

Richtlijn Verslaglegging Moleculaire Diagnostiek in de Pathologie - update 2021

Inhoud

Introductie	2
Versie historie	3
Doel van het moleculaire verslag	4
Onderdelen van het moleculair verslag	5
Aanvraag	5
Materiaal.....	5
Methode	5
Resultaten en conclusie	6
Autorisatie	8
Referenties	9

Introductie

Deze richtlijn is onderdeel van het kwaliteitsbeleid van de NVVP. In 2012 is door de toenmalige Werkgroep Moleculaire Diagnostiek Pathologie (WMDP) een eerste richtlijn voor verslaglegging van moleculaire diagnostiek uitgebracht. Deze richtlijn is inmiddels sterk verouderd en naar de stand van wetenschap en praktijk in 2021 niet meer toereikend.

Revisie van de oude richtlijn is uitgevoerd door een werkgroep van klinisch moleculair biologen in de pathologie (KMBP) ingesteld door de sectie Klinisch Moleculaire en Experimentele Pathologie (KMEP) van de NVVP. In de werkgroep zijn tien centra (UMC en niet-UMC) vertegenwoordigd. De richtlijn is afgestemd met de expertisegroep moleculaire pathologie (EMP) waarin KMBP en klinisch pathologen zijn vertegenwoordigd. De gebruikte nomenclatuur in de nieuwe richtlijn is gebaseerd op de huidige internationale standaarden zoals die van de Human Genome Variation Society (HGVS).

Deze richtlijn is een concrete uitwerking van het onderdeel verslaglegging moleculaire diagnostiek van het normendocument moleculaire diagnostiek (ref. 1). In relatie tot de NEN-EN-ISO15189 norm is deze richtlijn een uitwerking van de secties 5.3, 5.5 en 5.8 waar deze betrekking hebben op de rapportage van moleculaire bevindingen in het pathologieverslag, in de richtlijn 'moleculaire rapportage' genoemd. Integratie van het moleculaire rapport en de overige pathologie bevindingen wordt door een patholoog gedaan in het pathologie verslag. Deze richtlijn volgt de PDCA cyclus van de NVVP.

Versie historie

Revisiedatum	Datum vorige versie	Samenvatting van de wijzigingen
26-7-2021	18-06-2021	Versie historie en inhoudsopgave zijn toegevoegd
18-06-2021	09-11-2020	Verwerking commentaar na NVVP ledenraadpleging, te weten: <ul style="list-style-type: none"> - Aanpassing introductie met daarin een verwijzing naar NVVP normendocument m.b.t. verantwoordelijkheden - Termijn her-evaluatie richtlijn opgenomen in introductie - Onderscheid in 'moleculaire rapportage' en 'uiteindelijk pathologie verslag' structureel doorgevoerd in document - Aanpassing passage autorisatie, zodat verantwoordelijkheden (welke in het NVVP normendocument zijn opgenomen) niet specifiek in het document vermeld worden
09-11-2020	28-05-2020	Verwerking commentaar van KMEP, EMP en achterban, te weten: <ul style="list-style-type: none"> - Introductie is toegevoegd aan het document, om te duiden hoe het document tot stand is gekomen en de relatie met ISO15189 te verhelderen. - Het streven naar uniforme verslaglegging middels de PALGA Protocol Module (PPM) is opgenomen in het doel van de moleculaire rapportage. - Aanpassing formulering relevante informatie van gebruikte FISH probes. - Verwijzing naar de PALGA website als mogelijkheid voor test specificaties. - Update over hoe mutaties en translocaties te beschrijven - Aangegeven welke klassen van varianten wel of niet gerapporteerd moeten worden. - Onder resultaten en conclusies is specifiek vermeld dat termen als 'aangetoond/niet aangetoond' of 'aanwezig/afwezig' de minste kans op verwarring geven. - Aanpassing passage autorisatie. - Verwijzing naar de EuroClonality richtlijnen is opgenomen voor rapportage van de analyse van TCR en IG generschikkingen.
28-05-2020	06-2012	Werkgroep Verslaglegging Moleculaire Diagnostiek heeft een voorstel geschreven voor de revisie van 'WMDP-richtlijn verslaglegging moleculaire diagnostiek in de pathologie'. <ul style="list-style-type: none"> - Alle elementen van deze richtlijn uit 2012 zijn aangepast naar het huidige inzicht en uitgebreid ten behoeve van uniforme verslaglegging van hoog complexe moleculaire diagnostiek.

Doel van de moleculaire rapportage

- Informeren aanvrager (patholoog en/of behandeld arts);
- Duiding van moleculaire bevindingen;
- Duidelijk en ondubbelzinnig compleet doch compact vastleggen van uitgevoerde moleculaire analyses en resultaten;
- Streven naar uniforme verslaggeving van moleculaire resultaten via het landelijk beschikbare PALGA. De PALGA Protocol Module (PPM) Moleculaire Bepalingen voor rapportage wordt aanbevolen, i.v.m. volledigheid, bescherming van het moleculaire verslag, borging van de autorisatie en gestructureerde data opslag.

Onderdelen van de moleculaire rapportage

N.B.: De volgorde en groepering van de hieronder beschreven onderdelen van de moleculaire rapportage is niet bepalend voor de opbouw van de moleculaire rapportage.

Aanvraag

1. Naam uitvoerende pathologie afdeling bij uitbesteding, indien niet elders in het pathologie verslag vermeld. Aanvragend centrum (bij consult) moet herleidbaar zijn.
2. Reden aanvraag en omschrijving van de test.
Bijvoorbeeld: mutatie-analyse GIST i.v.m. therapiekeuze, fusiegen-analyse sarcoom i.v.m. differentiaal diagnose, mutatie-analyse colorectaal carcinoom i.v.m. klonaal verwantschap.

Materiaal

3. Uitgangsmateriaal: type en nummer.
 - Nummer: oorspronkelijk T/C-nummer (indien anders dan het nummer waarop de test is aangevraagd) en onderverdeling.
 - Type materiaal.
Bijvoorbeeld: FFPE, cytologisch materiaal, elders reeds geïsoleerd nucleïnezuur uit weefsel of plasma
 - Bij materiaal van elders naast oorspronkelijk nummer ook het centrum vermelden.
 - Bij een op zichzelf staande moleculaire rapportage is het aanbevolen om:
 - I) aard van het materiaal te vermelden, en
 - II) de extern gestelde diagnose als zodanig in het uiteindelijke pathologie verslag over te nemen (waarbij expliciet vermeld wordt dat het om een extern gestelde diagnose gaat).
4. Bij DNA/RNA isolatie het geschatte percentage neoplastische/afwijkende cellen opnemen in het rapport. Het moet herleidbaar zijn door welke bevoegde medewerker dit bepaald/gecontroleerd is (indien het niet middels initialen opgenomen is in het rapport, dan moet het wel vastgelegd en beschikbaar zijn).

Methode

5. Omschrijving van gebruikte methode en testspecificaties. Er wordt onderscheid gemaakt tussen informatie die in de moleculaire rapportage opgenomen moet worden (5.1) en informatie die (ten minste) elders beschikbaar is (5.2).
- 5.1 In de moleculaire rapportage een beknopte omschrijving van de moleculaire test opnemen met tenminste:
 - Gebruikte techniek.
Bijvoorbeeld: NGS, Sanger, HRM, FISH
 - Naam en versienummer van het NGS panel, naam commerciële kit, leverancier en indien relevant catalogus nummer van ISH probes.
 - Wanneer de panel grootte het toelaat, kunnen alle geteste genen/afwijkingen vermeld worden. Echter, bij toenemende grootte kan deze informatie beperkt worden tot de voor de vraagstelling relevante geteste genen of afwijkingen, op geleide van de huidige inzichten, vigerende richtlijn en/of interne afspraken.

- 5.2 In de moleculaire rapportage vermelden of middels verwijzing naar een extern toegankelijke en gewaarborgde website (bij voorkeur de PALGA website www.PALGA.nl/professionals/moleculaire-bepaling.html):
- Relevante testspecificaties voor de uitgevoerde test.
Bijvoorbeeld: analytische sensitiviteit en specificiteit, minimaal percentage neoplastische/verdachte cellen, minimaal te analyseren aantal cellen (bij in situ analyse), waarde waarboven (F)ISH beeld afwijkend is, minimale VAF (Variant Allel Frequentie), minimale NGS coverage.
 - Gedetailleerde informatie van de test. Deze informatie is test-afhankelijk en bevat alle elementen die relevant zijn voor vakspecialisten om een inschatting te kunnen maken van de omvang en kwaliteit van de test.
Bijvoorbeeld: de geteste genen, referentie nummers en exons/codons/percentage coderende sequentie en oriëntatie voor fusietranscript detectie bij NGS analyse.

Resultaten en conclusie

6. Termen als aangetoond/niet aangetoond of aanwezig/afwezig geven de minste kans op verwarring. Beschrijving van de resultaten zijn hieronder onderverdeeld in detectie van varianten/mutaties (6.2), breuken en fusiegenen (6.3) en afwijkingen in het aantal gen kopieën (6.4). Voor de rapportage van de analyse van TCR en IG genherschikkingen verwijzen we naar de internationale EuroClonality richtlijnen (zie referentie 2).
- 6.1 Relevante afwijkingen van testspecificaties, welke van invloed kunnen zijn op de verkregen resultaten, moeten duidelijk aangegeven zijn.
Bijvoorbeeld: niet alle voor de vraagstelling relevante genen kunnen betrouwbaar worden geanalyseerd, niet alle tumorcellen laten het afwijkende patroon zien (bij ISH analyse), VAF van gevonden afwijking(en) niet passend bij ingeschat tumorcelpercentage (bij sequentie analyse).
- 6.2 Detectie van varianten/mutaties:
- 6.2.1 Voor de classificatie van varianten wordt het 5 klasse systeem aanbevolen (zie referentie 3, guidelines ACMG/AMP), waarbij klasse 1 een benigne variant betreft en klasse 5 een pathogene variant/mutatie is (in rapportage wordt terminologie 'pathoog' aanbevolen en niet 'klasse 5'). In deze richtlijn wordt geen specifieke voorkeur uitgesproken voor het gebruik van de termen 'variant' of 'mutatie'. Wel is het gebruik van het woord 'mutatie' in deze richtlijn beperkt tot de klasse 4 en 5 varianten.
- 6.2.2 Welke varianten worden opgenomen in de moleculaire rapportage:
- Klasse 4 en 5 varianten/mutaties altijd opnemen (waarbij klasse 4 en 5 normaliter gelijkwaardige consequenties hebben); klasse-aanduiding is optioneel. Functionele duiding is gewenst indien het een bijzondere variant/mutatie betreft met mogelijke klinisch consequentie
Bijvoorbeeld: mutaties die geassocieerd zijn met gevoeligheid voor specifieke behandeling.
 - Klasse 1 en 2 varianten in principe niet opnemen.
 - Terughoudend zijn met rapportage van klasse 3 varianten (ook bekend als 'VUS' [variant of unknown significance']), onder andere i.v.m. het risico op over interpretatie. Overwegingen om klasse 3 varianten wel te rapporteren kunnen zijn:
 - I) klonaal vergelijk waarbij er geen klasse 4 of 5 varianten/mutaties zijn welke uitsluitsel kunnen geven,
 - II) het gen is relevant voor de aanvraag.
 - Bij rapportage van klasse 3 varianten is het belangrijk om expliciet te vermelden dat het gaat om een variant met 'onbekende pathogeniciteit'.

6.2.3 Variant rapportage:

- Volgens standaardnomenclatuur (HGVS), voorkeur voor 1 letter aminozuurcode in verband met klinische literatuur waarin deze annotatie meestal gebruikt wordt, om de communicatie met de kliniek te vergemakkelijken. Bij gebruik van de 3-letter aminozuurcode wordt voor 'hotspot mutaties' aangeraden de 1 letter aminozuurcode (als alias) te vermelden.
- Referentie sequentie nummer (LRG, NM of ENST nummers), toevoeging van het transcript variant (bij LRG) of transcript versie nummer (bij NM) wordt aangeraden.
- De VAF van de gevonden mutatie/variant dient vermeld te worden indien vastgesteld.
Bijvoorbeeld: BRAF [NM_004333.6] exon 15: c.1799T>A p.(V600E) – VAF: 41%
BRAF [NM_004333.6] exon 15: c.1799T>A p.(Val600Glu alias V600E) – VAF: 41%
- Gebruik van * i.p.v. 'Ter' of 'Stop'.
- Voorkeur voor korte notatie bij frameshift.
*Bijvoorbeeld: p.(K344fs) in plaats van p.(K344Sfs*8)*

6.3 Detectie van breuken en fusiegenen. Er wordt onderscheid gemaakt tussen *in situ* hybridisatie (6.3.1) en overige analyses (6.3.2):

6.3.1 De rapportage van breuken en fusiegenen door middel van *in situ* hybridisatie (FISH, BRISH, CISH) bevat:

- Gen naam of chromosomale regio
- Interpretatie van het gedetecteerde patroon.
Bijvoorbeeld: breuk aangetoond, passend bij fusie, geen breuk aangetoond, geen fusie aangetoond, afwijkend patroon, verlies van het 3`signaal, complex patroon, niet te beoordelen.
- Inschatting van het aantal/percentage kernen met een signaal passend bij een breuk of fusiegen is wenselijk.
Bijvoorbeeld: 53% van de kernen, 67 van de 102 getelde kernen, een subset van de geanalyseerde kernen.
- Bij een afwijkend complex/dubieus patroon, anders dan het generieke patroon passend bij een breuk/fusie, dient het aanwezige beeld beschreven te worden in algemene termen. De kleur van het fluorescente label van de 5'-, 3'-, gen specifieke probes is test specifiek en derhalve op zichzelf niet informatief.

6.3.2 De beschrijving van het resultaat van fusiegen analyse met behulp van NGS, RT-PCR en andere multiplex technieken.

Opmerking: De standaardnomenclatuur (HGVS) voor fusietranscript rapportage is per april 2020 beschikbaar gekomen. Hierbij wordt de fusie geannoteerd op coderende positie op het RNA (r.). Hoewel de positie van exonen formeel niet op transcript-niveau is vastgelegd, kiest de werkgroep voor onderstaande annotatie op exon niveau i.v.m. de leesbaarheid en gebruik hiervan in klinische literatuur.

De rapportage bevat:

- Gen namen van beide fusiepartners (indien bekend), inclusief transcript ID (LRG, NM of ENST nummers; transcript variant of transcript versie nummer wordt aangeraden).
- Indien de fusiepartner bekend is, complete rapportage van het fusietranscript in de resultaat sectie en beknopte rapportage in de conclusie.
Bijvoorbeeld:
resultaat: CCDC6-RET fusietranscript: CCDC6 [NM_005436.5] exon 1::RET [NM_020630.5] exon 12 aangetoond
conclusie: CCDC6-RET fusie aangetoond
- Indien fusiepartner onbekend is, bij voorkeur de term 'aanwijzingen voor' gebruiken.
Bijvoorbeeld: 'aanwijzingen voor RET fusie, fusiepartner onbekend' in resultaat en conclusie sectie
 - Indien uit de analyse blijkt dat de fusie gepaard gaat met een verlies of insertie van nucleotiden of niet op de exon-grens valt, moet dit in de moleculaire rapportage worden opgenomen.

6.4 Detectie van afwijking in het aantal gen kopieën, ook wel bekend als 'CNV' (gangbare afkorting van de Engelstalige term 'copy number variation'). Er wordt onderscheid gemaakt tussen *in situ* hybridisatie (6.4.1) en overige analyses (6.4.2).

6.4.1 De rapportage van CNV analyse door middel van *in situ* hybridisatie (FISH, BRISH, CISH) bevat:

- Gen naam of chromosomale regio.
- Interpretatie van het gedetecteerde patroon.
Bijvoorbeeld: amplificatie, (homozygote) deletie
- Inschatting van het aantal/percentage kernen met een signaal passend bij de CNV is wenselijk.
- Bij amplificaties kan een kwantitatieve omschrijving van het signaal noodzakelijk zijn t.b.v. vergelijking met literatuur en in richtlijn bepaalde afkapwaarden.
Bijvoorbeeld: ratio ($R = \text{gen-specifiek [aantal spots]} / \text{referentie probe [aantal spots]}$) en het gemiddeld aantal kopieën per kern.
- Bij een afwijkend complex/dubieus patroon, anders dan het generieke patroon passend bij een CNV, dient het aanwezige beeld beschreven te worden in algemene termen. De kleur van het fluorescente label van gen specifieke en referentie probes is test specifiek en derhalve op zichzelf niet informatief.
Bijvoorbeeld: in de trisomie analyse werden er 3 kopieën gevonden van zowel 13q41, 18p11-q11 als 21q22, hetgeen duidt op een triploidie in plaats van een trisomie.

6.4.2 De rapportage van CNV analyse door middel van NGS, MLPA of andere multiplex technieken bevat:

- Gen naam of chromosomale regio.
- Interpretatie van de resultaten.
Bijvoorbeeld: amplificatie, (homozygote) deletie, (CN-)LOH
- Het is wenselijk om een inschatting te geven van het aantal kopieën, al dan niet middels een afgeleide.
Bijvoorbeeld voor NGS: gebruik relatieve coverage of 'fold change', zie referentie 4.

7. Interpretatie van de resultaten en conclusie:

De moleculaire conclusie moet een bondige samenvatting van het moleculaire resultaat bevatten dat voor de aanvrager eenduidig te interpreteren is. Dit is van primair belang voor de diagnose en/of therapiekeuze. Het bevat:

- Analytische interpretatie van het relevante testresultaat. Het is niet alleen van belang om aangetoonde afwijkingen te vermelden, ook niet aangetoonde afwijkingen kunnen vermeld worden op geleide van de huidige inzichten, vigerende richtlijn en/of interne afspraken. - Omschrijving van de afwijking in klinisch herkenbare terminologie/categorie.
Bijvoorbeeld: BRAF p.(V600E) mutatie, mutatie in KIT exon 11, in frame deletie in EGFR exon 19, ALK fusie, 'p16-Leiden-mutatie'.
- Eventuele opmerkingen naar aanleiding van het testresultaat.
Bijvoorbeeld: duiding van de gevonden afwijking in de context van therapie-gevoeligheid of -resistentie, verwijzing naar Moleculaire Tumor Board voor therapieadvies, advies verwijzing naar klinische genetica; wanneer materiaal ongeschikt is voor analyse, een verzoek om ander materiaal in te sturen; aangeven dat vervolgonderzoek naar aanleiding van de bevinding is ingezet.

Autorisatie

8. Datum van moleculaire rapportage moet vastgelegd zijn net als de naam van de persoon die het moleculaire resultaat heeft geautoriseerd en/of gerapporteerd.

Referenties

1. Normendocument voor de Moleculaire Diagnostiek in de Pathologie.
Vastgesteld in bestuur 4-11-2014 na ledenraadpleging en besproken in ALV 5-11-2014
<https://pathology.nl/wp-content/uploads/2017/01/Bijlage-2-ALV-Sectie-Klinische-Pathologie-Normendocument-1.pdf>
2. A W Langerak 1 , P J T A Groenen, M Brüggemann, K Beldjord, C Bellan, L Bonello, E Boone, G I Carter, M Catherwood, F Davi, M-H Delfau-Larue, T Diss, P A S Evans, P Gameiro, R Garcia Sanz, D Gonzalez, D Grand, A Håkansson, M Hummel, H Liu, L Lombardia, E A Macintyre, B J Milner, S Montes-Moreno, E Schuurin, M Spaargaren, E Hodges, J J M van Dongen:
EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia* 2012 Oct;26(10):2159-71.
doi: 10.1038/leu.2012.246
Nederlandse uitwerking beschikbaar via <http://www.euroclonality.org>
3. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee: 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 May;17(5):05-2.
doi: 10.1038/gim.2015.30.
4. Eijkelenboom A, Tops BBJ, van den Berg A, van den Brule AJC, Dinjens WNM, Dubbink HJ, Ter Elst A, Geurts-Giele WRR, Groenen PJTA, Groenendijk FH, Heideman DAM, Huibers MMH, Huijsmans CJJ, Jeuken JWM, van Kempen LC, Korpershoek E, Kroeze LI, de Leng WWJ, van Noesel CJM, Speel EM, Vogel MJ, van Wezel T, Nederlof PM, Schuurin E, Ligtenberg MJL:
Recommendations for the clinical interpretation and reporting of copy number gains using gene panel NGS analysis in routine diagnostics. *Virchows Arch.* 2019 Jun;7(6):673-680.
doi: 10.1007/s0028-019-02555-3.