

Laboratoriumdiagnostiek hematologische maligniteiten

Radboud universitair medisch centrum

Morfologie
Immuunfenotypering
Moleculaire diagnostiek
Cytogenetica
Pathologie

Radboudumc

Inhoudsopgave

Introductie	3
Contact informatie	4
Benodigde materialen	5
Acute Myeloïde Leukemie (AML)	6
Acute Promyelocyten Leukemie (APL)	8
Chronische Myeloïde Leukemie (CML)	9
Myelodysplastisch syndroom (MDS)	10
Cytopenie	11
Aplastische Anemie / Paroxysmale Nachtelijke Hemoglobinurie (PNH)	12
Myeloproliferatieve neoplasie (MPN)	13
Systemische Mastocytose (SM)	15
Myeloïde en lymfoïde neoplasie met eosinofilie / HES	16
Acute Lymfatische Leukemie (ALL)	17
Chronische Lymfatische Leukemie (CLL)	18
Plasmacel dyscrasieën (multipel myeloom, MGUS en amyloïdose)	19
Non-Hodgkin lymfoom (NHL) en Hodgkin lymfoom	20
Lymfocytose e.c.i.	21

Introductie

In deze folder vindt u informatie voor het aanvragen van de laboratoriumdiagnostiek van hematologische maligniteiten in het Radboudumc. Per ziektebeeld is globaal aangegeven welke diagnostiek relevant is voor morfologie, immuunfenotypering, moleculaire diagnostiek, cytogenetica en pathologie. Aangezien steeds meer nieuwe diagnostische testen beschikbaar komen, neemt de complexiteit van de diagnostiek en behandeling van patiënten met hematologische maligniteiten enorm toe. Goede coördinatie, interpretatie en onderlinge afstemming van de diverse onderzoeken is onmisbaar om de doelmatigheid en efficiëntie van diagnostiek te bevorderen en onnodige kosten te vermijden.

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, Laboratorium Tumorgenetica (LTG) en Pathologie, waarbij de logistiek omtrent onderzoeks aanvragen centraal wordt gecoördineerd. Hierdoor kunt u als externe aanvrager alle hemato-oncologische onderzoeken via één aanvraagformulier aanvragen. Meer informatie hierover vindt u in deze folder. Voorsnog blijft u de verslagen van de diagnostische testen via de verschillende disciplines ontvangen. Het streven is om op termijn een geïntegreerde rapportage te bewerkstelligen.

Door middel van het aangeboden diagnostisch pakket kan een compleet inzicht voor diagnosestelling verkregen worden, conform de actuele richtlijnen en inzichten (WHO 2016 en European Leukemia Network (ELN)). Indien gewenst kunt u contact opnemen met afdeling Hematologie van het Radboudumc voor nader overleg en een behandeladvies.

Aanvragen

Aanvraagformulieren kunt u downloaden via de website van het Laboratorium Hematologie: www.radboudumc.nl/laboratoriumvoordiagnostiek of via de websites van het Laboratorium Tumorgenetica (www.radboudumc.nl/LTG) of Laboratorium Hematologie (www.radboudumc.nl/labgk, aanvraagformulieren - hematologie).

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.

Materialen t.a.v. pathologie kunnen ook rechtstreeks naar het laboratorium Pathologie van het Radboudumc gezonden worden (monsterontvangst Pathologie, Huispost / route nr. 824).

Afleveradres voor insturen van materialen

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

Contact

	Telefoon nummer	E-mail
Monsterontvangst / algemene informatie	024-36 14777	
Morfologie	024-36 10270	Marius.MacKenzie@radboudumc.nl
Immuunfenotypering	024-36 16349	Frank.Preijers@radboudumc.nl
Moleculaire diagnostiek Hematologie	024-36 10297	MHD-LH.labgk@radboudumc.nl
Cytogenetica	024-36 13799	gen@radboudumc.nl
Pathologie	024-36 14363	CentraleMonsterontvangst.pa@radboudumc.nl, Konnie.Hebeda@radboudumc.nl

Benodigde materialen

Morfologie

Microscopische beoordeling van cellen in uitstrijkjes van bloed en beenmergaspiraats

- 6 ongekleurde, ongefixeerde beenmerguitstrijkjes (evt. pletpreparaten)
- 4 ongekleurde, ongefixeerde bloeduitstrijkjes
- 3 ml bloed en/of beenmerg, EDTA buis

Immuunfenotypering met behulp van flowcytometrie

- 2 - 5 ml beenmergaspiraats, Li-heparinebuis (groene dop) of ICP buis*
- 6 ml bloed, Li-heparinebuis (groene dop)
- 2 ml liquor (in bewaarmedium RPMI1640 + 5% FCS , geen fixatieven!)

Moleculaire diagnostiek

- 6 ml beenmerg, EDTA buis (paarse dop)
- 3 x 6 ml bloed, EDTA buis (paarse dop)
- voor moleculaire bepalingen op weefsel: zie Pathologie

Cytogenetica

- 2 - 5 ml beenmerg, Li-heparinebuis (groene dop)
- in geval van dry tap en/of >5% blasten in perifeer bloed: 6 ml bloed, Li-heparinebuis (groene dop)
- bij indicatie CLL: 6 ml bloed, EDTA buis (paarse dop)
- 2 ml liquor (in bewaarmedium RPMI1640 + 5% FCS, geen fixatieven!)

Pathologie

- beenmergbiopsie, 2 cm, in Burckhardt fixatief (vers bereid, te verkrijgen via uw afdeling Pathologie) of evt. formaline
- lymfklier, vers, direct na afname insturen volgens instructie
- ander weefsel, vers, direct na afname insturen volgens instructie
- moleculaire testen kunnen ook uitgevoerd worden op materialen die zijn verwerkt in het laboratorium pathologie van uw ziekenhuis.

Informatie over hoeveelheden en type afname buizen vindt u ook op het aanvraagformulier.

*ICP buizen zijn te bestellen bij de Stam Cel Transplantatie unit, telefoon 024-36 13809.

Acute Myeloïde Leukemie (AML)

voor Acute Promyelocyten Leukemie (APL), zie blz. 7

Morfologie

- microscopische beoordeling van bloed en beenmergaspiraats
- vaststellen percentage blasten, uitrijping, dysplasiescore en classificatie AML

Immuunfenotypering

- beenmerg: analyse van blasten en uitrijping, classificatie van AML
- bloed: analyse van blasten

Moleculaire diagnostiek

- AML diagnose pakket:
sneldiagnostiek *FLT3-ITD* (en *FLT3* ratio) en *FLT3-TKD* i.v.m. midostaurine therapie en mutatie analyse *NPM1*, *CEBPA*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *KIT* (codon 816 en 419), *RUNX1*, *TP53*
- AML aanvullend pakket: mutatie analyse *DNMT3A*, *KRAS*, *NRAS*, *TET2*, *WT1*

Cytogenetica

- standaard wordt karyotypering uitgevoerd
- als aanvullende test (bij enkele klinische trials en/of onvoldoende delingen) interfase FISH naar *t(8;21) (RUNX1-RUNX1T1)*, *inv(16) (CBFB)-*, *11q23 (KMT2A = MLL)-* en *3q26 (MECOM = EVI1)-* rearrangements
- als aanvullende test (bij geen of onvoldoende delingen) genoomwijde array naar *del(5q)*, *del(7q)*, *del(17p)*, monosomie 5, monosomie 7, trisomie 8, complex en monosomaal karyotype

Pathologie

- schatting beenmergreserve, mate van infiltratie en fibrose
- immunohistochemische inschatting blastenpercentage of typering op indicatie (bijv. bij “dry tap”)

Toelichting

De diagnose en classificatie van AML wordt gesteld aan de hand van morfologisch onderzoek en immuunfenotypering. Bij de beelden met *t(8;21)*, *t(15;17)* of *inv(16)* wordt ook bij <20% blasten in het bloed of beenmerg de diagnose AML gesteld.

Met cytogenetisch onderzoek en moleculaire diagnostiek middels het AML diagnose panel wordt gekeken naar genetische afwijkingen en mutaties die volgens ELN en WHO2016 criteria relevant zijn. Chromosoomafwijkingen *t(6;9)(p23;q34)*, *t(v;11q23)*, *t(9;22)(q34;q11.2)*, *inv(3)(q21q26)*, *t(3;3)(q21;q26)*, -5, *del(5q)*, -7, -17, *abn(17p)*, complex en monosomaal karyotype hebben een ongunstig prognostisch effect. Dit geldt ook voor mutaties in *ASXL1*, *RUNX1* en *TP53*, *FLT3-ITD* met een hoge ratio > 0,5. De *t(8;21)(q22;q22)*, *inv(16)(p13q22)* en bi-allelische *CEBPA* mutaties en *NPM1* mutaties hebben een gunstig prognostisch effect. Daarnaast is de aanwezigheid van mutaties in *CEBPA* (bi-allelisch), *NPM1* en *RUNX1* van belang voor subclassificatie van AML volgens de WHO 2016 criteria. Patiënten met een *t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1* genfusie met een WBC>20 en/of een *KIT* mutatie hebben een intermediaire prognose.

Bij volwassen patiënten met een nieuw gediagnosticeerde AML met een *FLT3-ITD* (*FLT3* interne tandem duplicatie) of *FLT3-TKD* (*FLT3* tyrosine kinase domein, codon 835) mutatie wordt midostaurine toegevoegd aan de standaard behandeling.

De analyse van *IDH1* en *IDH2* mutaties heeft mogelijke therapeutische consequenties in verband met het beschikbaar komen van *IDH1/IDH2* remmers.

Mutatie analyse van het AML aanvullend panel is gericht op een verdere prognosticering van AML. Mutaties in *DNMT3A*, *TET2* en *WT1* hebben een ongunstige prognose. *NRAS* en *KRAS* hebben een context afhankelijke impact op prognose.

Opmerking: bij de verdenking op AML dient de stollingsstatus gecontroleerd te worden (APTT, PT, fibrinogeen, D-dimeer).

Acute Promyelocyten Leukemie (APL)

Morfologie

- microscopische beoordeling van bloed en beenmergaspiraats
- vaststellen percentage blasten en promyelocyten, voorkomen Auerse staven, verdere uitrijping en classificatie (klassieke of variant APL)

Immuunfenotypering

- beenmerg/bloed: analyse van blasten, promyelocyten en PML-RARA kleuring (fluorescentie)
- CD56 expressie t.b.v. risicostratificatie

Moleculaire diagnostiek

- fusiegen detectie *PML-RARA* (t(15;17)) met PCR
- follow-up *PML-RARA* (t(15;17)) met PCR

Cytogenetica

- standaard karyotypering
- interfase FISH naar *PML-RARA* fusie (t(15;17))
indien sample voor 10:00 uur ontvangen is, kan dezelfde dag uitsluitsel gegeven worden

Pathologie

- schatting beenmergreserve, mate van infiltratie en fibrose
- immuunhistochemische inschatting blastenpercentage of typering op indicatie (bijv. bij “dry tap”)

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.

CD56 komt tot expressie in ca. 11% van APL gevallen en is geassocieerd met ongunstige ziektekenmerken en een hogere recidiefkans.

Het vervolgen van patiënten, met name na consolidatiekuur, is gericht op de detectie van restziekte (measurable residual disease) middels moleculaire diagnostiek (PCR naar *PML-RARA*).

Opmerking: bij de verdenking op APL dient de stollingsstatus gecontroleerd te worden (APTT, PT, fibrinogeen, D-dimeer).

Chronische Myeloïde Leukemie (CML)

Morfologie

- microscopische beoordeling, differentiatie bloed en beenmergaspiraats
- vaststellen van percentage blasten (chronische fase / acceleratiefase / blastencrisis)

Immuunfenotypering

- uitrijping van de myeloïde cellijn en analyse van blasten

Moleculaire diagnostiek

- fusiegen detectie *BCR-ABL1* (t(9;22)) met PCR
- follow-up *BCR-ABL1* (t(9;22)) met PCR
- bij vermoeden resistentie tyrosine kinase remmer: *BCR-ABL1* puntmutatie analyse
- bij atypische CML en CNL: zie MPN blz. 13-14

Cytogenetica

- standaard karyotypering chromosoomonderzoek: t(9;22)(q34;q11.2) en additionele afwijkingen
- bij follow-up standaard karyotypering om cytogenetische respons te bepalen
- bij onvoldoende aantal en/of kwaliteit van delingen, wordt interfase FISH naar *BCR-ABL1* uitgevoerd

Pathologie

- histologische en immunohistochemische analyse voor bepaling van acceleratie (toename reticuline) en/of transformatie (toename blasten)

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/of *BCR-ABL1*-fusiegen. Zonder het *BCR-ABL1* fusiegen is er geen sprake van typische CML.

Het vervolgen van patiënten bij behandeling met tyrosine kinase remmers (TKI) of na stamceltransplantatie gebeurt aan de hand van morfologie (hematologische respons), cytogenetica (cytogenetische respons) en kwantitatieve PCR waarmee de hoeveelheid *BCR-ABL1* fusietranscript wordt bepaald (moleculaire respons).

Indien de behandeling met TKI (meestal initieel imatinib, afhankelijk van Sokal score) niet aanslaat of als er sprake is van progressie van de ziekte tijdens behandeling met TKI, moet onderzocht worden of er klonale progressie is middels cytogenetisch onderzoek en moet puntmutatie analyse in *BCR-ABL1* uitgevoerd worden middels moleculaire diagnostiek. In dit geval dient overwogen te worden om over te stappen op tweede of derde generatie TKI.

Voor atypische CML (CML zonder *BCR-ABL1* fusiegen): zie MPN blz. 13-14

Myelodysplastisch syndroom (MDS)

Morfologie

- microscopische beoordeling, differentiatie bloed en beenmergaspiraat
- met name vaststellen percentage blasten, dysplasiescore en classificatie MDS

Immuunfenotypering

- beenmerg: analyse van blasten en afwijkende uitrijping diverse cellijnen, flow score
- bloed: analyse van blasten

Moleculaire diagnostiek

- MDS diagnose pakket: mutatie analyse *ASXL1*, *RUNX1*, *SF3B1*, *TP53*
- in geval van MDS-EB (voorheen RAEB) wordt moleculaire diagnostiek uitgevoerd volgens AML aanvragen (zie blz. 6)

Cytogenetica

- voor de detectie van cytogenetische afwijkingen wordt standaard een genomewijd array onderzoek verricht. Bij morfologisch bewezen MDS vindt tevens karyotypering plaats

Pathologie

- histologische en immunohistochemische bevestiging diagnose en onderzoek naar eventuele progressie naar AML
- gradering fibrose
- aantonen van andere oorzaken cytopenie, uitsluiten bijkomende aandoeningen (bv. mastocytose)
- voor stellen diagnose bij celarm beenmergaspiraat (bij fibrose, packed marrow, aplasie)

Toelichting

MDS heeft een heterogene presentatie en beloop. MDS is een groep van clonale 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 risicostratificatie gebeurt aan de hand van morfologie van bloed en beenmerg en cytogenetische afwijkingen. Deze kenmerken maken deel uit van het gereviseerde Internationale Prognostische Score Systeem (de IPSS en revised IPSS). Het risicoprofiel van de IPSS 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 2016).

Daarnaast kan met behulp van immuunfenotypering een flow score bepaald worden, welke behulpzaam kan zijn bij het vaststellen van de diagnose MDS en risicostratificatie.

Het aantonen van mutaties in *ASXL1*, *RUNX1*, *SF3B1*, *TP53* of andere genen is op zichzelf niet voldoende voor de diagnose van MDS. Verworven mutaties in deze en andere MDS-geassocieerde genen kunnen dienen als clonale marker voor MDS, maar komen ook voor bij (oudere) personen met klonale hematopoïese zonder maligniteit (CHIP; clonal hematopoiesis of indeterminate potential). *SF3B1* mutaties worden geassocieerd met ring sideroblasten en zijn diagnostisch voor MDS-RS (ook bij lagere ring sideroblasten aantallen).

Verworven mutaties in *ASXL1*, *RUNX1* en *TP53* zijn geassocieerd met een slechtere prognose bij MDS. Voor *TP53* mutaties is aangetoond dat er een slechtere respons op lenalidomide is.

Cytopenie

Morfologie

- microscopische beoordeling, differentiatie bloed en beenmergaspiraats
- aantonen van oorzaak cytopenie door hematologische of niet-hematologische aandoeningen

Immuunfenotypering

- aantonen van hematologische maligniteit, vaststellen van groeiblokkade, aantonen van LGL kloon

Moleculaire diagnostiek

- mutatiescreening myeloïd uitgebreide panel: *ASXL1*, *CALR*, *CBL*, *CSF3R*, *DNMT3A*, *ETNK1*, *EZH2*, *FLT3* tyrosine kinase domein (*FLT3-TKD*, *FLT3* codon 835), *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *KIT*, *KRAS*, *MPL*, *NPM1*, *NRAS*, *RUNX1*, *SETBP1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *TET2*, *TP53*, *U2AF1*, *WT1*

Cytogenetica

- voor de detectie van cytogenetische afwijkingen wordt een genomewijd array onderzoek verricht. Bij morfologisch bewezen MDS vindt tevens karyotypering plaats.

Pathologie

- bepalen van de cellulariteit
- schatting beenmergreserve en evt. fibrose
- aantonen van bijkomende (hematologische en niet-hematologische) aandoeningen

Toelichting

Het onderzoek is met name gericht op het aantonen van een mogelijke MDS of een andere verklaring te vinden voor de cytopenie. Bij cytopenie bestaat er een uitgebreide differentiaal diagnose, waarbij goede klinische gegevens en de actuele en recente medicatie bekend moeten zijn.

Met cytogenetisch onderzoek wordt onderzocht of er recurrent chromosoomafwijkingen aanwezig zijn die in de setting van een persisterende cytopenie aanwijzing zijn voor de diagnose MDS.

Mutatiescreening met het myeloïd uitgebreide panel is met name bedoeld voor onderzoek bij patiënten met een verdenking op een myeloïde maligniteit, waarbij het niet duidelijk is of en wat voor myeloïde maligniteit het betreft. Met dit panel wordt onderzocht of er mutaties aanwezig zijn in een aantal genen die geassocieerd zijn met myeloïde maligniteiten. De aanwezigheid van mutaties in deze genen is veelal niet bewijzend voor een myeloïde maligniteit, maar dienen als klonale marker en kunnen een diagnose ondersteunen.

Mutaties in de genen van dit panel komen ook voor bij (oudere) personen met klonale hematopoïese zonder maligniteit (CHIP; clonal hematopoiesis of indeterminate potential). Dit geldt met name voor *DNMT3A*, *TET2* en *ASXL1*.

Aplastische Anemie / Paroxysmale Nachtelijke Hemoglobinurie (PNH)

Morfologie

- microscopische beoordeling, differentiatie bloed en beenmergaspiraats

Immuunfenotypering

- beenmerg: analyse blasten en uitrijping, uitsluiten van andere hematologische maligniteit
- bloed: analyse van o.a. PNH in granulocyten, monocyten en erythrocyten (o.a. bepaling van FLAER, CD55, CD59, CD24, CD14 markers)

Moleculaire diagnostiek

- n.v.t.

Cytogenetica

- voor de detectie van cytogenetische afwijkingen wordt een genoomwijd array onderzoek verricht. Bij morfologisch bewezen MDS vindt tevens karyotypering plaats.

Pathologie

- histologische bevestiging diagnose, schatting beenmergreserve en evt. fibrose
- beoordeling (ook immunohistochemisch) op blastaire transformatie en bijkomende (hematologische en niet-hematologische) aandoeningen

Toelichting

Diagnostiek is erop gericht om onderscheid te maken tussen aplastische anemie, PNH en MDS. Voor de diagnostiek naar PNH wordt bij voorkeur immuunfenotypering gebruikt. Het vaststellen van de aanwezigheid van een PNH kloon bij een aplastische anemie of hypoplastische MDS is van waarde voor het voorspellen van de respons op immuunsuppressieve therapie. Morfologische beoordeling van een beenmergaspiraats en beenmergbiopsie is noodzakelijk om de mate van aplasie te beoordelen en om een MDS uit te sluiten. Cytogenetisch onderzoek kan richting geven aan de diagnostiek omdat bij een aplastische anemie de uitkomst van het chromosomen onderzoek doorgaans normaal is, terwijl dit bij ongeveer de helft van de gevallen van MDS afwijkingen vertoont.

Myeloproliferatieve neoplasie (MPN) en MDS/MPN

polycythemia vera (PV), essentiële trombose (ET), primaire myelofibrose (MF)
atypische CML, chronische neutrofielen leukemie (CNL), chronische myelomonocytair leukemie (CMML)

Morfologie

- microscopische beoordeling, differentiatie bloed en beenmergaspiraats

Immuunfenotypering

- uitrijping van de myeloïde cellijn en analyse van blasten en uitsluiten van andere hematologische maligniteit

Moleculaire diagnostiek

- MPN diagnose panel: mutatie analyse *JAK2* V617F, *JAK2* exon 12, *CALR* en *MPL* (codon 515 en 505) en fusiegen detectie *BCR- ABL1* (t(9;22)) met PCR
- MPN aanvullend panel (prognostisch): mutatie analyse *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *TET2*
- bij atypische CML en CNL: MPN diagnose panel en mutatie analyse *CSF3R*, *ETNK1* en *SETBP1*
- bij CMML: MPN diagnose panel en aanvullende mutatie analyse *ASXL1*, *CBL*, *NRAS*, *RUNX1*, *SETBP1*

Cytogenetica

- voor de detectie van cytogenetische afwijkingen wordt een genomewijd array onderzoek verricht. Bij morfologisch bewezen MPN of verdenking op CML vindt tevens karyotypering plaats.

Pathologie

- stellen diagnose (major criterium)
- mutatie analyse *JAK2* V617F (exon 14) of *MPL* W515K/L (exon 10) op beenmergbiopsie (indien geen aspiraats)
- graderen van fibrose
- uitsluiten bijkomende aandoeningen (bv. mastocytose)

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). Bij MPN wordt bij meer dan 90% van de patiënten een mutatie gevonden in één van de genen *JAK2*, *MPL* of *CALR*. Mutaties in deze genen komen niet samen voor en spelen waarschijnlijk een rol in hetzelfde biologische proces.

Bij PV kan in >95% van de patiënten de mutatie V617F in het *JAK2* gen worden aangetoond. Ook worden mutaties in exon 12 van *JAK2* gevonden. Bij ET en MF komt de *JAK2* V617F voor bij ca. 55% van de patiënten. In 3-5% van de gevallen van ET en MF wordt een mutatie in aminozuur codon 515 van het *MPL* gen gevonden. Bij 50-70% van de patiënten met ET of MF die geen *JAK2* of *MPL* mutatie hebben is een mutatie in exon 9 van het *CALR* gen aanwezig. De aanwezigheid van een *CALR* mutatie bij ET wordt geassocieerd met een gunstiger beloop van de ziekte t.o.v. patiënten met een *JAK2* mutatie. Met de aanvraag van het MPN pakket wordt moleculaire diagnostiek naar al deze genmutaties (*JAK2* V617F, *JAK2* exon 12, *CALR* exon 9 en *MPL* codon 515) ingezet. Bij de indicatie PV kan onderzoek naar de *JAK2* V617F mutatie ook los worden aangevraagd.

In geval van onvoldoende beenmergaspiraats voor moleculaire diagnostiek, kan indien gewenst onderzoek naar mutaties in *JAK2* en *MPL* uitgevoerd worden op het beenmergbiopt via Pathologie. Morfologische beoordeling van een beenmergbiopt levert een major criterium (WHO 2016) en is nodig voor het graderen van fibrose.

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)), moleculaire diagnostiek (ter uitsluiting van *BCR-ABL1* fusiegen).

Hoewel de meerderheid van de MPN patiënten een mutatie heeft in één van de 3 genen *JAK2*, *CALR* of *MPL*, worden in 10-15% van de patiënten geen mutaties in deze genen gevonden (patiënten zijn 'triple negative'). MF patiënten zonder driver mutaties in *JAK2*, *CALR* en *MPL* hebben een slechtere prognose dan patiënten met een mutatie in één van deze genen. Voor risicostratificatie bij MF wordt onderzocht of er mutaties aanwezig zijn in de genen *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *RUNX1*, *TET2* en *SRSF2* om clonaliteit aan te tonen. Mutaties in deze genen hebben een ongunstig prognostisch effect en maken deel uit van de MIPSS70 en MIPSS70-plus score voor MF. Onderzoek naar mutaties in de genen van het MPN aanvullende panel is van belang om een afweging te maken m.b.t. allogene stamceltransplantatie.

SF3B1 mutaties worden geassocieerd met ring sideroblasten. Deze bepaling wordt verricht voor de diagnose van MDS/MPN-RS-T.

Verworven mutaties in deze en andere genen die geassocieerd worden met myeloïde maligniteiten kunnen dienen als clonale marker voor MPN, maar komen ook voor bij (oudere) personen met clonale hematopoïese zonder maligniteit (CHIP; clonal hematopoiesis of indeterminate potential). Ze zijn op zichzelf dus niet bewijzend voor de diagnose MPN.

Voor de diagnose van atypische CML (aCML) en Chronische Neutrofiele Leukemie (CNL) is het van belang om CML en MPN uit te sluiten. Hiervoor dient karyotypering ter uitsluiting van een t(9;22)(q34;q11.2), moleculaire diagnostiek ter uitsluiting van *BCR-ABL1* fusiegen en mutatie analyse met het MPN diagnose panel (ter uitsluiting van *JAK2*, *CALR* en *MPL* mutaties) te worden gedaan. Atypische CML is t(9;22)(q34;q11.2)/*BCR-ABL1* negatief en wordt gekarakteriseerd door hoge aantallen neutrofiele granulocyten. Bij ca. 10% van de patiënten met atypische CML wordt een mutatie in het *CSF3R* (G-CSF receptor) gen gevonden. Bij mutaties in het membraan proximale domein van *CSF3R* (exon 14, o.a. T618I en T615A) is er meestal sprake van gevoeligheid voor JAK kinase inhibitors als ruxolitinib. Mutaties in het cytoplasmatische domein van *CSF3R* (exon 17, codon 683-823) worden geassocieerd met gevoeligheid voor (SRC) multikinase inhibitors (bv. dasatinib, bosutinib) en JAK kinase inhibitors (bv. ruxolitinib).

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

Bij CMML is het van belang om MPN en CML uit te sluiten. Hiervoor dient een MPN diagnose panel te worden gedaan (ter uitsluiting van *BCR-ABL1* fusiegen en *JAK2*, *CALR* en *MPL* mutaties).

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 mutaties aanwezig zijn in de genen *ASXL1*, *CBL*, *NRAS*, *RUNX1* en *SETBP1*. Deze moleculaire markers maken deel uit van de verschillende prognostische scoringsystemen voor CMML (zoals de Itzykson-score, Mayo Molecular Model (MMM) en CPSS-Mol (CMML – specific prognostic scoring system-molecular).

Systemische Mastocytose (SM)

Morfologie

- microscopische beoordeling met name van mestcellen, differentiatie bloed en beenmergaspiraats
- aantonen van mogelijk bijkomende hematologische maligniteit

Immuunfenotypering

- analyse van afwijkende mestcellen

Moleculaire diagnostiek

- mutatie analyse *KIT* D816
- mutatie analyse *ASXL1* of myeloïd uitgebreide panel (zie cytopenie, blz. 11)

Cytogenetica

- standaard karyotypering
- FISH naar *FIP1L1-PDGFR*A en overige *PDGFR*A-rearrangements

Pathologie

- histologie levert het major criterium voor de diagnose systemische mastocytose, daarnaast mogelijk additionele minor criteria (morfologie, fenotype van de mestcellen).
- uitsluiten overige oorzaken van mestcel toename

Toelichting

Systemische mastocytose wordt gekenmerkt door een clonale 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. Hiervoor is goede beenmerghistologie met immunohistochemie vereist. Wanneer deze diagnose overwogen wordt is het raadzaam om op het aspiraat naast immuunfenotypering (CD117+CD2; CD117+CD25) ook cytogenetica (uitsluiten bijkomende MDS of myeloproliferatieve aandoening) en analyse van de *KIT* D816V mutatie te laten verrichten.

FISH naar de *FIP1L1-PDGFR*A fusie is wenselijk aangezien deze voor kan komen bij de combinatie mastocytose met eosinofilie.

Patiënten met advanced SM (met name SM-AHN; SM met associated hematological neoplasm) hebben een groter risico op progressie en transformatie. Mutatie analyse van *ASXL1* maakt deel uit van het SM Clinical Molecular Prognostic Model. Mutatie analyse van het myeloïd uitgebreide panel kan secundaire mutaties aantonen die wijzen op een geassocieerde hematologische maligniteit.

Myeloïde en lymfoïde neoplasie met eosinofilie / hypereosinofiel syndroom (HES)

Morfologie

- microscopische beoordeling, differentiatie bloed en beenmergaspiraat

Immuunfenotypering

- aantonen hematologische maligniteit en analyse van B- en T-cel lijn

Moleculaire diagnostiek

- zie pathologie voor T-cel receptor clonaliteitsanalyse

Cytogenetica

- standaard karyotypering (o.a. naar 5q32 (*PDGFRB*), 8p11 (*FGFR1*) en *JAK2* rearrangements en inv(16))
- FISH naar *FIP1L1-PDGFR*A en overige *PDGFR*A-rearrangements
- bij onvoldoende aantal en/of kwaliteit van delingen voor karyotypering wordt FISH naar *PDGFRB*, *FGFR1* en/of inv(16) ingezet

Pathologie

- histologische diagnose, schatting beenmergreserve en evt. fibrose
- beoordeling (ook immunohistochemisch) op dysplasie, blastaire transformatie en bijkomende (hematologische) aandoeningen die soms gepaard gaan met toename van eosinofielen
- indien vermoeden onderliggende T-celkloon: T-cel receptor clonaliteitsanalyse

Toelichting

Myeloïde en lymfoïde maligniteiten met eosinofilie worden ingedeeld aan de hand van genherschikkingen van *PDGFR*A, *PDGFR*B, *FGFR*1 en *JAK*2 genen, die leiden tot een afwijkend tyrosine kinase dat in veel gevallen gevoelig is voor imatinib. Het fusiegen *FIP1L1-PDGFR*A wordt veroorzaakt door een deletie op chromosoom 4q12 en kan alleen aangetoond worden met FISH. Door middel van immuunfenotypering van T-celsubsets en analyse van herschikkingspatronen van de T-celreceptorgenen kan een onderliggende T-celaandoening gediagnosticeerd worden.

Acute Lymfatische Leukemie (ALL)

Morfologie

- microscopische beoordeling, differentiatie bloed en beenmergaspiraats
- op indicatie ook liquoronderzoek bij verdenking CZS lokalisatie

Immuunfenotypering

- beenmerg: analyse van blasten en uitrijping, classificatie van de leukemie
- bloed: analyse van blasten, classificatie van de leukemie
- liquor bij verdenking betrokkenheid centraal zenuwstelsel

Moleculaire diagnostiek

- fusiegen detectie *BCR-ABL1* (t(9;22)) met PCR

Cytogenetica

- genetische analyse via genomwijde SNP array
- FISH naar *BCR-ABL1* (t(9;22)) en *KMT2A (=MLL)* (11q23)-rearrangement
- bij kinderen tevens bepaling van *IKZF1* deletie (SNP-array) en FISH naar *ETV6-RUNX1* (t(12;21))

Pathologie

- schatting beenmergreserve, mate van infiltratie en fibrose
- immunohistochemische typering op indicatie (bijv. bevestigen diagnose of aantonen van eventuele andere maligne lymfomen)

Toelichting

De diagnose en classificatie ALL wordt gesteld aan de hand van zowel morfologisch onderzoek als immuunfenotypering.

Genomwijde 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 een specifiek array profiel zijn ook *BCR-ABL1* (t(9;22)) en rearrangements in het *KMT2A (=MLL)* gen risicofactoren met een slechtere prognose.

Morfologisch, immuunfenotypisch en/of cytogenetisch onderzoek (FISH) op liquor kan worden uitgevoerd om mogelijke betrokkenheid van centraal zenuwstelsel vast te stellen.

Chronische Lymfatische Leukemie (CLL)

Morfologie

- microscopische beoordeling, differentiatie bloed en beenmergaspiraat

Immuunfenotypering

- classificatie en analyse van clonaliteit

Moleculaire diagnostiek

- zie cytogenetica

Cytogenetica

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

Pathologie

- schatting beenmergreserve, mate en patroon van infiltratie en fibrose
- immuunhistochemische typering op indicatie (bijv. uitsluiten andere lymfomen)

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. De diagnose wordt bevestigd middels immuunfenotypering van het bloed waarbij een specifiek fenotype wordt gevonden.

Met behulp van moleculaire diagnostiek en cytogenetica worden predictieve markers (bepalend voor de predictie van de respons op therapie) bepaald. Het is uit grote studies bekend dat B-CLL patiënten met *TP53* gen mutatie en/of 17p deletie in het algemeen als groep, slecht reageren op behandeling met het purine analog, fludarabine. *TP53* mutatie en 17p deletie zijn naast predictieve markers ook prognostische factoren, beide geassocieerd met een zeer ongunstige prognose. Mutaties in *TP53* worden bepaald via next generation sequencing technologie door analyse van een genenpaneel (waarin ook andere relevante genen CLL/lymfoom worden geanalyseerd). Het copy aantal van de chromosomen zoals 17p deletie wordt bepaald met genoomwijde SNP array. Met deze technologie worden simultaan ook andere prognostische factoren bepaald, zoals 13q deletie, geassocieerd met gunstige prognose en 11q deletie, geassocieerd met ongunstige prognose. Daarnaast wordt met deze technologie informatie verkregen over een "complex karyotype" en copy neutral LOH van 17p (zie ook: "Identificeren van hoog risico CLL patiënten via analyse van TP53: de meerwaarde van next-generation sequencing en SNP-array" door L. Kroeze en medeauteurs in het NTvH oktober 2017). 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 clonale immuunglobuline zware keten genherschikking.

Plasmacel dyscrasieën (multipel myeloom, MGUS en amyloïdose)

Morfologie

- microscopische beoordeling, differentiatie bloed en beenmergaspiraats
- plasmacellen (evt. plasmablasten) in bloed en beenmerg, classificatie

Immuunfenotypering

- analyse van plasmacellen, clonaliteit

Moleculaire diagnostiek

- n.v.t.

Cytogenetica

- cytogenetisch onderzoek wordt uitgevoerd op CD138-verrijkte plasmacellen
- genomwijde SNP array naar prognostisch relevante afwijkingen del(13q14), del(17p)/*TP53*, del(1p), gain(1q) en hyperdiploidie
- bij mutiple myeloom en MGUS: interfase FISH naar prognostisch relevante afwijkingen t(4;14)/*IGH-FGFR3* en t(14;16)/*IGH-MAF* en eventueel andere *IGH*-rearrangements
- bij amyloïdose: interfase FISH naar afwijkingen t(4;14)/*IGH-FGFR3* en t(11;14)/*IGH-CCND1*

Pathologie

- histologische en zo nodig immunohistochemische bevestiging diagnose en uitsluiten andere plasmacytoid uitrijpende lymfomen en blastaire transformatie (plasmacytair versus plasmablastaire type)
- schatting mate van infiltratie, beenmergreserve en fibrose
- uitsluiten amyloïdose (congorood kleuring)

Toelichting

Maligne plasmacel aandoeningen zijn het gevolg van de aanwezigheid van monoclonale plasmacellen en worden in veel gevallen gekenmerkt door de aanwezigheid van een monoclonale proteïne in serum en/of urine. Naast onderzoek van vrije lichte ketens en beeldvorming (CT, MRI en/of PET), is voor diagnosestelling morfologische beoordeling en immuunfenotypering van beenmergaspiraats, en histologisch onderzoek van beenmergbiopsie van belang. Hierdoor kan een onderscheid gemaakt worden tussen monoclonale gammopathie of undetermined significance (MGUS) en multipel myeloom (MM). 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

Morfologie

- microscopische beoordeling, differentiatie bloed en beenmergaspiraat

Immuunfenotypering

- analyse van clonaliteit en classificatie

Moleculaire diagnostiek

- zie pathologie

Cytogenetica

- standaard karyotypering bij verdenking op beenmerglokalisatie, afhankelijk van type lymfoom
- bij onvoldoende aantal en/of kwaliteit van delingen voor karyotypering kan interfase FISH naar *IGH*-translokaties uitgevoerd worden

Pathologie

- histologische diagnose inclusief immuunhistochemie
- schatting mate van infiltratie, beenmergreserve en fibrose, indien relevant
- beoordeling evt. transformatie bij kleincellige lymfomen
- immuunglobuline/T-cel receptor clonaliteitsanalyse: *IGH-V(D)J*, *IGH-DJ*, *IGK-VJ*, *IGK-DE*, *TRB-V(D)J*, *TRB-DJ*, *TRG-VJ* en indien noodzakelijk *IGL-VJ* en *TRD-V(D)J* rearrangements
- op indicatie ISH EBER en/of FISH voor *ALK*, *BCL2*, *BCL6*, *MYC*, *CCND1*, *IGL* en *IGH* rearrangements
- fusiegen detectie *BIRC3-MALT* (t(11;18)(q21;q21)) middels RT-PCR
- fusiegen detectie *BCL2-IGH* (t(14;18)(q32;q21)) middels PCR
- mutatie analyse *BRAF* V600E (hairy cell leukemia en Langerhans histiocytose)
- mutatie analyse *MYD88* (o.a. hotspot mutatie p.L265P) (o.a. Waldenström, lymfoplasmacytair lymfoom, LPL, intraoculair lymfomen)
- mutatie analyse van een aantal specifieke genen voor DD lymfoom

Toelichting

De diagnosestelling en classificatie van non Hodgkin lymfomen en Hodgkin lymfomen gebeurt met behulp van histologie en aanvullende immuunhistochemische en moleculaire technieken. Wanneer voldoende vers weefsel aanwezig is wordt tevens cytogenetica en immuunfenotypering uitgevoerd. Bij diagnosestelling van lymfomen (differentiaal diagnose met reactieve lesies) is clonaliteitsanalyse van de immuunglobuline en T-cel receptor genen een belangrijke ondersteunende test. Het volledige pakket van de immuunglobuline en T-cel receptor genen wordt geanalyseerd volgens de door het laboratorium pathologie mede-ontwikkelde EuroClonality/BIOMED-2 methode. Immuunglobuline en T-cel receptor genherschikkingen worden tevens gebruikt om clonale verwantschap tussen meerdere lymfomen van een patiënt te bepalen, zodat onderscheid kan worden gemaakt tussen ziekte disseminatie of de aanwezigheid van meerdere primaire lymfomen.

Specifieke chromosomale translocaties en/of genmutaties zijn richtinggevend voor de classificatie van lymfomen. Eén van deze translocaties is de t(11;18)(q21;q21) translocatie welke geassocieerd is met het extra-nodale marginale zone lymfoom van het MALT type. MALT-lymfomen met deze t(11;18)(q21;q21) translocatie zijn resistent tegen behandeling voor *Helicobacter pylori*. Translocaties worden bepaald via PCR-gebaseerde technieken en/of FISH. De aanwezigheid van genmutaties in een aantal specifieke genen wordt via next generation sequencing met het "lymfoom genen panel" vastgesteld.

Lymfocytose e.c.i.

Morfologie

- microscopische beoordeling, differentiatie bloed en beenmergaspiraat

Immuunfenotypering

- analyse van lymfocyten subpopulaties
- bij afwijkende populaties: uitgebreide analyse (classificatie)

Moleculaire diagnostiek

- n.v.t.

Cytogenetica

- standaard karyotypering (op indicatie)
- bij T-PLL tevens FISH naar een *TCL1* rearrangement

Pathologie

- zie Non Hodgkin lymfoom (blz. 18)

Toelichting

Het onderzoek is gericht op het aantonen van afwijkende celpopulaties en het vinden van een verklaring voor de lymfocytose.

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.