

## Leidraad Tumor-First testaanpak bij recent gediagnosticeerde ovariumcarcinoom patiënten

Versie 1, februari 2022

Tjalling Bosse, patholoog LUMC (voorzitter)

Carel van Noesel, patholoog en KMBP AmsterdamUMC

Frans Hogervorst, LSKG AVL

Wouter Koole, LSKG UMC Utrecht

Erik Jan Dubbink, KMBP Rotterdam MC

Marjolijn Ligtenberg, LSKG en KMBP Radboudumc (penvoerder)

### Inleiding

Alle patiënten met ovariumcarcinoom hebben een indicatie voor onderzoek naar erfelijke aanleg. Bij de Tumor-First aanpak worden zowel somatische (verworven) als kiembaan (erfelijke) mutaties gedetecteerd, maar wordt het onderscheid tussen beiden niet gemaakt. Genetisch onderzoek op tumorweefsel bij patiënten met ovariumcarcinoom biedt informatie t.b.v. therapiekeuze en over een mogelijke genetische predispositie en dient als selectiecriteria voor kiembaandiagnostiek. Omdat patiënten zo meer selectief gebruik maken van genetische counseling, is dit zorgtraject doelmatiger en voor de patiënt minder belastend.

Omdat bij de meeste vrouwen de tumortest negatief is, vervangt de test op tumorweefsel voor een groot deel van de vrouwen een kiembaantest op bloed. Dit is de reden dat de test valt onder de reikwijdte van de wet bijzondere medische verrichtingen (WBMV), waarin de klinisch genetische disciplines de taak hebben de kwaliteit van de diagnostiek te bewaken.

Voor implementatie van deze werkwijze is een aantal voorwaarden gedefinieerd:

1. De kwaliteit van de Tumor-First test is gewaarborgd en is vergelijkbaar met een kiembaantest op bloed, waarbij alle genen worden geanalyseerd die t.b.v. familieonderzoek relevant zijn.
2. De uitvoering van de Tumor-First test vindt alleen plaats binnen centra waarin een patholoog, klinisch moleculair bioloog in de pathologie (KMBP) en laboratoriumspecialist klinische genetica (LSKG) nauw samenwerken.
3. Voor de rapportage van Tumor-first analyses worden landelijke normen vastgesteld en er wordt voldaan aan deze normen.
4. De communicatie over de test en over de uitslag met de patiënte is gewaarborgd.
5. Financiering van de Tumor-First test dient geregeld te zijn.

Dit document richt zich op de punten 1 t/m 3 en is opgesteld in het kader van het KWF-project “Tumor-First workflow: nationwide implementation of ovarian cancer heredity prescreening, to stratify both genetic testing and treatment options” (projectnummer 12732). Binnen dit project richt WP2 zich op de randvoorwaarden en de kwaliteit van de test en de verslaglegging daarvan. Voor een praktische invulling hiervan naar de dagelijkse praktijk is consensus gezocht met de betrokken professionals. In februari 2021 is een enquête verspreid onder KMBP, LSKG en pathologen van de academische ziekenhuizen en het AVL om de stand van zaken c.q. plannen aangaande het testen van ovariumcarcinomen op de aanwezigheid van bekende kankerpredispositiegenen en de daarmee samenhangende rapportage en organisatie te inventariseren. Deze inventarisatie is in mei 2021 als

basis gebruikt voor het opstellen van een aantal aanbevelingen, die zijn voorgelegd aan KMBP, pathologen, LSKG en klinisch genetici. Deze aanbevelingen en het percentage respondenten, dat zich hierin kon vinden is opgenomen als bijlage van dit document. Deze aanbevelingen en de daaruit voortvloeiende discussie vormen de basis van deze leidraad.

### Definitie van Tumor-First test

Een analyse op ovariumtumorweefsel van de genen die volgens de Nederlandse richtlijn erfelijke ovariumkanker moeten zijn geïncorporeerd in een kiembaananalyse. De gevoeligheid van de analyse voor de detectie van kiembaanvarianten is vergelijkbaar met een kiembaantest op bloed en daarnaast kunnen somatische veranderingen in deze genen worden gedetecteerd. Voor optimale afstemming en kwaliteit dient de Tumor-First test uitgevoerd te worden in een centrum waarin door professionals van de afdeling Pathologie en afdeling Genetica nauw wordt samengewerkt en dient de test door beide disciplines te worden goedgekeurd voor deze toepassing.

### Aanvraag en inclusie tumormateriaal

1. Bij de Tumor-First test speelt de gynaecopatholoog van het uitvoerend centrum een centrale rol in het aanvragen van de test, de kwaliteitscontrole van het weefsel, de integratie van de moleculaire uitslag in het PA-rapport en de bespreking in het MDO. Onderdelen van dit proces, zoals bijvoorbeeld het aftekenen van de tumor en het beoordelen van tumorpercentage kunnen ook door andere pathologen worden overgenomen.
2. Naast de gynaecopatholoog in het uitvoerend centrum hebben ook de gynaecopathologen in andere ziekenhuizen de verantwoordelijkheid om een Tumor-First aan te vragen op geleide van afspraken die met het multidisciplinair behandelteam in de regio zijn gemaakt, de integratie van de bevindingen in het lokale PA-rapport en de bespreking van de testresultaten in het MDO.
3. De Tumor-First test aanvraag wordt in principe gedaan op het moment dat de patholoog de diagnose “ovariumcarcinoom” stelt, de patiënt niet heeft gekozen voor opt-out en er in Palga niet reeds eerder een Tumor-First analyse is geregistreerd. Hierbij worden de lokale in- en externe aanvraagprocedures gevolgd.
4. Indien een Tumor-First analyse wordt aangevraagd mag het uitvoerend laboratorium ervan uitgaan dat de patiënt geen gebruik heeft gemaakt van de opt-out optie voor de Tumor-First test.
5. Conform de herziening van de richtlijn erfelijk ovariumcarcinoom (2021/2022) komen alle ovariumcarcinomen, tubacarcinomen of carcinomen ter plaatse van het peritoneum ongeacht het histologische type in aanmerking voor de test, hoewel dit met de komst van het meest recente classificatiesysteem (WHO2014 en/of WHO2020 Classification of Ovarian Cancer) op termijn mogelijk kan worden ingeperkt.
6. Het uitgangsmateriaal waar de Tumor-First test op verricht wordt kan variëren, zoals ascites, biopsies en resecties ook als er eerder al een vorm van therapie is gegeven. Er is geen bewijs dat dit een negatieve impact heeft op het testresultaat.
7. Binnen het pathologielaaboratorium kan worden overwogen om voor de casussen uit de eigen pathologiepraktijk periodiek te controleren of een Tumor-First test is ingezet (of overwogen).

## Samenstelling genenpaneel

1. Met de Tumor-First test dienen de ovariumcarcinoom predispositie genen te worden geanalyseerd. Conform de herziening van de richtlijn erfelijk ovariumcarcinoom (2021/2022) betreft dit: *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2*, *RAD51C* en *RAD51D* (de erfelijke ovariumcarcinoom core genen)
2. Om alle klinisch relevante varianten aan te tonen dient geanalyseerd te worden op zowel single-nucleotide variants (SNVs) en multi-nucleotide variants (MNVs), als copy number variants (CNVs) die leiden tot deletie (en in zeldzame gevallen duplicatie) van een of meerdere exonen.
3. Voor de detectie van SNVs en MNVs wordt een NGS analyse gebruikt die een volledige dekking heeft van de coderende sequenties inclusief de flankerende intron regio's. Deze regions of interest (ROIs) bevatten aan weerskanten van de exonen minimaal 5 nt, echter met name aan de 5' kant, de acceptorsite kant, van het exon wordt het sequencen van 20 nt flankerende intron sequentie aanbevolen.
4. De huidige NGS technieken zijn niet (altijd) in staat om alle CNVs aan te tonen. De Tumor-First test zal daarom veelal uit een combinatie van een NGS techniek en MLPA bestaan. Gezien de frequentie van voorkomen van CNVs en hun klinische relevantie is het acceptabel om een MLPA analyse te beperken tot de analyse van intragene deleties in *BRCA1* en de analyse te richten op kiembaanvarianten, zodat alleen verlies van meer dan 50% van de kopieën gedetecteerd hoeft te worden.
5. Het analyseren van een breder genenpaneel dan *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2*, *RAD51C* en *RAD51D* kan worden overwogen, mits dit de betrouwbaarheid van de analyse van de Tumor-First core genen niet vermindert en wordt voorkomen dat deze uitgebreide analyse leidt tot verkeerde behandelkeuzes of onterechte doorverwijzing naar een klinisch geneticus.

## Validatie van de test

De Tumor-First test moet zijn gevalideerd voor de beoogde toepassing. Aandachtspunten die hierbij moeten worden geïncorporeerd zijn:

1. Validatie en optimalisatie van de detectie van pathogene varianten in mononucleotide repeat stretches in *BRCA1* en *BRCA2*.
2. De diepte van sequencen moet over het gehele ROI van de core genen voldoende zijn om zowel kiembaanvarianten als somatische varianten betrouwbaar aan te tonen. De minimale diepte van sequencen is daarom afhankelijk van het percentage neoplastische cellen.
3. Er dienen afkapwaarden voor diepte van sequencen gedefinieerd te worden voor betrouwbare detectie van (1) kiembaanvarianten en (2) somatische varianten. Deze waarden kunnen worden onderbouwd aan de hand van validatiemonsters en/of door het gebruik van unique molecular identifiers (UMIs), waarmee het aantal geanalyseerde template moleculen kan worden vastgesteld. Deze waarden dienen gebruikt te worden om (1) individuele casussen af te keuren indien de vereiste diepte van sequencen niet voor 100% (diepte voor kiembaanvarianten) of voor 90% (diepte voor somatische varianten) over de gehele ROI van de core genen wordt gehaald, en om (2) individuele casussen niet te analyseren omdat de te detecteren variant allel frequentie (VAF) voor de detectie van somatische varianten met de gebruikte workflow niet gehaald kan worden.

4. Validatie en optimalisatie van detectie van exondeleties en waar mogelijk -duplicaties in FFPE materiaal, waarbij aandacht dient te zijn voor de relatief frequent in Nederland voorkomende 510 bp deletie van exon 22 (61bp) en de 3835 bp deletie van exon 13 (172 bp) van *BRCA1*.
5. De validatie dient erop gericht te zijn om een standaard disclaimer die wijst op een tekortkoming van de test t.o.v. een reguliere kiembaantest te kunnen vermijden.
6. Binnen één centrum zijn KMBP en LSKG in samenspraak met gynaecopatholoog en klinisch geneticus, gezamenlijk verantwoordelijk voor de methodevalidatie en de daaraan verbonden criteria voor invoering van de test in het kader van Tumor-First, d.w.z. voor gebruik als prescreen voor kiembaandiagnostiek en therapiestratificatie.

### Interpretatie en rapportage van de testresultaten

1. Classificatie van de varianten in de core genen wordt gedaan volgens de afspraken van het Landelijk Overleg Borstkankerdiagnostiek (LOB). Het is van belang dat de varianten in de core genen worden geïnterpreteerd door hierin gespecialiseerde LSKG, die aansluiting hebben bij het LOB, zodat de interpretatie van individuele varianten voor heel Nederland en daarmee binnen een familie hetzelfde is. Classificatie van varianten wordt steeds vaker uitgevoerd volgens de systematiek van de ACMG/AMP, op basis van door expertpanels gedefinieerde gen-specifieke aanpassingen.
2. Ter verhoging van de kwaliteit en efficiëntie van de classificatie van varianten wordt aanbevolen om bij de afdelingen Genetica en Pathologie een gezamenlijke database te hanteren en afspraken te maken wat de rol van de LSKG is bij de interpretatie van reeds eerder geclassificeerde varianten.
3. Waarschijnlijk pathogene (klasse 4) en pathogene (klasse 5) varianten worden altijd gerapporteerd en benigne (klasse 1) en waarschijnlijk benigne (klasse 2) varianten worden nooit gerapporteerd. Het wordt aanbevolen om ook varianten met onbekende pathogeniciteit (klasse 3) die neigen naar klasse 4 te rapporteren. Dit betreffen uitzonderlijke varianten, die mogelijk een defect in de splicing introduceren, die middels RNA analyse kunnen worden onderzocht, of varianten die door het Landelijk Overleg BRCA diagnostiek (LOB) als zodanig zijn aangemerkt. Het is acceptabel om de overige klasse 3 varianten niet te rapporteren omdat er slechts een kleine kans is dat deze klinisch relevant worden. Het wel rapporteren van deze varianten zou kunnen leiden tot verwarring in de kliniek en tot onrust bij de patiënt. Deze klasse 3 varianten moeten wel in de gezamenlijke database worden geregistreerd.
4. Homologe repair deficiëntie wordt pas verwacht bij inactivatie van beide allelen van een core gen. Het a priori risico op verlies van het 2<sup>e</sup> allel bij een klinisch relevante variant in *BRCA1* en *BRCA2* is zo hoog, dat de toegevoegde waarde van deze informatie voor deze genen bij ovariumcarcinomen nihil is. Het inschatten van de inactivatie van het 2<sup>e</sup> allel, die vaak samengaat met verlies van heterozygotie is met name van belang wanneer een (experimentele) therapie wordt overwogen bij klinisch relevante varianten in *BRIP1*, *RAD51C*, *RAD51D* en *PALB2*. Patiënten komen veelal alleen voor een dergelijke therapie in aanmerking bij bi-allelische inactivatie van deze genen. Omdat de bepaling van inactivatie van het 2<sup>e</sup> allel lastig kan zijn, bv bij bepaalde percentages neoplastische cellen en bij het ontbreken van informatieve SNPs, is het niet essentieel deze informatie in de uitslagen op te nemen. Indien de status van het 2<sup>e</sup> allel uiteindelijk alsnog relevant wordt kan deze info worden gegenereerd uit de aanwezige data en/of additionele analyses.

## Verslaglegging

1. Verslaglegging van Tumor-First analyse vindt plaats binnen het pathologie systeem, zodat de verslagen via PALGA ook door andere pathologielaboratoria zijn in te zien.
2. Ten behoeve van monitoring van het gebruik van de Tumor-First analyse wordt verzocht de term “Tumor-First analyse ovariumcarcinoom” in het verslag op te nemen.
3. Verslaglegging volgt de reguliere opbouw en bevat de standaard items die vereist zijn volgens ISO 15189

### Conclusietekst (conclusie moleculair resultaat in de microscopie sectie en/of eindconclusie van pathologieverslag)

1. In de conclusietekst dient te worden opgenomen dat een Tumor-First test is uitgevoerd en wat het klinisch relevante testresultaat is.
2. Bij voorkeur wordt uitgegaan van scenario-specifieke standaardformuleringen, die waar nodig casus-specifiek kunnen worden aangepast. Zie voor voorbeeldteksten tekstkader.
3. Bij het rapporteren van een (waarschijnlijk) pathogene variant of een variant die neigt naar waarschijnlijk pathogeen in één van de core genen, dient te worden geattendeerd op de mogelijke kiembaan-origine van de variant en dient een advies / verwijzing voor genetische counseling en een kiembaantest te worden opgenomen.
4. Indien gewenst kan ook worden aangegeven wat het resultaat betekent voor de kans op respons op PARP-remmers. Voor *BRCA1* en *BRCA2* pathogene varianten geldt dat de respons over het algemeen relatief goed is, terwijl dit voor de andere core genen in het panel vooralsnog nog onduidelijk is. Bij GenQA en EMQN rondzendingen wordt aftrek gegeven als hierover geen informatie wordt gegeven.
5. Indien geen klinisch relevante variant wordt gerapporteerd, is het wenselijk de aanvrager erop te attenderen dat desondanks een verwijzing naar de klinisch geneticus zinvol kan zijn bij een positieve familie anamnese.
6. Indien het aangeleverde materiaal ongeschikt is voor de Tumor-First analyse, omdat het percentage neoplastische cellen te laag is voor een betrouwbare somatische analyse, of omdat de kwaliteit of kwantiteit van het DNA onvoldoende is voor de analyse, dient gewezen te worden op de mogelijkheid van het aanleveren van materiaal bij een vervolgingreep of de mogelijkheid te verwijzen naar een klinisch genetische counseling en een kiembaantest.
7. Indien een specifieke test technisch suboptimaal is, waardoor de kans vergroot is dat een kiembaanvariant is gemist, dient dit in de conclusie te worden opgenomen.
8. Indien naast de core-genen andere genen zijn opgenomen in het panel is het vinden van een klinisch relevante variant in principe geen reden voor verwijzing naar een klinisch geneticus, tenzij hiervoor een uitzondering is gemaakt door de projectgroep tumor- en erfelijkheidsdiagnostiek (zie <https://www.vkgn.org/files/8666/20211006%20Adviezen%20projectgroep%20tumor-%20en%20erfelijkheidsdiagnostiek%20definitief.pdf>)

In Box 1 wordt een voorbeeld van conclusieteksten gegeven.

#### Box1: Voorbeeld conclusieteksten

##### Kort sjabloon-tekst zonder therapiekeuze

1. *Met een (waarschijnlijk) pathogene variant*

Er is een [waarschijnlijk] pathogene *BRCA1/BRCA2/BRIP1/PALB2/RAD51C/RAD51D* variant in deze tumor gevonden. Omdat de analyse is uitgevoerd op tumor DNA kan dit zowel een somatische als kiembaan variant betreffen. Verwijzing naar een klinisch geneticus voor nader onderzoek naar een erfelijke aanleg wordt geadviseerd.

2. *Met een VUS die neigt naar klasse 4 (ivm mogelijk splicing defect of o.b.v. oordeel LOD)*

Er is een verdachte variant met onbekende pathogeniciteit in *BRCA1/BRCA2/BRIP1/PALB2/RAD51C/RAD51D* in deze tumor gevonden. [Mogelijk heeft deze variant effect op de splicing van het gen.] Aan deze variant kunnen vooralsnog geen klinische consequenties worden verbonden. Omdat de analyse is uitgevoerd op tumor DNA kan dit zowel een somatische als kiembaan variant betreffen. Verwijzing naar een klinisch geneticus voor nader onderzoek naar een erfelijke aanleg wordt geadviseerd.

3. *Zonder een pathogene variant*

Geen pathogene *BRCA1, BRCA2, BRIP1, PALB2, RAD51C* of *RAD51D* variant aangetoond in deze tumor. Een verwijzing naar een klinisch geneticus kan desondanks worden overwogen, indien de familiegeschiedenis daartoe aanleiding geeft.

4. *Zonder pathogene variant, maar met een tekortkoming in de analyse*

Geen pathogene *BRCA1, BRCA2, BRIP1, PALB2, RAD51C* of *RAD51D* variant aangetoond in deze tumor. Omdat de MLPA van *BRCA1* niet betrouwbaar kon worden geanalyseerd, is er een kleine kans dat er klinisch relevante kiembaanvariant is gemist. Een verwijzing naar een klinisch geneticus kan worden overwogen, zeker indien de familiegeschiedenis daartoe aanleiding geeft.

5. *Weefsel onvoldoende geschikt voor betrouwbare analyse*

Betrouwbare analyse van het *BRCA1, BRCA2, BRIP1, PALB2, RAD51C* en *RAD51D* gen is op het beschikbare materiaal niet mogelijk. Aanvragen van deze analyse op materiaal van een eventuele vervolgingreep kan worden overwogen. Indien geen tijdige tumortest kan worden gedaan, is er reden voor verwijzing naar een klinisch geneticus voor nader onderzoek naar een erfelijke aanleg voor borst- en ovariumcarcinoom.

### Lange sjabloon-tekst met therapiekeuze

1. *Met een (waarschijnlijk) pathogene variant*

a. Er is een [waarschijnlijk] pathogene *BRCA1/BRCA2* variant aangetoond in het tumor-DNA van dit ovariumcarcinoom. Ovariumcarcinomen met een dergelijke variant reageren relatief goed op PARP-remmers. Deze variant kan duiden op een erfelijke aanleg voor borst- en ovariumcarcinoom, met de daarbij horende kankerrisico's voor de patiënt en haar familieleden. Deze uitslag is reden voor nader onderzoek naar een dergelijke aanleg en daarmee verwijzing naar een klinisch geneticus.

b. Er is een (waarschijnlijk) pathogene *BRIP1/PALB2/RAD51C/RAD51D* variant aangetoond in het tumor-DNA van dit ovariumcarcinoom. Het is vooralsnog onduidelijk wat de betekenis hiervan is voor de respons op PARP-remmers. Deze variant kan duiden op een erfelijke aanleg voor borst- en ovariumcarcinoom, met de daarbij horende kankerrisico's voor de patiënt en haar familieleden. Deze uitslag is reden voor nader onderzoek naar een dergelijke aanleg en daarmee verwijzing naar een klinisch geneticus.

2. *Met een VUS die neigt naar klasse 4 (ivm mogelijk splicing defect of o.b.v. oordeel LOD)*

Er is een verdachte variant met onbekende pathogeniciteit in *BRCA1/BRCA2/BRIP1/PALB2/RAD51C/RAD51D* aangetoond in het tumor-DNA van dit ovariumcarcinoom. [Mogelijk heeft deze variant effect op de splicing van het gen.] Het is vooralsnog onduidelijk wat de betekenis hiervan is voor de respons op PARP-remmers. Deze variant kan mogelijk duiden op een erfelijke aanleg voor borst- en ovariumcarcinoom, met de daarbij horende kankerrisico's voor de patiënt en haar familieleden. Deze uitslag is reden voor nader onderzoek naar een dergelijke aanleg en daarmee verwijzing naar een klinisch geneticus.

3. *Zonder een pathogene variant*

Er is geen pathogene *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2*, *RAD51C* of *RAD51D* variant aangetoond in het tumor-DNA van dit ovariumcarcinoom. Ovariumcarcinomen zonder pathogene *BRCA1* of *BRCA2* variant zijn in de regel minder gevoelig voor PARP-remmers. Hiermee is ook geen aanwijzing gevonden voor een erfelijke aanleg voor borst- en ovariumcarcinoom. Desondanks kan er reden zijn om verwijzing naar een klinisch geneticus te overwegen, indien de familiegeschiedenis daartoe aanleiding geeft.

4. *Zonder een pathogene variant, maar met een tekortkoming in de analyse*

Er is geen pathogene *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2*, *RAD51C* of *RAD51D* variant aangetoond in het tumor-DNA van dit ovariumcarcinoom. Omdat de MLPA van *BRCA1* niet betrouwbaar kon worden geanalyseerd, is er een kleine kans dat er een klinisch relevante kiembaanvariant is gemist. Ovariumcarcinomen zonder pathogene *BRCA1* of *BRCA2* variant zijn in de regel minder gevoelig voor PARP-remmers. Hiermee is ook geen aanwijzing gevonden voor een erfelijke aanleg voor borst- en ovariumcarcinoom. Een verwijzing naar een klinisch geneticus kan worden overwogen, zeker indien de familiegeschiedenis daartoe aanleiding geeft

5. *Weefsel onvoldoende geschikt voor betrouwbare analyse*

Betrouwbare analyse van het *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2*, *RAD51C* en *RAD51D* gen is op dit materiaal niet mogelijk. Aanvragen van deze analyse op materiaal van een ander T-nummer kan worden overwogen. Indien dit niet beschikbaar is, is er reden voor verwijzing naar een klinisch geneticus voor nader onderzoek naar een erfelijke aanleg voor borst- en ovariumcarcinoom en daarmee samenhangende gevoeligheid van de tumor voor PARP-remmers.

[...] afhankelijk van de context kan de tekst tussen rechte haken worden weggelaten.

#### Resultaattekst (microscopie sectie)

1. De variant allel frequentie (VAF) van een klinisch relevante variant kan worden opgenomen in de resultaattekst, maar niet in de conclusietekst.
2. Een lage VAF van een klinisch relevante variant is geen reden om af te zien van een verwijzing voor genetische counseling en een kiembaantest.
3. De gevoeligheid/betrouwbaarheid van de test dient te worden opgenomen in de resultaattekst.
4. Indien (een deel) van de test niet aan de gestelde kwaliteitscriteria voldoet dient dit te worden aangegeven.
5. De classificatie van de variant VUS, waarschijnlijk pathogeen en pathogeen dient te worden opgenomen in het resultaat, waarbij met name bij missense en mogelijke splice site varianten het geven van achtergrondinformatie op basis waarvan men is gekomen tot de classificatie wordt geadviseerd.

#### Kwaliteit

1. Conform ISO 15189 normen is regelmatige participatie aan externe kwaliteitsrondes verplicht. Voor een Tumor-First analyse op ovariumcarcinomen wordt deelnemen aan de EMQN/GenQA rondzending aanbevolen. Ten behoeve van de implementatie van de Tumor-First werkwijze is deelname aan deze rondzending in 2022 wenselijk.
2. Omdat de Tumor-First analyses in nauwe samenwerking tussen pathologen, KMBP en LSKG worden uitgevoerd is het vastleggen van werkafspraken in de betreffende kwaliteitssystemen gewenst. We bevelen aan deze leidraad daarin op te nemen.

### Keuze van een kiembaantest na een Tumor-First analyse

Indien een kiembaantest wordt aangevraagd na het aantonen van een klinisch relevante variant in de Tumor-First analyse, kan gekozen worden voor een gerichte analyse van de in de tumor aangetoonde variant, mits geborgd is dat de in de tumor gedetecteerde variant kan worden aangetoond. Indien dit niet het geval is, wordt geadviseerd om een compleet genpanel in te zetten.

### Bekostiging

Om de implementatie van de Tumor-First werkwijze te bevorderen is het niet wenselijk om via een onderlinge dienstverlenings-(ODV) systematiek een rekening te sturen naar de gynaecologen. Omdat de Tumor-First analyse veel verwijzingen naar klinische genetica en kiembaantesten voorkomt, is door de hoofden van de afdelingen klinische genetica de ruimte geboden om deze analyses via een klinisch genetisch tarief te declareren. Hierdoor gaat de rekening rechtstreeks naar de ziektekostenverzekering van de patiënt. Vertegenwoordigers van verschillende ziektekostenverzekeraars staan achter deze werkwijze. Geadviseerd wordt om hiervoor binnen het eigen centrum procedures in te richten. Financieringsmogelijkheden via een facultatieve prestatie blijken op dit moment te complex om te worden verwezenlijkt.



## Bijlage 1. Enquete omtrent mogelijke aanbevelingen voor de Tumor-First diagnostiek

In mei 2021 is in 2 delen een lijst met voorlopige aanbevelingen (stellingen), die waren gebaseerd op een eerdere inventarisatie, verspreid onder in totaal 36 KMBP, LSKG, gynaecopathologen en klinisch genetici van de academische ziekenhuizen en het AVL met het doel te komen tot een consensus werkwijze van het testen van ovariumcarcinomen op de aanwezigheid van bekende kankerpre-dispositiegenen. De respons bedroeg 78% voor deel 1 (aanbeveling 1 t/m 15) en 61% voor deel 2 (aanbeveling 16 t/m 29). Het resultaat is bediscussieerd met 14 -20 participanten verdeeld over 3 momenten (resp. 16 (aanbeveling 1 t/m 12) , 20 (aanbeveling 13 t/m 17) en 14 participanten (aanbeveling 18 t/m 29) (LSKG, KMBP en gynaecopathologen).

Hieronder staan de afzonderlijke voorlopige aanbevelingen. Op elke aanbeveling kon gereageerd worden op een 7-punts Likertschaal lopend van (1) helemaal mee oneens tot (7) helemaal mee eens. Aan elke aanbeveling is het percentage toegevoegd dat een score hoger dan vier (d.w.z. mee eens tot helemaal mee eens) heeft gegeven. Deze input en de gevoerde discussie heeft de basis gevormd voor de leidraad. Om verwarring te voorkomen hebben we in onderstaande verslag de term “aanbeveling” gewijzigd naar “stelling”.

### **Stellingen rondom de moleculaire test ten behoeve van de Tumor-First analyse bij ovariumcarcinoom**

BRCA-sequencing op DNA geëxtraheerd uit ovariumtumoren wordt op dit moment in 6 van de 8 centra uitgevoerd. 2 centra zijn zich aan het voorbereiden op deze analyse.

#### **Aanvraag en inclusie materiaal**

Bij alle centra die al gebruik maken van de Tumor-First test speelt de patholoog een belangrijke rol in het aanvragen van de test. De exacte routing (via hix /rol gynaecoloog bij aanvraag) is niet overal identiek. Volledige uniformiteit op dit punt is niet een doel op zich, wel moet geborgd worden dat alle patiënten waarvoor de test geïndiceerd wordt ook uitgevoerd wordt.

#### **Stelling 1:**

*Er moet geborgd worden dat de test uitgevoerd wordt op alle patiënten waarvoor de test geïndiceerd is ( 100% > neutraal = 100% eens).*

De betrokken gynaecopatholoog is regelmatig aanvrager van de test op het tumor weefsel. In enkele centra is de gynaecopatholoog actief betrokken bij verschillende processtappen, zoals het aftekenen van de tumor en het beoordelen van tumorpercentage, waar dit in andere centra ook door andere pathologen wordt gedaan. In enkele centra reviseert de gynaecopatholoog het tumortype. Ook bij de uitslagverwerking en integratie van de uitslag in het PA rapport speelt de gynaecopatholoog een rol.

Het uitgangsmateriaal waar de tumortest op verricht wordt kan variëren, zoals ascites, biopten en resecties. Het kan voorkomen dat er al een vorm van therapie aan voorafgegaan is, er is geen bewijs dat dit negatieve impact heeft op de test.

Volgens de huidige literatuur komen BRCA1/2 mutaties niet exclusief voor in een bepaald histologisch subtype. Vanuit de pathologie zijn veel vragen over de validiteit van deze resultaten met name in het licht van de meest recente inzichten en het meest recente classificatie systeem. In de meeste recente herziening van de richtlijn erfelijk ovariumcarcinoom wordt ondanks deze argumenten toch aanbevolen om de test uit te voeren op alle epitheliale ovariumcarcinomen en hiervan in de komende jaren een registratie bij te houden.

#### **Stelling 2:**

*De test wordt ingezet op alle recent gediagnosticeerde epitheliale ovariumcarcinomen. Prospectieve registratie van histologisch subtype is wenselijk (82% eens).*

**Stelling 3:**

*De gynaecopatholoog in het centrum waar de tumortest wordt uitgevoerd reviseert de tumor en voert waar nodig additionele analyses uit om het subtype vast te stellen (50% eens).*

**Keuze van de moleculaire test**

Voor de analyse worden verschillende testen gebruikt. In 4 centra wordt een in het laboratorium ontwikkelde test en in 2 centra een commerciële test gebruikt. De 2 centra die zich voorbereiden overwegen gebruik te gaan maken van een commerciële test, maar hebben nog geen definitieve keuze gemaakt. De meest genoemde commerciële test is TSO500, maar slechts 1 lab heeft hier al definitief voor gekozen.

**Stelling 4:**

*Het is acceptabel dat niet alle centra dezelfde test gebruiken, mits de test voldoet aan minimale kwaliteitscriteria die voor deze toepassing worden gesteld (100% eens).*

**Samenstelling genenpanel**

Op grond van de literatuur wordt in de conceptrichtlijn opgenomen dat de genen BRCA1 en BRCA2 minimaal op kiembaanmutaties dienen te worden onderzocht en dat de analyse van BRIP1, RAD51C, RAD51D en PALB2 zeer wenselijk is. Het is niet ondenkbaar dat ook (waarschijnlijk) pathogene varianten in ATM<sup>1</sup> relevant zijn. Voor analyse van de MMR genen blijkt er in geen van de subtypes ovarium carcinoom voldoende grond te zijn voor inclusie in een ovariumcarcinoompanel gericht op detectie van kiembaanmutaties.

Alle 6 centra die Tumor-First analyses uitvoeren hebben volledige dekking van BRCA1, BRCA2, BRIP1, RAD51C en RAD51D en 4 van deze centra hebben ook volledige dekking van PALB2 en ATM<sup>1</sup>. Voor de 2 centra die zich op de test voorbereiden lijkt opnemen van al deze 6 genen in het panel geen probleem.

4 centra testen naast deze genen ook CHEK2 met een hoge populatiefrequentie van een founder pathogene variant en 3 centra hebben ook nog een reeks andere genen in de test waaronder TP53, dat frequent somatisch is gemuteerd in hooggradig sereus ovariumcarcinoom.

**Stelling 5:**

*Voor de analyse in het kader van tumor-First dienen minimaal de complete coderende regio's van BRCA1, BRCA2, BRIP1, RAD51C, RAD51D en PALB2 (core genen) en indien mogelijk ATM<sup>1</sup> te worden geanalyseerd (92% eens).*

**Stelling 6:**

*Er kan worden gekozen voor een test met meer dan de minimaal vereiste genen, mits dit geen negatieve invloed heeft op de analyse en/of interpretatie van de minimale genenset (88% eens).*

**Stelling 7:**

*Uit de verslaglegging moet blijken of een gerapporteerde variant kan duiden op een erfelijke aanleg en of verwijzing naar een klinisch genetisch traject voor nader onderzoek naar een erfelijke aanleg is geïndiceerd (96% eens).*

**Gebruikte NGS platform**

In 3 centra wordt Ion Torrent sequencing en in 3 centra Illumina sequencing gebruikt. De 2 voorbereidende laboratoria zullen op een Illumina gaan sequencen.

In BRCA1 en BRCA2 komen meerdere mononucleotidestretches voor. Ongeveer 5% van de pathogene kiembaanvarianten in BRCA1 en BRCA2 betreffen veranderingen in deze stretches. 6 laboratoria hebben hun test geëvalueerd op dit type mutaties. 3 laboratoria die gebruik maken van Ion Torrent sequencing geven aan dat zij niet alle mutaties hebben gedetecteerd. 3 laboratoria die Illumina sequencing gebruiken hebben alle

mutaties zonder problemen kunnen detecteren. Voordeel van Ion Torrent sequencing is, dat er in de meeste pathologielaboratoria voor andere testen ook gebruik wordt gemaakt van dit platform.

**Stelling 8:**

Voor de analyse in het kader van Tumor-First is het gebruik van een sequencing platform dat efficiënt varianten in mononucleotiderepeats kan detecteren aan te bevelen (76% eens).

**Diepte van sequencen**

Voor het betrouwbaar detecteren van heterozygote varianten (VAF 50%) wordt analyse van 20 unieke template moleculen noodzakelijk geacht. Om 95% van de varianten met een VAF van 10% te detecteren moeten in theorie 150 unieke template moleculen worden gesequenced.

4 centra maken gebruik van een amplicon based methode zonder identificatie van unieke moleculen, waardoor het moeilijk is om het aantal uniek geanalyseerde moleculen in te schatten.

Minimale diepte van sequencen bij 20% tumorcellen varieert in deze centra van 100 (3x) tot 200 (1x) reads.

Minimale diepte van sequencen bij 20% tumorcellen varieert in centra die gebruik maken van UMIs van 50 (1x) tot 150 (1x). Slechts 1 lab (met UMIs) accepteert een lagere sequentie diepte bij een tumorcel percentage van 80%.

De minimale diepte van sequencen is naar alle waarschijnlijkheid in alle centra voldoende om kiembaanvarianten te detecteren, maar de diepte van sequencen is zeker niet altijd voldoende om somatische mutaties bij lagere tumorcelpercentages te detecteren al worden deze monsters wel door de centra geaccepteerd.

**Stelling 9:**

*Zowel de dekking van de genen als de diepte van sequencen moet voldoende zijn om de detectie van kiembaanvarianten te borgen (100% eens).*

**Stelling 10:**

*Voor het betrouwbaar inschatten van de gevoeligheid van de test verdient het de voorkeur het geanalyseerde aantal template moleculen te kwantificeren (56% eens).*

**Stelling 11:**

*De gevoeligheid van de test voor de detectie van somatische varianten met een VAF passend bij het percentage ingeschatte neoplastische cellen moet terug te vinden zijn in de verslaglegging (82% eens).*

**Stelling 12:**

*In een Tumor-First traject, waarin patiënten geen expliciete toestemming geven voor het testen op kiembaanvarianten, moet vermeden worden dat getest wordt op normaal weefsel of tumorweefsel met een percentage neoplastische cellen dat te laag is om somatische mutaties te detecteren (75% eens).*

**Analyseren van exon deleties en duplicaties**

In *BRCA1* kunnen exon deleties of duplicaties voorkomen zoals deletie van exon 22. Dergelijke varianten betreffen ongeveer 19% van de kiembaanvarianten in *BRCA1*. Analyse hiervan blijkt lastig. 2 van de 6 centra, waarin de analyses zijn geïmplementeerd, hebben besloten om geen MLPA meer uit te voeren, gezien het lage succespercentage van de analyse en het voorkomen van fout-positieve uitslagen. In 2 centra wordt de MLPA wel succesvol uitgevoerd. 1 centrum gebruikt een combinatie van CNV detectie obv NGS en MLPA en 1 centrum test voor deze deletie middels een specifieke PCR.

**Stelling 13:**

*Voor de analyse in het kader van Tumor-First heeft het gebruik van een test, waarmee exon deleties en duplicaties in de core genen kunnen worden gedetecteerd, de voorkeur (92% eens).*

**Stelling 14:**

*Voor de analyse in het kader van Tumor-First is het gebruik van een test, waarmee minimaal de exon deleties en duplicaties in BRCA1 kunnen worden gedetecteerd, essentieel (81% eens).*

**Stelling 15:**

*Bij het selecteren van nieuwe testmethoden is het voor het Tumor-First traject essentieel, dat (1) de detectie van varianten in mononucleotiderepeats, (2) het aantal geanalyseerde template moleculen en (3) de detectie van exon deleties en duplicaties in alle core genen is geborgd (68% eens).*

**Rapportage varianten**

In 7 van de 8 ondervraagde laboratoria is er een gedeelde verantwoordelijkheid voor de classificatie van varianten door KMBP en LSKGer. In 3 van de 8 laboratoria wordt gebruik gemaakt van een gezamenlijke database.

**Stelling 16:**

*Voor de classificatie van niet eerder gedetecteerde varianten is betrokkenheid van LSKGer gewenst (95% eens).*

**Stelling 17:**

*Ter verhoging van de kwaliteit en efficiëntie van classificatie van varianten is het delen van een database van genetica en pathologie gewenst (95% eens).*

Bij de test worden niet alleen pathogene klasse 4 en 5 varianten gedetecteerd, maar ook varianten van onduidelijke pathogeniciteit (VUS, klasse 3). Er is landelijke discussie of het rapporteren van klasse 3 varianten in het PA-rapport of in de conclusietekst verstandig is. Dit is met name vanuit de gedachte dat deze nuance wellicht verkeerd geïnterpreteerd wordt door de ontvanger (patiënt/behandelaar). Daar tegenover staat dat in de toekomst wellicht enkele klasse 3 varianten alsnog als pathogeen worden geclassificeerd, zodat een registratie hiervan bijhouden wel van belang lijkt. Educatie van behandelaars die te maken krijgen met deze uitslagen kan hier ook een rol krijgen alsmede ondubbelzinnige verslaglegging hiervan.

**Stelling 18A:**

*Een klasse 3 variant is in principe geen indicatie voor verwijzingsadvies klinische genetica (47% eens).*

**Stelling 18B:**

*Het rapporteren van een klasse 3 variant in een Tumor-First setting is acceptabel (40% eens).*

**Stelling 18C:**

*Het niet rapporteren van een klasse 3 variant in een Tumor-First setting is acceptabel. Het wordt aanbevolen om deze wel te registreren (79% eens).*

**Stelling 19:**

*Indien een klasse 3 variant in de conclusietekst van het PA-verslag gerapporteerd wordt dan dient duidelijk te zijn dat hierop geen klinisch beleid kan worden gemaakt zoals aanpassing therapie, preventieve maatregelen of presymptomatische analyses (89% eens).*

**Stelling 20:**

*In de opleiding van de behandelaars die te maken krijgen met de Tumor-First test dient aandacht te komen voor de juiste interpretatie van dit type testuitslagen (100% eens).*

Voor het rapporteren van VAF is landelijk nog geen consensus, er zijn 3 labs die het wel doen en 3 die het niet doen. Kennis hebben van de VAF kan helpen bij de juiste interpretatie van de casus, echter kan ook richtinggevend zijn of er sprake is van somatische/kiembaan variant. Van belang is dat een test op normaal DNA altijd nodig is om vast te stellen of variant constitutief aanwezig is. Voor overige indicaties binnen de moleculaire pathologie wordt de rapportage van de VAF aanbevolen.

**Stelling 21:**

*Het opnemen van de variant allele frequency (VAF) in het pathologieverslag kan worden overwogen (72% eens).*

De manier waarop de testuitslag en de daaruit voortvloeiende mogelijke indicatie naar klinische genetica is geformuleerd in het pathologie verslag varieert in Nederland. In de PALGA-protocol modules is hier ook nog geen standaard tekst voor aangemaakt.

In een deel van de door de laboratoria gebruikte genenpanels zitten ook genen waarvoor de kans op een pathogene kiembaanvariant nihil is of waarvoor pathogene varianten geen klinisch genetische consequenties hebben, omdat er onvoldoende aanleiding is te denken aan genetische predispositie waarvoor preventieve maatregelen gewenst zijn of dat dit nog onduidelijk is. In de projectgroep tumor- en erfelijkheidsdiagnostiek wordt gewerkt aan een leidraad over verwijzing naar een klinisch geneticus op basis van een tumortest op geleide van een (waarschijnlijk) pathogene variant in specifieke combinaties van gen en tumortypes.

Voor een aantal genen in de panels is het nog onduidelijk wat de invloed van een aberratie is op het effect van PARP remmers.

**Stelling 22:**

*Een standaard conclusietekst voor de testuitslag wordt aanbevolen waaruit ondubbelzinnig kan worden herleid of er sprake is van een indicatie voor een consult klinische genetica (100% eens).*

**Stelling 23:**

*Voor de rapportage van varianten waarvoor klinisch genetische counseling en een eventuele kiembaantest is geïndiceerd zal de leidraad van de projectgroep tumor- en erfelijkheidsdiagnostiek worden gehanteerd, zodra deze beschikbaar is (83% eens).*

**Stelling 24:**

*Indien in de conclusietekst op basis van het testresultaat een inschatting over de mate van gevoeligheid voor PARP remmers wordt vermeld dient dit in algemene bewoordingen te worden uitgedrukt en dient er geen individueel behandeladvies te worden gegeven (75% eens).*

**Stelling 25:**

*Ontwikkeling van landelijke richtlijnen over de rapportage van de mate van gevoeligheid voor PARP remmers obv gevonden varianten wordt aanbevolen (81% eens).*

In 3 van de 8 laboratoria wordt gerapporteerd of een variant in één of twee allelen aanwezig. Ondubbelzinnige analyse van deze status is vaak lastig. Voor BRCA1/2 mutaties bij ovariumtumoren wordt dit aspect op dit moment niet meegewogen in het verdere beleid, al is het mogelijk dat dit in de toekomst anders wordt. Voor andere tumortypes is deze rapportage wellicht wel relevant.

**Stelling 26:**

*Bij ovariumcarcinomen is analyse en rapportage van het aantal geïnactiveerde allelen optioneel (56% eens).*

De uitslagen van een Tumor-First analyse in het kader van ovariumcarcinomen wordt naast de aanvragend patholoog door een aantal centra ook naar de betrokken behandelaar, veelal de gynaecoloog gestuurd.

**Stelling 27:**

*Het maken van werkafspraken met de verschillende professionals in het Tumor-First traject zou moeten borgen dat een testuitslag wordt besproken met de patiënt (100% eens).*

**Bekostiging**

Er zijn tot nu toe verschillende oplossingen gezocht voor het declareren van de Tumor-First analyses.

Het doorberekenen van de kosten van de test aan de gynaecoloog wordt als belemmerend ervaren voor de introductie van Tumor-First.

Een aantal centra heeft aangegeven dat gebruik van een genomdiagnostiek tarief dat rechtstreeks bij de zorgverzekeraar wordt gedeclareerd voor deze analyses niet wenselijk is, omdat dit binnen het ziekenhuis niet geregeld kan worden.

De mogelijkheden voor het inrichten van een facultatieve prestatie voor Tumor-First analyses wordt verkend. Hierbij zou het uitvoerende ziekenhuis de kosten van de test rechtstreeks bij de verzekeraar kunnen declareren. Door het hoofdlijnakkoord zal dit waarschijnlijk niet betekenen dat het totale budget van de uitvoerende ziekenhuizen omhoog gaat.

**Stelling 28:**

*Voor efficiënte implementatie van de Tumor-First werkwijze is het van belang dat aanvragend artsen geen rekening ontvangen (59% eens).*

**Stelling 29:**

*Het inrichten van een facultatieve prestatie is te prefereren boven het gebruik van een genomdiagnostiek tarief (53% eens).*

**Kwaliteit**

Alle 7 laboratoria die Tumor-First analyse uitvoeren hebben één of meerdere malen geparticipeerd in externe kwaliteitsrondzendingen. Waarschijnlijk betreft dit voor alle laboratoria de EMQN/GenQA rondzendingen.

Conform ISO 15189 is regelmatige participatie in externe kwaliteitsrondzendingen verplicht. In het kader van het Tumor-First traject kan er eventueel een specifieke rondzending worden georganiseerd.

**Stelling 30:**

*In het kader van het Tumor-First project is het wenselijk dat alle laboratoria deelnemen aan de EMQN/GenQA rondzending van 2022 (89% eens).*

**Note 1:**

Omdat er onvolledende bewijs is voor de relatie tussen de aanwezigheid van een ATM pathogene variant en een verhoogd risico op ovariumcarcinoom is dit gen niet als core gen opgenomen in de concepttekst van de erfelijke ovariumcarcinoomrichtlijn, die voor commentaar aan de betrokken beroepsgroepen wordt aangeboden. Dit is de reden dat ATM niet als core gen is opgenomen in de leidraad.