toe de resultaten op een overzichtelijke manier in te vullen. De standaardtekst wordt gegenereerd in de bepaling “NGS.besluit” door dubbel te klikken in het resultaat veld en dan de code “NGS.besl.alg” te kiezen. Na expanderen kan dan aan de hand van F6 de tekst bewerkt worden.
De tekst ingesteld als standaardtekst is :

*“(Vermoedelijk) pathogene varianten:*

*Gen Variant %\* Bio. klasse\*\* Klin. klasse\*\*\**

*Varianten waarvan tot op heden de betekenis niet gekend is (Variant of Unknown Significance, VUS):*

*Gen Variant %\* Bio. klasse\*\* Klin. klasse\*\*\**

*Conclusie:*

*Voor volgende regio's werden onvoldoende sequencingdata verzameld in dit staal en kan er niet worden gerapporteerd:*

*\* (Het vermelde % verwijst naar de verhouding van het aantal mutante calls versus het totale aantal calls voor deze positie.)*

*\*\* (Referentie: Richards, S et al. 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. Genet Med 2015, 17(5): 405- 424.)*

*\*\*\* (Referentie: Li, MM et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer. J Mol Diagn 2017, 19: 4-23.)”*

1. **Second opinion**

Indien er bij de biologische interpretatie een discordantie gevonden wordt tussen beide interpretaties, wordt dit onderling besproken. Als dit een gekend euvel is, wordt er niet overgegaan tot een second opinion. Indien de klinisch bioloog beslist dat dit toch een second opinion vereist zal Leuven de volledige interpretatiestroom opnieuw opgestart worden door het CME zelf. Dit resultaat wordt dan als finaal beschouwd. In geval van een second opinion wordt in Glims de bepaling “NGS.confirmatie” via de alfabetische lijst bij geregistreerd.

1. **Registratie van stalen i.k.v. tegemoetkoming**

Stalen worden afhankelijk van de indicatie in het PITTER register geregistreerd.

* PITTER register in HD4DP2.0 <https://hd4dp2.heilighartlier.be/#/organization/login>
	+ Stalen met indicatie CLL (code TP53) en AML (code FLT3-ITD) (tenzij herval binnen <1 jaar)
	+ Enkel bepalingen die onder artikel 33ter vallen.