

**Informatie voor aanvragers
van cytogenetische diagnostiek
bij hematologische maligniteiten**

Laboratorium Tumorcelgenetica (LTG)
Radboudumc

Radboudumc

Inhoudsopgave

Introductie	3
Aanvragen en belangrijke informatie voor aanvragers	4
Benodigde materialen	5
Acute Myeloïde Leukemie (AML)	6
Acute Promyelocyten Leukemie (APL)	6
Chronische Myeloïde Leukemie (CML)	6
Atypische CML	7
Myelodysplastisch neoplasie (MDS)	7
Aplastische Anemie / Paroxysmale Nachtelijke Hemoglobinurie (PNH)	7
Myeloproliferatieve neoplasie (MPN)	8
Chronische myelomonocyttaire leukemie (CMML)	8
Mastocytosis	8
Myeloïde en lymfoïde neoplasie met eosinofilie en tyrosinekinase gen fusie	9
Acute Lymfatische Leukemie (ALL)	9
Chronische Lymfatische Leukemie (CLL)	9
Plasmacel neoplasie (multipel myeloom, MGUS en amyloïdose)	10
Non-Hodgkin lymfoom (NHL) en Hodgkin lymfoom	10
Hairy Cell Leukemie (HCL)	11
Lymfoplasmacytair lymfoom (LPL, Waldenström)	11
T-cel prolymfocyten leukemie (T-PLL)	12

Introductie

In deze folder vindt u informatie voor het aanvragen van de laboratoriumdiagnostiek bij hematologische maligniteiten in het Laboratorium Tumorgenetica (LTG), Radboudumc Nijmegen. Per ziektebeeld is globaal aangegeven welke cytogenetische (en eventueel moleculaire) diagnostiek relevant is.

Tegenwoordig wordt een breed spectrum van laboratoriumonderzoeken gebruikt bij de hemato-oncologische diagnostiek, inclusief morfologie, immuunfenotypering, cytogenetica, pathologie en moleculair biologisch onderzoek van bloed, beenmerg, liquor en weefsels. In het Radboudumc bestaat een intensieve samenwerking tussen het laboratorium Hematologie en het Laboratorium Tumorgenetica (LTG; samenwerking Genetica en Pathologie), waarbij de logistiek omtrent onderzoeksaanvragen centraal wordt gecoördineerd. Hierdoor kunt u als externe aanvrager alle hemato-oncologische onderzoeken via één aanvraagformulier aanvragen (regio Nijmegen).

Voor aanvragen vanuit regio Enschede is een apart aanvraagformulier beschikbaar.

Door middel van het aangeboden diagnostisch pakket kan een compleet inzicht voor diagnosestelling verkregen worden, conform de actuele richtlijnen en inzichten (WHO 2022, ICC en European Leukemia Network (ELN) 2022).

De landelijke richtlijnen van de NVvH voor oncologische hematologie kunt u vinden op www.hematologienederland.nl.

Regionale afspraken over diagnostiek en behandelprotocollen voor hematologische ziektebeelden in regio Nijmegen (Radboudumc) kunt u vinden op www.hematologie-wijzer.nl.

Aanvragen en belangrijke informatie voor aanvragers

Aanvraagformulieren kunt u downloaden via de website van het Laboratorium Tumorgenetica (www.radboudumc.nl/LTG, aanvraagformulier Nijmegen of aanvraagformulier Enschede)

Het materiaal dient **op de dag van afname** vóór 16:00 uur aan te komen op het afleveradres. Op vrijdag materialen aanleveren vóór 12.00 uur, zodat het nog kan worden verwerkt. Indien materiaal na 16:00 uur of op vrijdag na 12:00 uur zal arriveren is vooraf overleg noodzakelijk. Hetzelfde geldt voor materiaal dat buiten reguliere werkdagen zal arriveren. De materialen dienen **bij kamertemperatuur** verzonden te worden, **voorzien van een deugdelijke identificatie (naam, geslacht en geboortedatum) en een volledig ingevuld aanvraagformulier.**

Bij annulering na de dag van ontvangst is de verwerking van het materiaal al in gang gezet en wordt het onderzoek (volledig) gedeclareerd.

Afleveradres voor insturen van materialen regio Nijmegen

Radboud UMC
Radboud Laboratorium voor Diagnostiek (RLD)
Routenummer 815
Postbus 9101
6500 HB Nijmegen

Afleveradres voor insturen van aanvragen Regio Enschede

Medisch Spectrum Twente
Genoomdiagnostiek, route G11
Postbus 50000
7500 KA Enschede

Contact

	Telefoon nummer	E-mail
Secretariaat LTG	024-36 13799	gen@radboudumc.nl
ALLEEN voor SPOED bv FISH <i>PML::RARA</i> bij APL verdenking	06-31117503 (Marian) 06-50026003 (Daniel)	marian.stevens-kroef@radboudumc.nl daniel.oldeweghuis@radboudumc.nl

Benodigde materialen

Cytogenetica

- bij indicatie CLL: 6 ml bloed, EDTA buis (paarse dop)
- bij indicaties LPL en HCL: 6 ml beenmerg, EDTA buis (paarse dop)
- bij alle ander indicaties: 2-5 ml beenmerg, Li-heparinebuis (groene dop)
- in geval van dry tap en/of >5% blasten in perifeer bloed: 6 ml bloed

Moleculaire diagnostiek Lymfoïd

- Bij indicaties LPL en HCL: 6 ml beenmerg, EDTA buis (paarse dop)
- Bij indicaties CLL en HCL: 6 ml bloed, EDTA buis (paarse dop)

Acute Myeloïde Leukemie (AML)

Cytogenetica

- standaard wordt karyotypering uitgevoerd
- standaard interfase FISH naar 11q23 (*KMT2A*)- en 3q26 (*MECOM*)-rearrangements
- als aanvullende test (bij geen of onvoldoende delingen) genoomwijde array

Toelichting

De diagnose en classificatie van AML wordt gesteld aan de hand van morfologisch onderzoek, immuunfenotypering en de aanwezigheid van bepaalde moleculaire en cytogenetische afwijkingen (ICC en WHO2022).

Daarnaast wordt er met cytogenetisch onderzoek en moleculaire diagnostiek (middels het AML diagnose panel) gekeken naar genetische afwijkingen en mutaties die volgens ELN2022 relevant zijn voor prognose.

Acute Promyelocyten Leukemie (APL)

Cytogenetica

- standaard karyotypering voor t(15;17)(q24.1;q21.2) of variante translocaties en/of additionele afwijkingen
- (spoed) interfase FISH naar *PML::RARA* fusie /t(15;17)

Voor spoed-FISH aanvragen naar *PML::RARA* contact opnemen met telefoonnummer: 06 31117503
De uitslag is bekend binnen 24 uur (indien sample voor 10:00 uur bij ons binnen is, kan normaliter dezelfde dag een uitslag gegeven worden).

Toelichting

APL wordt gezien als een aparte entiteit binnen de groep van AML, als gevolg van de kenmerkende translocatie t(15;17) die leidt tot het *PML::RARA* fusiegen. APL kan gepaard gaan met ernstige complicaties, met name diffuse intravasale stolling. Daarom is bij een verdenking op APL zo spoedig mogelijk gerichte diagnostiek en therapeutisch ingrijpen noodzakelijk, waarbij bevestiging van de diagnose door het vaststellen van *PML::RARA* of t(15;17) niet hoeft worden afgewacht. Laag en intermediair risico APL heeft een betere prognose dan andere AML subtypen door de goede respons op ATRA en arsenicum trioxide.

Chronische Myeloïde Leukemie (CML)

Cytogenetica

- standaard karyotypering voor t(9;22)(q34;q11.2) en eventuele additionele afwijkingen
- als aanvullende test (bij geen of onvoldoende delingen) interfase FISH naar *BCR::ABL1*

Toelichting

CML is een myeloproliferatieve aandoening die ontstaat uit abnormale pluripotente beenmergstamcellen en consequent geassocieerd is met het Philadelphia-chromosoom met daarbij de t(9;22)(q34;q11.2) en *BCR::ABL1*-fusiegen. Zonder het *BCR::ABL1* fusiegen is er geen sprake van typische CML.

Voor monitoring van de behandeling dient volgens de aanbevelingen van de ELN 2020 (recommendations for treating CML) tenminste elke 3 maanden moleculaire diagnostiek gedaan te worden. Cytogenetica vindt plaats bij diagnose (altijd) en bij follow-up (indien atypische translocatie, uitzonderlijke of atypische *BCR::ABL1* transcripten, failure/resistentie behandeling, progressie naar acute fase of blastencrise. Zie ook *Leukemia (2020) 34:966–984*; <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0776-2>).

Atypische Chronische Myeloïde Leukemie

Atypische CML is *t(9;22)(q34;q11.2)/BCR::ABL1* negatief en wordt gekarakteriseerd door hoge aantallen neutrofiële granulocyten. Bij ca. 10% van de patiënten met atypische CML wordt een mutatie in het *CSF3R* (G-CSF receptor) gen gevonden.

Bij atypische CML worden bij ca. 33% van de patiënten mutaties in *ETNK1* of *SETBP1* gevonden. Deze mutaties dragen bij aan het stellen van de diagnose atypische CML.

Myelodysplastisch neoplasie (MDS)

Cytogenetica

- standaard genoomwijd array onderzoek
- als aanvullende test eventueel karyotypering (bij chromosoom 7 afwijkingen en bewezen MDS richting AML of verdenking op AML of CMML)

Toelichting

MDS heeft een heterogene presentatie en beloop. MDS is een groep van klonale hematopoëtische stamcel ziekten en wordt gekenmerkt door cytopenie en dysplasie van één of meerdere cellijnen in bloed en/of beenmerg. De diagnose van MDS subtypen en risicofratificatie gebeurt aan de hand van klinische kenmerken (waaronder percentage blasten in beenmerg), moleculaire en cytogenetische data. Deze kenmerken en data maken deel uit van het moleculaire Internationale Prognostische Score Systeem (**IPSS-M Risk Calculator (mds-risk-model.com)**). Het risicoprofiel van de IPSS-M geeft richting aan de therapiekeuze voor de patiënt. Een aantal recurrent chromosoomafwijkingen zijn in de setting van een persisterende cytopenie aanwijzing voor de diagnose MDS (WHO 2022).

Aplastische Anemie / Paroxysmale Nachtelijke Hemoglobinurie (PNH)

Cytogenetica

- zie MDS

Toelichting

Diagnostiek is erop gericht om onderscheid te maken tussen aplastische anemie, PNH en MDS. Cytogenetisch onderzoek kan richting geven aan de diagnostiek omdat bij een aplastische anemie en PNH de uitkomst van het chromosomen onderzoek meestal normaal is, terwijl dit bij ongeveer de helft van de gevallen van MDS afwijkingen vertoont.

Myeloproliferatieve neoplasie (MPN)

Cytogenetica

- standaard genomewijd array onderzoek uitgevoerd
- standaard karyotypering (o.a. ter uitsluiting van een CML).

Toelichting

MPN is een groep chronische myeloproliferatieve aandoeningen als gevolg van een defect in de pluripotente stamcel. Er zijn drie aan elkaar verwante, maar te onderscheiden myeloproliferatieve neoplasieën namelijk: polycythemia vera (PV), essentiële trombocytose (ET), primaire myelofibrose (MF).

Voor de diagnose van MPN is het van belang om CML uit te sluiten middels karyotypering (ter uitsluiting van een t(9;22)(q34;q11.2)) of moleculaire diagnostiek (ter uitsluiting van *BCR::ABL1* fusiegen).

Chronische myelomonocytaire leukemie (CMML)

Cytogenetica

- standaard genomewijd array onderzoek (o.a. ter uitsluiting van een *FIP1L1::PDGFRA* fusie)
- standaard karyotypering (o.a. ter uitsluiting van t(9;22)(q34;q11.2) (*BCR::ABL1*) of afwijkingen aan 4q12 (*PDGFRA*), 5q32 (*PDGFRB*), 8p11 (*FGFR1*), 9p24 (*JAK2*) of t(8;9)(p22;p24.1) (*PCM1::JAK2*).

Toelichting

Bij CMML is het van belang om klassieke MPN, CML en myeloid/lymphoid neoplasie met tyrosine kinase gene fusions uit te sluiten.

Bij CMML patiënten waar meer prognostische informatie gewenst is om een afweging rond allogene stamceltransplantatie te maken, is het van belang om te onderzoeken of er chromosoom afwijkingen en/of mutaties aanwezig zijn. Deze afwijkingen maken deel uit van de CPSS-mol score (CMML – specific prognostic scoring system-molecular).

Mastocytosis

Cytogenetica

- standaard karyotypering (ter uitsluiting van o.a. afwijkingen aan 4q12 (*PDGFRA*), 5q32 (*PDGFRB*), 8p11 (*FGFR1*), 9p24 (*JAK2*) of t(8;9)(p22;p24) (*PCM1::JAK2*))
- standaard genomewijd array onderzoek (o.a. ter uitsluiting van een *FIP1L1::PDGFRA* fusie)

Toelichting

Systemische mastocytose wordt gekenmerkt door een klonale proliferatie van mestcellen in de huid (*urticaria pigmentosa*) en/of de interne organen (beenmerg, lever, milt, darm en lymfklieren).

Er zijn officiële criteria vastgesteld voor de diagnose systemische mastocytose. Wanneer deze diagnose overwogen wordt is het raadzaam om op het aspiraat ook cytogenetica (uitsluiten bijkomende MDS of myeloproliferatieve aandoening) en analyse van de *KIT* D816V mutatie te laten verrichten.

Cytogenetica naar *FIP1L1::PDGFRA* fusie en afwijkingen aan 4q12 (*PDGFRA*), 5q32 (*PDGFRB*), 8p11 (*FGFR1*), 9p24 (*JAK2*) of t(8;9)(p22;p24) (*PCM1::JAK2*) is wenselijk aangezien deze voor kunnen komen bij de combinatie mastocytose met eosinofilie.

Myeloïde en lymfoïde neoplasie met eosinofilie en tyrosinekinase gen fusie

Cytogenetica

- standaard karyotypering (o.a. naar afwijkingen aan 4q12 (*PDGFRA*), 5q32 (*PDGFRB*), 8p11 (*FGFR1*), 9p24 (*JAK2*), t(8;9)) (*PCM1::JAK2*), 13q12.2 (*FLT3*)
- standaard genoomwijd array onderzoek (o.a. ter uitsluiting van een *FIP1L1::PDGFRA* fusie)
- op aanvraag/indicatie: aanvullend FISH naar *FIP1L1::PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1*, *JAK2*, *ABL1*

Toelichting

Myeloïde en lymfoïde maligniteiten met eosinofilie worden ingedeeld aan de hand van genherschikkingen van *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1*, *JAK2* en/of *FLT3* genen en *ETV6::ABL1* fusie, die leiden tot een afwijkend tyrosine kinase dat in veel gevallen gevoelig is voor tyrosine kinase inhibitors. Het fusiegen *FIP1L1::PDGFRA* wordt veroorzaakt door een deletie op chromosoom 4q12 en kan met zowel array als FISH worden aangetoond.

Acute Lymfatische Leukemie (ALL)

Cytogenetica (bij volwassenen)

- standaard karyotypering voor detectie van specifieke translocaties
- standaard genoomwijde SNP array voor o.a. detectie van hypo- en hyperdiploidie en focale gen-deleties
- standaard FISH naar *BCR::ABL1* fusiegen/(t(9;22)) en *KMT2A* (11q23)-rearrangement

Toelichting

Genoomwijde SNP array analyse wordt verricht om copy number variaties (inclusief hypo-, hyperdiploidie en submicroscopische afwijkingen zoals focale deleties van o.a. het *IKZF1* gen en gebieden met copy-neutraal verlies van heterozygotie op te sporen. Naast het array profiel zijn ook specifieke translocaties waaronder *BCR::ABL1* (t(9;22)) en rearrangements in het *KMT2A* gen voor bepaling van diagnose en voor risicofactoren voor prognose.

Chronische Lymfatische Leukemie (CLL)

Cytogenetica en moleculaire diagnostiek Lymfoïd

- standaard mutatie analyse *TP53* gen
- standaard genoomwijde SNP array voor detectie van deletie 17p (*TP53* gen), deletie 11q (*ATM* gen), trisomie 12 en overige relevante CNA (o.a. deletie 13q14 en complex karyotype)
- standaard mutatie status IGHV (hypermutatie immuunglobuline zware keten gen)

Toelichting

De diagnose CLL wordt vermoed op basis van lymfocytose van $>5 \times 10^9/l$, waarbij de lymfocyten morfologisch vaak een typisch afwijkende kernstructuur vertonen ('grumelee-patroon'); ook lymfadenopathie en splenomegalie zijn mogelijk.

Met behulp van moleculaire diagnostiek en cytogenetica worden prognostische en predictieve. Mutaties in *TP53* worden bepaald via next generation sequencing technologie door analyse van een genenpanel. De deletie 17p, deletie 11q en trisomie 12 worden bepaald met genoomwijde SNP array. Met deze technologie worden daarnaast ook andere prognostische factoren bepaald, waaronder 13q deletie, een “complex karyotype” en copy neutral LOH van 17p. Een andere belangrijke prognostische parameter is de mutatiestatus van de immuunglobuline zware keten. Een ongemuteerde status van IGHV heeft een ongunstige prognose. Deze test wordt bepaald via sequentieanalyse van de klonale immuunglobuline zware keten genherschikking.

Plasmacel neoplasie (multipel myeloom, MGUS en amyloidose)

Cytogenetica

- standaard onderzoek wordt uitgevoerd op CD138-verrijkte plasmacellen
- standaard genoomwijde SNP array naar prognostisch relevante afwijkingen del(13q14), del(17p13)/*TP53*, del(1p), gain(1q) en hyperdiploidie
- standaard interfase FISH naar prognostisch relevante afwijkingen t(4;14)/*IGH::FGFR3* en t(14;16)/*IGH::MAF*
- op aanvraag/indicatie eventueel interfase FISH naar t(11;14)/*IGH::CCND1*

Toelichting

Maligne plasmacel aandoeningen zijn het gevolg van de aanwezigheid van monoklonale plasmacellen (CD138 verrijkt) en worden in veel gevallen gekenmerkt door de aanwezigheid van klonale afwijkingen.

Er komen bij plasmacelaandoeningen diverse cytogenetische afwijkingen voor die sterk geassocieerd zijn met de prognose. De t(4;14)/*IGH::FGFR3*, t(14;16)/*IGH::MAF*, del(17p)/*TP53*, del(1p) en gain(1q) worden geassocieerd met een minder gunstige prognose.

Non-Hodgkin lymfoom (NHL) en Hodgkin lymfoom

Cytogenetica

- standaard karyotypering (op het lymfeklierbiopt)
- standaard genoomwijd array onderzoek (op beenmerg aspiraats) bij verdenking op beenmerglokalisatie, afhankelijk van type lymfoom
- aanvullend eventueel interfase FISH naar specifieke translocaties

Toelichting

De diagnosestelling en classificatie van non Hodgkin lymfomen en Hodgkin lymfomen gebeurt met behulp van histologie en aanvullende immunohistochemische en moleculaire technieken.

Specifieke chromosomale translocaties en/of genmutaties zijn richtinggevend voor de classificatie van lymfomen.

Hairy Cell Leukemie (HCL)

Cytogenetica en Moleculaire diagnostiek Lymfoïd bij recidief < 2 jaar

- standaard mutatie analyse *BRAF* en *TP53* genen
- standaard genoomwijde SNP array voor detectie van o.a. deletie 17p (*TP53* gen)
- mutatie status IGHV en IGHV gebruik in verband met de IGHV4-34 herschikking

Toelichting

Moleculaire diagnostiek naar *BRAF* mutatie wordt geadviseerd bij verdenking HCL. Bij HCLc is er bijna altijd een *BRAF*^{V600E} mutatie. Variant HCL (HCLv) heeft geen *BRAF*^{V600E} mutatie en wordt beschouwd als een aparte entiteit.

Volgens de landelijke richtlijn (zie website www.hematologienederland.nl) wordt bij symptomatisch HCLc recidief <2 jaar na behandeling de onderstaande bepalingen aanbevolen (uit te voeren op beenmerg aspiraats of perifere bloed bij dry tap):

- *BRAF* mutatieanalyse, o.a. de V600E mutatie
- *TP53* mutatieanalyse
- Onderzoek naar del(17p)
- IGHV mutatiestatus, IGH4-34 rearrangement

De hoog risico factoren zijn: afwezigheid *BRAF*^{V600E}, aanwezigheid van *TP53* defecten (del(17p) en *TP53* mutatie), expressie IGHV4-34 rearrangement, ongemuteerd IGHV.

Mutaties in *BRAF* en *TP53* worden bepaald via next generation sequencing technologie door analyse van een genenpaneel (waarin naast relevante genen voor HCL ook genen relevant voor andere lymfoproliferatieve aandoeningen worden geanalyseerd). De deletie 17p wordt bepaald met genoomwijde SNP array. Met deze technologie kunnen daarnaast ook andere ongebalanceerde cytogenetische afwijkingen worden aangetoond.

Lymfoplasmacytair lymfoom (LPL), Waldenström

Cytogenetica en Moleculaire diagnostiek Lymfoïd

- standaard mutatie analyse *MYD88* gen en *CXCR4* gen
- standaard genoomwijde SNP array voor detectie van o.a. deletie 17p (*TP53* gen)

Toelichting

De *MYD88* mutatie p.L265P is aangetoond bij een groot deel van de patiënten met LPL (de ziekte van Waldenström- Mutaties in het *CXCR4* gen lijken ook klinisch relevant te zijn.

Mutaties in *MYD88* en *CXCR4* worden bepaald via next generation sequencing technologie door analyse van een genenpaneel (waarin naast relevante genen voor LPL ook genen relevant voor andere lymfoproliferatieve aandoeningen worden geanalyseerd). Met behulp van de genoomwijde SNP array worden ongebalanceerde cytogenetische afwijkingen aangetoond.

T-cel prolymfocyttaire leukemie (T-PLL)

Cytogenetica

- standaard karyotypering
- standaard FISH naar een *TCL1* rearrangement

Toelichting

Ongeveer 90% van de patiënten met een T-PLL hebben een inv(14) of een t(14;14) met breukpunten bij de oncogenen *TCL1A* en *TCL1B*. Middels FISH kan een dergelijke *TCL1* rearrangement worden aangetoond.