

NGS vaste tumoren

Document type:	Laboratoriumgids / LG	Document subtype:	.
Doelgroep:	Labo PO	Subdoelgroep:	.
Auteur:	Laura Coninx	Keurder:	Toon Berghmans
Geldig van:	23/10/2020	Geldig tot:	23/10/2023
Document-nr:	PO-LG4-0041	Versie-nr:	1.0
Campus:	Alle	Bekrachtiger	Karen Deraedt

Inhoud

1	NGS.....	2
2	Type aanvraagformulier.....	2
3	Uitvoerfrequentie	2
4	Antwoordtijd.....	2
5	Afname instructies	2
6	Staaltype en minimale hoeveelheid	3
7	Transport	3
8	Methode	3
8.1	Doel van de test	3
8.2	Technisch luik van de test.....	3
8.3	Volledig genenpanel	3
9	Rapportering	3
9.1	Terugbetaling	3
9.2	Rapport.....	4

1 NGS

De NGS analyse van tumoren kadert binnen een pilootproject van de Belgische overheid. Dit piloot project is opgestart in 2019 met als doel om de "next generation sequencing (NGS)" technologie in ons volksgezondheid systeem te introduceren. In het kader van dit pilootproject kunnen stalen van vaste tumoren en hematologisch-oncologische stalen uitgevoerd worden met NGS met terugbetaling en kan er een "gepersonaliseerde behandeling worden voorgesteld. De commissie "personalised medicine" (ComPerMed) heeft samen met experts uit het domein vastgelegd per indicatie welke genen verplicht moeten worden onderzocht om van deze terugbetaling te kunnen genieten. Deze lijst van genen is dynamisch en wordt om de 6 maanden geëvalueerd.

Voor meer informatie (algoritme per indicatie, literatuur, guidelines) verwijzen we naar de website van ComPerMed (<https://www.compermed.be>) en (https://www.riziv.fgov.be/SiteCollectionDocuments/next_generation_sequencing_bijlage2.pdf) met lijst van genen.

NGS op vaste tumoren wordt uitgevoerd in samenwerking met UZ Leuven. De labo-analyse en bio-informatische dataverwerking inclusief kwaliteitscontrole van de sequencing data gebeurt in UZ Leuven. De technische data-analyse, biologische interpretatie, klinische interpretatie en rapportering gebeurt in ZOL Genk.

2 Type aanvraagformulier

De aanvraag voor NGS analyse bij Vaste Tumoren dient te gebeuren via het [Aanvraagformulier Farmacodiagnostisch en moleculair onderzoek](#) PO-FOR4-0005

- af te printen op papier via de website (<https://www.zol.be/pathologische-ontleedkunde>)
- of in te vullen via het elektronisch patiëntendossier (EPD) in HIX. Dit formulier is in te vullen, af te printen en af te tekenen door de aanvragende arts (enkel interne artsen ZOL).

3 Uitvoerfrequentie

- Moleculair snijden: iedere werkdag van maandag tot en met vrijdag in ZOL Genk.
- Labo-analyse en bio-informatische dataverwerking inclusief kwaliteitscontrole sequencing data: 2 maal per week in CME UZ Leuven.
- Technische data-analyse, biologische interpretatie, klinische interpretatie en rapportering: iedere werkdag van maandag tot en met vrijdag in ZOL Genk.

4 Antwoordtijd

- De totale turn around tijd (TAT) tussen aanvraag van de test in ZOL en het rapporteren van de mutatie-analyse door het ZOL bedraagt maximaal 15 werkdagen. De TAT vanaf ontvangst van het staal op CME in UZLeuven en het rapporteren ervan door ZOL bedraagt 10 werkdagen.
- Bij nood aan intern overleg of bij testen die om technische redenen herhaald moeten worden, kan de antwoordtijd oplopen.

5 Afname instructies

- Conform de richtlijnen van de dienst Pathologische Ontleedkunde.
- Fixatie:
 - Weefsel gefixeerd op 10% gebufferde formaline of CytoRich Red, de tijd tussen afname en fixatie moet minder dan 1 uur zijn.
 - Gefixeerd materiaal mag verder bewaard worden op kamertemperatuur.
 - Op de recipiënten met neutraal gebufferde formol 4% is een vervaldatum vermeld. Het is de verantwoordelijkheid van de aanvrager om de vervaldatum van het fixatief na te kijken. Gebruik geen vervallen fixatief!
- Fixatieduur: 6-72 uur. Indien de fixatieduur <6 uur en >72 uur is het materiaal mogelijk van suboptimale kwaliteit. Dit kan zorgen voor het bekomen van minder betrouwbare resultaten bij de aangevraagde analyses.
- Exclusiecriteria voor uitvoeren van NGS:
 - Stalen zonder tumor of een tumorload $\leq 10\%$. Het percentage tumorcellen bepaalt mede de detectielimiet van de test. Weefsel waarin zones met een hoog percentage tumorweefsel aanwezig zijn, zorgen voor de meest betrouwbare resultaten.
 - Weefsels of lichaamsvochten gefixeerd in andere fixatievloeistoffen dan formol of Cytorich Red (bv. Carnoy, Bouin, B5, AFA). Het Laboratorium zal in dit geval contact opnemen met de aanvragende arts over het verloop van de test.

- Gedecalcificeerd weefsel.

6 Staaltipe en minimale hoeveelheid

- Staaltipe:
 - formol gefixeerd en paraffine ingebed (FFPE) tumorweefsel (eventueel na CRR).
 - biopsie of resectiespecimen, in functie van het staal
- Minimale hoeveelheid:
 - >10% tumorcellen binnen de gemarkeerde zone op de HE-coupe 'voor' de blanco coupes voor NGS.
 - eveneens rekening houden met absolute hoeveelheid tumorcellen / tumorDNA.

7 Transport

- Voor richtlijnen over intern transport, zie [Transport van stalen](#) PO-LG4-0001.
- Dagelijks zullen stalen voor NGS met het transportbedrijf IHCT naar UZ Leuven opgestuurd worden.

8 Methode

8.1 Doel van de test

Opsporen van somatische varianten in vaste weefsel tumoren voor diagnostische, prognostische en/of therapeutische doeleinden.

8.2 Technisch luik van de test

Dit deel van de test wordt uitgevoerd op CME UZ Leuven.

Genomisch DNA wordt enzymatisch gefragmenteerd in fragmenten van gemiddeld 200 bp. Voor elk staal wordt een library bereid met behulp van de KAPA HyperPlus Library Preparation Kit (Roche Diagnostics). Vervolgens worden 6 stalen aangewend voor één capturing in-solution met XGen lockdown probes (IDT) gericht tegen alle exonen (en voor welbepaalde targets inclusief promotorregio's of intronische regio's) van 96 kankergenen en de NimbleGen SeqCap Hybridization and Wash Buffer (Roche Diagnostics). De aangerijkte fragmenten worden nadien geamplificeerd en gesequeneerd op de Illumina Nextseq500, paired-end sequencing.

Analyse met pijplijn versie gcap_19_11.

8.3 Volledig genenpaneel

AKT1, ALK, AMER1, APC, ARAF, ARID1A, ATM, ATRX, BAP1, BCOR, BRAF, BRCA1, BRCA2, CCND1, CCNE1, CDH1, CDK4, CDK6, CDKN2A, CIC, CTNNB1, DDR2, DICER1, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERCC2, ESR1, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FOXL2, FUBP1, GATA3, GLI1, GLI2, GNA11, GNAQ, GNAS, H3F3A, H3F3B, HIST1H3B, HIST1H3C, HRAS, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, LZTR1, MAP2K1, MDM2, MDM4, MET, mTOR, MYC, MYCN, NF1, NF2, NOTCH1, NRAS, PALB2, PDGFRA, PDGFRB, PIK3CA, PIK3R1, POLE, PRDM6, PTCH1, PTEN, RAC1, RAF1, RB1, RET, RICTOR, RNF43, ROS1, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMO, SPRED1, STK11, SUFU, TERT, TP53, TSC1, TSC2, VEGFR3 (FLT4), WT1.

Afhankelijk van de indicatie wordt een subset van de gecapteerde regio's onderzocht. Voor meer details over de subsets per indicatie en de gebruikte transcripten verwijzen we naar bijgevoegde bijlage: [transcripten: https://laboboeken.nexuzhealth.com/bijlage/GHB_CME/CEMOL-MT085-AN01.pdf](https://laboboeken.nexuzhealth.com/bijlage/GHB_CME/CEMOL-MT085-AN01.pdf) en [genenlijst per pathologie: https://laboboeken.nexuzhealth.com/bijlage/GHB_CME/CEMOL-MT085-AN02.pdf](https://laboboeken.nexuzhealth.com/bijlage/GHB_CME/CEMOL-MT085-AN02.pdf).

Aandacht! De onderstaande regio's worden globaal gezien niet voldoende gecovered en dus niet gegenotypeerd: ALK exon 16, BCOR exon 16, BRAF exon 18, FLT4 exon 18, H3F3A exon 4, IDH1 exon 10, LZTR1 exon 7, NOTCH1 exon 15, POLE exon 25, PTEN exon 1 en 9, RB1 exon 15 en 22, RNF43 exon 9.

9 Rapportering

9.1 Terugbetaling

Informatie betreffende de terugbetaling van de moleculair biologische testen met "next generation sequencing" (NGS), zie URL:

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

Minstens 1 van de volgende RIZIV nomenclatuurnummers wordt gebruikt:

- RIZIV: Tarieven art33bis
- RIZIV: Tarieven art33ter

- RIZIV: NGS conventie

9.2 Rapport

Data-analyse, interpretatie en rapportering gebeurt door het NGS team ZOL Genk (technisch eindverantwoordelijken: Laura Coninx, Toon Berghmans en dr. Karen Deraedt; medisch eindverantwoordelijken: dr. Karen Deraedt en dr. Peter Van Eyken).

De analysemethode is geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties te detecteren. De detectielimiet van de test is 5% mutante allelen (10% tumorcellen). We rapporteren elke variant op cDNA niveau (c. notatie) en op proteïne niveau (p. notatie) volgens [HGVS nomenclatuur](http://www.HGVS.org) <http://www.HGVS.org>.

De varianten worden zowel biologisch als klinisch geclassificeerd gebaseerd op de publicatie van 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 & Li, MM et al. 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. J Mol Diagn 2017, 19: 4-23. Voor een gedetailleerd overzicht van de verschillende klassen verwijzen we naar bijgevoegde [bijlage](#).

Het NGS rapport wordt verstuurd naar het elektronisch patiëntendossier HIX. De patholoog rapporteert bovendien de conclusie van het NGS rapport via een aanvullend verslag bij het oorspronkelijk rapport van de vaste tumor.

Revisie overzicht

dd-mm-jjjj	Creatie document	V. Naam
------------	------------------	---------