

Technische bijlage: Delta Oncoscreen v2 NGS panel

1. Analyse methode

DNA wordt geëxtraheerd uit FFPE materiaal d.m.v. de Roche Cobas Sample Preparation kit. Aanrijking van de regions of interest (ROI) voor targeted sequencing gebeurt op basis van hybrid capture technologie met de Nimblegen SeqCap EZ HyperCap workflow (Roche). Sequencing wordt uitgevoerd op een Illumina MiSeq systeem met minimaal beoogde 300x coverage.

Het Delta Oncoscreen v2 panel is een in-house ontwikkeld gen panel voor:

- [de identificatie van somatische mutaties](#) in onderstaande target genen en ROI. Een aantal genen worden full-exome gesequenced (BRCA1, BRCA2, CDKN2A, ERBB3, GATA3, PTEN, TP53). Voor de meeste genen wordt de sequencing gefocust op exonen waarin gekende actionable mutations of hotspots zijn beschreven (MyCancerGenome, Cosmic, Clinvar). Voor BRCA1 en BRCA2 worden de 20 nucleotiden vóór en na het exon eveneens gesequenced. Voor de detectie van MET exon 14 skipping mutaties werd exon 14 uitgebreid met het einde van intron 13 en het begin van intron 14.

Gene	Chromosome	exon	Gene	Chromosome	exon
AKT1	chr14	exon 3, 4,6,10,11,14	HRAS	chr11	exon 2-4
ALK	chr2	exon 19-29 (+ intron 19)	IDH1	chr2	exon 4
BRAF	chr7	exon 7-11 (+introns), 12,15	IDH2	chr15	exon 4
BRCA1	chr17	exon 1-23 (full)	KIT	chr4	exon 2,8-15,17-18
BRCA2	chr13	exon 1-28 (full)	KRAS	chr12	exon 2-4
CDKN2A	chr9	exon 1-3 (full)	MET	chr7	exon 2,11,14,16,19,21
CTNNB1	chr3	exon 3	NRAS	chr1	exon 2-4
DPYD	Chr1	Exon 11,13,14,22	NRG1	chr8	exon 3-4 (+ intron)
EGFR	chr7	exon 18-21	NTRK1	chr1	exon 8-13 (+ introns)
ERBB2	chr17	exon 8,11-22,27	PDGFRA	chr4	exon 5-7,9,10,12,14, 15,18,23
ERBB3	chr12	exon 1-28 (full)	PIK3CA	chr3	exon 2,3,10,11,21
ERBB4	chr2	exon 8,10,12,14,18,20, 21,23	POLD1	chr19	exon 8-12
ESR1	chr6	exon 3-8	POLE	chr12	exon 9-14
FGFR2	chr10	exon 17-18 (+ intron)	PTEN	chr10	exon 1-9 (full)
GATA3	chr10	exon 1-6 (full)	RET	chr10	exon 7-13 (+ introns), 14-16
H3F3A	chr1	exon2	ROS1	chr6	exon 31-36 (+ introns), 27-42
H3F3B	chr17	exon2	TERT	chr5	promoter + exon1
HIST1H3B	chr6	exon 1	TP53	chr17	exon 2-11 (full)
HIST1H3C	chr6	exon 1			

Het Delta Oncoscreen v2 panel is verder uitgerust met ROI voor

- de detectie van **Microsatellite Instability (MSI)**: met standaard analyse van 12 merker regio's in KIF5B, KMT2A, CDK4, FLT1, GRIN2A, EML4, MSH6, BCL2L11, SMARCB1, TGFBR2, PBRM1 en KDM6A. MSI wordt gescoord via het **mSINGS script** door analyse van de indel distributie op een panel van 15 merker regio's beschreven door Salipante SJ et al. (Clin Chem. 2014 Sep;60(9):1192-9) waarvan finaal 12 regio's voldoende coverage en variatie haalden in het Delta Oncoscreen v2 voor verdere analyse.
- de detectie van **1p/19q co-deletie, chromosome 7 gain en 10q deletie** (*in validatie, niet standaard gerapporteerd*)
- de detectie van **Copy Number Variations (CNV)** (oa. EGFR, ERBB2 (HER2), MET en andere) na geometrische normalisatie van de verticale coverage per ROI via **ARGEON** (All ROI GEometric Normalization). (*in validatie, enkel CNV die diagnostisch of therapeutisch relevant geacht worden gerapporteerd*).
- de detectie van **translocaties/fusies** (ALK, BRAF, FGFR2, NRG1, NTRK1, RET, ROS1) (*in validatie, niet standaard gerapporteerd*)

2. Detectie limiet

Standaard worden varianten gerapporteerd met Variant Allele Frequency (VAF) > 5% (operationele detectie limiet).

De detectielimiet van de methode wordt bepaald door de regio-specifieke diepte van coverage en het percentage tumor cellen in het staal. Globaal bedraagt de detectielimiet 3% VAF. Voor sommige genen kunnen varianten met een lagere VAF (tot 1%) toch betrouwbaar worden geïdentificeerd.

Bij de bioinformatische analyse wordt primair gefocust op varianten met VAF > 5%, en deze worden altijd standaard gerapporteerd. In tweede instantie wordt ook gekeken naar varianten die voorkomen aan VAF 1-5%; deze worden enkel gerapporteerd indien ze klinisch relevant worden geacht voor therapie (b.v. T790M) of prognose (totale mutatie load).

Een minimaal tumorcelpercentage van 10% is vereist voor een conclusief resultaat indien geen varianten > VAF 5% worden teruggevonden.

Voor de detectie van MSI met NGS (MSI-NGS) daalt de gevoeligheid naarmate het tumor cel percentage van het preparaat daalt, door verdunning van tumorale reads met mogelijke afwijkende repeat indel distributie met normale repeat indel distributie van niet-tumorale cellen. Een formele detectie limiet kon niet worden vastgesteld maar bij tumor cel percentages < 30% wordt het resultaat steeds onder voorbehoud beschouwd. Monsters die als MSI worden gescoord via MSI-NGS worden onafhankelijk bevestigd met immunohistochemische analyse van MMR eiwitten.

Ook voor de detectie van CNV (gen amplificaties en deleties) met NGS daalt de gevoeligheid naarmate het tumor cel percentage van het preparaat daalt, en naarmate de gen amplificatie kwantitatief minder sterk is. Een formele detectie limiet kon niet worden vastgesteld maar bij tumor cel percentages < 30% wordt het resultaat steeds onder voorbehoud beschouwd. Indien een FISH methode lokaal beschikbaar is, zullen klinisch relevante afwijkende resultaten indien diagnostisch of therapeutisch relevant worden bevestigd via FISH.

3. Bioinformatische analyse

De bioinformatische analyse van de sequencing data gebeurt met diverse software modules:

- Ruwe data worden gegenereerd door de Illumina MiSeq software (RTA) als FASTQ files (text-based nucleotide sequence files)
- Nazicht van de sequencing quality metrics (cluster density, clusters passing filter, reads passing filter, duplicates,...) met de Illumina Sequencing Analysis Viewer (SAV v1.8) en MiSeq Reporter (v2.5.1)
- Mapping van de ruwe data aan de referentiesequentie (hg19) met vorming van BAM (Binary Alignment Map) files, alignment, quality filtering en variant calling gebeurt met de SeqNext module van de SeqPilot Software (v5.0.0 build 505, JSI medical systems GmbH, Ettenheim, Germany). De variant calling (identificatie van klinisch relevante varianten) in SeqNext is geprogrammeerd in twee resultaten viewers:
 - 1) Analyse van varianten met VAF > 5% (gemiddelde van forward en reverse > 5%): deze varianten worden standaard altijd gerapporteerd en beschouwd als klinisch relevant
 - 2) Analyse van varianten met VAF 1-5% (per direction, dus >1% bij zowel forward als reverse): deze varianten worden standaard niet gerapporteerd, maar wel indien klinisch relevant geacht (b.v. T790M) in functie van klinische vraagstelling en tumor percentage.
 - 3) Globaal worden varianten pas gerapporteerd indien aan minimale criteria inzake coverage is voldaan:
 - Minimale absolute coverage moet 50x zijn in beide richtingen (forward en reverse)
 - Minimale required coverage van een variant (combinatie van beide richtingen) moet minimaal 100x zijn
 - Globaal wordt gestreefd naar totale coverage van 300x. Onder 300x coverage wordt een waarschuwing gegenereerd en wordt de analyse verworpen of het resultaat onder voorbehoud gecommuniceerd.
- MSI/MSS analyse via NGS (MSI-NGS) wordt uitgevoerd via het mSINGS Python script (Salipante, Clin Chem 2014). Hierbij worden sequencing reads gealigneerd tegenover het referentiegenoom via SAMtools, resulterend in een mpiliup file met een samenvatting van de gemapte reads op base resolutie. Microsatellite instability resulteert in een verhoogde distributie van indel lengths voor repetitieve regio's, en deze worden geteld via VarScan. Deze locus-specifieke indel distributie wordt vervolgens door mSINGS gescoord en binair vergeleken met de distributie (aantal geïntegreerde discrete indel pieken) van een referentie set van MSS-controle stalen. Voor elk van de 12 loci wordt zo bepaald of de indel distributie afwijkend (1) of normaal (0) is tegenover de referentie set, en de som over deze 12 regio's resulteert in een mSINGS score van 0 tot 12 op 12, waarbij een monster als MSI wordt beschouwd indien meer dan 20% van de regio's instabiel is (score van 3/12 of hoger).
- CNV wordt bepaald op basis van afwijkingen in de verticale coverage (depth of coverage) van individuele ROIs, na geometrische normalisatie met alle ROIs binnen datzelfde staal via het in-house ontwikkeld ARGEON algoritme. Per ROI werden na verwijdering van outliers referentiewaarden berekend op een referentie set van N=400 stalen voor verlaagde (deletie) of verhoogde (amplificatie) geometrisch genormaliseerde coverage en op basis daarvan z-scores toegekend.

4. Rapportering

Standaard worden enkel pathogene varianten gerapporteerd met therapeutisch en/of prognostische waarde, volgens tumor-specifieke gen panels. De benoeming van de varianten gebeurt steeds op basis van de referentiesequenties vermeld in onderstaande tabel:

PANEL	GEN	REFERENTIESEQUENTIE	PANEL	GEN	REFERENTIESEQUENTIE	
BORST	AKT1	NM_005163.2	HERSENEEN	BRAF	NM_004333.5	
	BRCA1	NM_007294.3		H3F3A	NM_002107.5	
	BRCA2	NM_000059.3		H3F3B	NM_005324.5	
	DPYD	NM_000110.3		HIST1H3b	NM_003537.3	
	ERBB2	NM_004448.3		HIST1H3c	NM_003531.2	
	ERBB3	NM_001982.3		IDH1	NM_005896.3	
	ESR1	NM_000125.3		IDH2	NM_002168.3	
	GATA3	NM_002051.2		TERT	NM_198253.2	
	PIK3CA	NM_006218.4		TP53	NM_000546.5	
	PTEN	NM_000314.7		LONG	ALK	NM_004304.5
	TP53	NM_000546.5			BRAF	NM_004333.5
COLON/MAAG	BRAF	NM_004333.5	CDKN2A		NM_000077.4	
	DPYD	NM_000110.3	EGFR		NM_005228.5	
	ERBB2	NM_004448.3	ERBB2		NM_004448.3	
	ERBB3	NM_001982.3	KRAS		NM_004985.4	
	KRAS	NM_004985.4	MET		NM_000245.3	
	NRAS	NM_002524.5	PIK3CA		NM_006218.4	
	PIK3CA	NM_006218.4	RET		NM_020975.6	
	TP53	NM_000546.5	ROS1		NM_002944.2	
DESMOID	BRAF	NM_004333.5	TP53		NM_000546.5	
	CTNNB1	NM_001904.4	MELANOOM	BRAF	NM_004333.5	
	RET	NM_020975.6		KIT	NM_000222.2	
ENDOMETRIUM	BRCA1	NM_007294.3		NRAS	NM_002524.5	
	BRCA2	NM_000059.3	OVARIUM	BRCA1	NM_007294.3	
	POLD1	NM_001256849.1		BRCA2	NM_000059.3	
	POLE	NM_006231.3		TP53	NM_000546.5	
	PTEN	NM_000314.7	PANCREAS	BRCA1	NM_007294.3	
	TP53	NM_000546.5		BRCA2	NM_000059.3	
	GIST	BRAF		NM_004333.5	CDKN2A	NM_001904.4
KIT		NM_000222.2		DPYD	NM_000110.3	
PDGFRA		NM_006206.6		KRAS	NM_004985.4	
			TP53	NM_000546.5		

Varianten worden gerapporteerd op basis van de HGVS nomenclatuur voor de beschrijving van sequentie varianten (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>). Er wordt gebruik gemaakt van de hg19 versie (UCSC, 27 februari 2015) van het humane genoom (overeenkomend met GRCh37). Klinische interpretatie gebeurt op basis van www.mycancergenome.org, COSMIC database (<http://grch37-cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>), Clinvar database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), Seshat database (specifiek voor TP53; <http://vps338341.ovh.net/>).

Standaard wordt voor alle monsters ook de MSI/MSS score gerapporteerd.

CNV worden enkel gerapporteerd indien diagnostisch en/of therapeutisch relevant, met de vermelding dat het resultaat onder voorbehoud is zonder confirmatie via onafhankelijke FISH.

Bio-informatische analyse en klinische interpretatie van de niet-standaard gerapporteerde genen is mogelijk op verzoek. De resultaten van deze analyse zullen worden toegevoegd aan het algemeen besluit, met vermelding dat het om een niet-gevalideerd gen gaat.