



CAT
Critically Appraised Topic

**Waarde van MYD88 L265P mutatie onderzoek bij Waldenström
Macroglobulinemie**

Author: Stefanie Desmet
Supervisor: Dr. Elisabeth Moreau
Search/methodology verified by: Dr. Elisabeth Moreau
Date: 15-05-2014

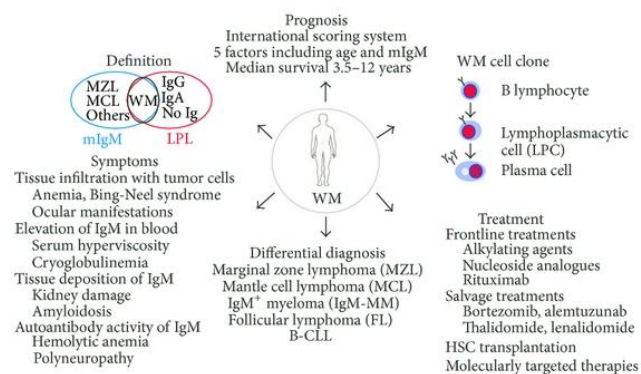
CLINICAL BOTTOM LINE

Waldenström macroglobulinemie (WM) is een zeldzaam B-cel non-Hodgkin lymfoom. Deze aandoening wordt gekenmerkt door beenmerginvasie van clonale kleine B-lymfocyten, plasmacytoïde lymfocyten en plasmacellen en de aanwezigheid van een monokonaal IgM proteïne in het serum. Echter noch de aanwezigheid van een serum IgM paraproteïne noch beenmerginvasie door lymfoplasmocytair cellen zijn exclusief voor WM, wat de differentiatie met andere B-cel non-Hodgkin lymfomen soms bemoeilijkt. In 2012 werd aan de hand van whole-genome sequencing een frequent voorkomende puntmutatie ontdekt bij patiënten met Waldenström macroglobulinemie en IgM monoclonale gammopathie van onbekende oorsprong (MGUS), namelijk de MYD88 (myeloid differentiation factor) L265P mutatie. Na deze ontdekking volgden de klinische studies elkaar snel op, waarbij de initiële resultaten werden bevestigd. De MYD88 L265P mutatie wordt bij de meerderheid van de patiënten met WM (90%) en IgM MGUS (51%) teruggevonden, maar wordt zelden tot nooit teruggevonden bij patiënten met marginale zone lymfoom (5-11%), chronische lymfatische leukemie (4%), hairy cel leukemie (2%), mantelcel lymfoom (0%), folliculair lymfoom (3%), IgM/IgA MGUS (0%) en multiple myeloom (0%). MYD88 L265P kan dus helpen om WM en IgM MGUS te differentiëren van overlappende B-cel aandoeningen. Daarnaast lijkt MYD88 L265P een prognostische rol te hebben bij patiënten met IgM MGUS en kan het een mogelijke rol spelen in opvolging van therapie. Aangezien de MYD88 L265P mutatie belangrijk is voor de cel overleving van WM cellen, vormt de mutatie mogelijk een nieuwe target voor therapie. Er wordt verwacht dat studies in de nabije toekomst de rol en waarde van de MYD88 mutatie in diagnose, therapie en opvolging verder zullen verduidelijken.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Waldenström macroglobulinemie is een IgM-secreterend lymfoplasmocytair lymfoom (LPL). Het is een zeldzaam B-cel non-Hodgkin lymfoom, dat ongeveer 1-2% uitmaakt van alle B-cel lymfomen. De incidentiegraad bedraagt 7,3 en 4,2 per miljoen in de respectievelijke mannelijke en vrouwelijke Europese populatie. WM is een aandoening van de oudere populatie, met een mediane leeftijd op diagnose van 63-68 jaar. Waldenström macroglobulinemie wordt gekenmerkt door infiltratie, hoofdzakelijk van het beenmerg, door clonale kleine B-lymfocyten, plasmacytoïde lymfocyten en plasmacellen die een monokonaal IgM proteïne (paraproteïne) secreteren. Deze aandoening wordt geclassificeerd onder de lymfoplasmocytair lymfomen in het World Health Organization lymphoma classification system 2008. Een meerderheid van alle LPL zijn WM, waarbij slechts minder dan 5 procent van de gevallen IgA, IgG en niet-secreterend lymfoplasmocytair lymfomen zijn. IgM monoklonale gammopathie van onbekende significantie (MGUS) wordt aanzien als het precursor stadium van WM. Patiënten met IgM MGUS hebben een verhoogde kans van ongeveer 1,5% per jaar om te evolueren tot WM of een andere lymfoproliferatieve aandoening.

Symptomen bij WM worden veroorzaakt door enerzijds infiltratie van de weefsels door de lymfoomcellen en anderzijds door het opstapelen van het paraproteïne. De patiënten presenteren zich met verzwakking en vermoeidheid meestal gerelateerd aan de anemie. Daarnaast kunnen patiënten symptomen vertonen van hyperviscositeit, cryoglobulinemie, auto-immuunfenomenen, neuropathie en opstapeling van IgM in de weefsels zoals de nieren, de huid en het gastro-intestinaal stelsel. Het clinicopathologisch beeld van WM wordt voorgesteld in Figuur 1.



Figuur 1: Synopsis van de clinicopathologische elementen en behandeling van Waldenström macroglobulinemie.

(Janz et al. 2013)

Het klinisch verloop van WM is typisch indolent met een mediane overleving van 5-10 jaar. Verhoogde leeftijd, perifere cytopenieën (voornamelijk anemie), performantie status en een hoog β 2-microglobuline worden geassocieerd met slechte prognose.

Het doel van de behandeling van WM is symptomen te onderdrukken en daarnaast het risico op orgaanschade te beperken. De ziekte genezen is tot op heden niet mogelijk, echter niet alle patiënten met WM/LPL hebben onmiddellijk behandeling nodig. Recent werden nieuwe richtlijnen door het National Comprehensive Cancer Network opgesteld, waarbij de indicatieve symptomen voor behandeling bestaan uit hyperviscositeit,

neuropathie, symptomatische adenopathie en organomegalie, amyloidose, cryoglobulinemie, koude agglutinatieve ziekte en de aanwezigheid van cytopenieën. (Figuur 2)

Echter noch de aanwezigheid van een maligne lymfoplasmocytair kloon, noch de detectie van een IgM paraproteïne in het serum zijn pathognomonisch voor WM. Het is een heterogene ziekte, niet enkel op cellulair niveau (tumorcellen variëren van kleine mature B-cellen tot lymfoplasmocytair cellen en plasmacellen), maar ook op klinisch niveau met enerzijds een indolent verloop en anderzijds mogelijks agressieve vormen. Enkele andere lymfoproliferatieve aandoeningen met aanwezigheid van een IgM paraproteïne, waaronder marginale zone lymfoom (MZL), mantelcel lymfoom (MCL), B-cel chronische lymfocytair leukemie (B-CLL) maar ook het zeldzame IgM-producerend multiple myeloom (MM), moeten vaak in de differentiaal diagnose opgenomen worden. De diagnose van WM wordt daarenboven bemoeilijkt door de afwezigheid van een gedefinieerde biomarker.

Om het onderscheid te maken tussen de verschillende IgM gerelateerde lymfoproliferatieve aandoeningen wordt er in de huidige praktijk voornamelijk gebruik gemaakt van het klinisch en histologisch beeld, flowcytometrie, immunohistochemie en het onderzoek naar moleculaire cytogenetische afwijkingen.

In 2002 werd door een consensus panel op de tweede internationale workshop rond WM een classificatie en clinicopathologische definitie van WM voorgesteld. Men kan WM verder onderverdelen in symptomatisch en asymptomatisch of smoldering WM. Aandoeningen met een monoclonaal IgM proteïne, maar zonder lymfoplasmocytair infiltratie van het beenmerg, worden geclassificeerd als IgM-gerelateerde aandoeningen of IgM MGUS, afhankelijk van de aanwezigheid van symptomen gerelateerd aan IgM. Tabel I toont de classificatie van WM, MGUS en IgM gerelateerde aandoeningen.

Tabel I: Classificatie van WM en gerelateerde aandoeningen volgens de consensus panel aanbevelingen van de tweede internationale workshop rond Waldenström macroglobulinemie.

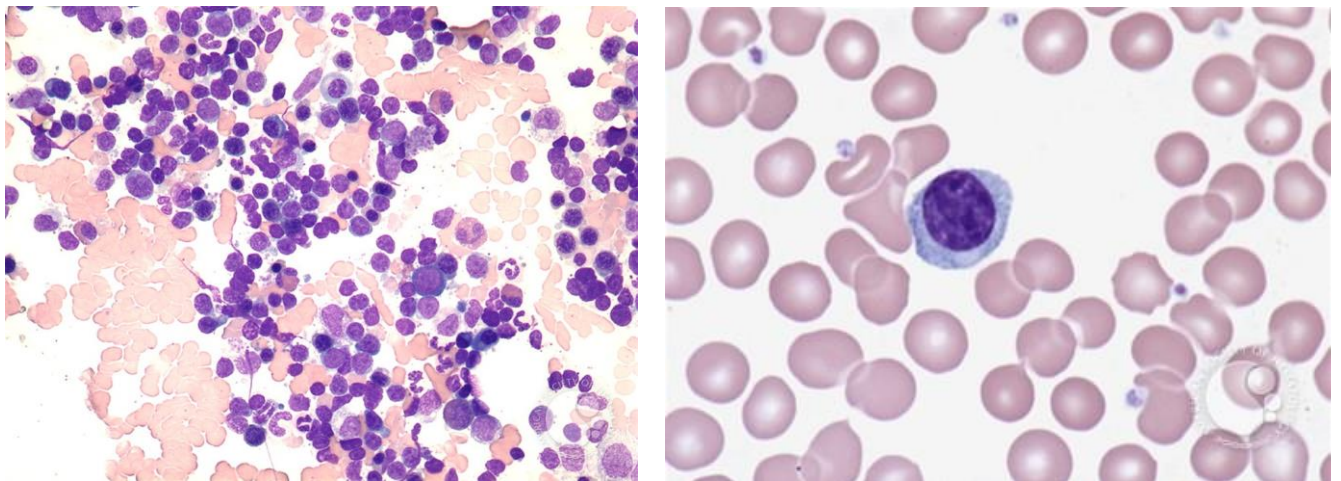
	IgM Monoclonal Protein*	Bone Marrow Infiltration†	Symptoms Attributable to IgM	Symptoms Attributable to Tumor Infiltration§
WM				
Symptomatic	+	+	+	+
Asymptomatic	+	+	—	—
IgM-related disorders‡	+	—(b)	+	—
MGUS	+	—(b)	—	—
* The panel considered it to be inappropriate to define an IgM concentration to distinguish MGUS from WM. However, it is important to note that the IgM concentration rarely if ever exceeds 3 g/dL in MGUS. † Patients with unequivocal bone marrow infiltration by lymphoplasmacytic lymphoma will be considered to have WM, while patients without evidence of infiltration will be considered to have MGUS. However, it is acknowledged that in some patients equivocal evidence of bone marrow infiltration is demonstrable. This may be manifest in a number of ways and includes the detection of clonal B-cells by flow cytometry or polymerase chain reaction in the absence of morphological evidence of bone marrow infiltration. Alternatively, patients may have equivocal bone marrow infiltrates without confirmatory phenotypic studies. It is considered that these patients should be classified as MGUS until further data become available. ‡ It is well recognized that a population of patients exist who have symptoms attributable to the IgM monoclonal protein but no overt evidence of lymphoma. Such patients may present with symptomatic cryoglobulinemia, amyloidosis, or autoimmune phenomena such as peripheral neuropathy and cold agglutinin disease. It is appropriate to consider these patients as a clinically distinct group and the term “IgM-related disorders” is proposed. § Symptoms attributable to tumor infiltration will include any of the following manifestations: constitutional symptoms, cytopenia(s), or organomegaly.				

Het consensuspanel deed ook een voorstel tot diagnostische criteria voor WM wat deels werd overgenomen door de WHO classificatie (Tabel 2). Ten eerste moet een IgM paraproteïne aantoonbaar zijn in het serum, waarbij de concentratie van het paraproteïne niet van belang is. Uit onderzoek is namelijk gebleken dat de concentratie van het paraproteïne geen waarde heeft in de differentiatie tussen WM en IgM MGUS. Patiënten met IgM MGUS of andere lymfoproliferatieve aandoeningen hebben zelden een IgM paraproteïne >3g/d, maar ook de meerderheid van de WM patiënten hebben een paraproteïne concentratie <3 g/dL, waardoor het niet mogelijk is om een discriminerende IgM concentratie vast te leggen.

Tabel 2: Diagnostische criteria voor WM volgens de consensus panel aanbevelingen van de tweede internationale workshop rond Waldenström macroglobulinemie 2003.

• IgM monoclonal gammopathy of any concentration • Bone marrow infiltration by small lymphocytes showing plasmacytoid/plasma cell differentiation • Intertrabecular pattern of bone marrow infiltration • Surface IgM⁺, CD5[±], CD10⁻, CD19⁺, CD20⁺, CD22⁺, CD23⁻, CD25⁺, CD27⁺, FMC7⁺, CD103⁻, CD138⁻ immunophenotype*
* Variations from this immunophenotypic profile can occur. However, care should be taken to satisfactorily exclude other lymphoproliferative disorders. This is most relevant in CD5⁺ cases, for which chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma require specific exclusion before a diagnosis of WM can be made.

Ten tweede staat het beenmergonderzoek (beenmergbotbiopt en -aspiraats) centraal in de diagnose van WM. In het beenmerg wordt een infiltratie teruggevonden van kleine lymfocyten samen met een variabel aantal plasmacellen en plasmacytaire lymfocyten. (Figuur 2) De beenmerginfiltratie vertoont een intertrabeculair patroon, waarnaast ook nodulaire, diffuse en interstitiële infiltratie beschreven wordt.



Figuur 2: A. Beenmergaspiraat van patiënten met Waldenström Macroglobulinemie, B. lymfoplasmocytair lymfocyt. (<http://imagebank.hematology.org/AssetDetail.aspx?AssetID=1178&AssetType=Asset> ASH image databank)

De morfologische beenmerginfiltratie door een lymfoplasmocytair lymfoom zou volgens het consensus panel altijd geconfirmeerd moeten worden door immuunfenotypering (immunohistochemie en/of flowcytometrie). De lymfoomcellen brengen typisch CD19, CD20, CD22, FMC7, CD27, CD25 en CD79a tot expressie en zijn meestal CD5-, CD10-, CD103-, CD138- en CD23-. Echter in 10-20% van de WM gevallen kan wel expressie van CD5, CD10 en CD23 worden teruggevonden. De aanwezigheid van één van deze laatste markers kan bijgevolg de diagnose van WM niet uitsluiten. WM plasmacellen zijn clonaal met een fenotype dat gelijkaardig is

aan het fenotype van normale beenmerg plasmacellen en duidelijk verschillend van multiple myeloom plasmacellen (bijvoorbeeld geen op-regulatie van CD56 of afwezigheid van CD27). (Paiva et al. 2014)

Sinds de initiële beschrijving van WM door Jan Waldenström in 1944 is de genetische basis voor de ziekte nog steeds niet volledig opgehelderd. Initieel cytogenetisch onderzoek werd bemoeilijkt door de lage proliferatiegraad van WM cellen, waardoor moeilijk metafasen konden worden bereikt. Recent echter ontdekten Treon en collega's, aan de hand van whole genome sequencing, een veel voorkomende somatische puntmutatie in het MYD88 gen bij WM patiënten, namelijk (T->C) op positie 38182641 in chromosoom 3p33.2 wat resulteert in een vervanging van leucine door proline op de aminozuurpositie 265 (L265P) van het MYD88. (Treon et al. 2013) De MYD88 L265P mutatie wordt naar voor geschoven als mogelijke diagnostische merker om WM te differentiëren van andere gerelateerde lymfoproliferatieve aandoening. Daarenboven zijn de eerste artikels verschenen die een prognostische waarde aan deze mutatie toebedelen.

Het doel van deze CAT is de waarde van MYD88 L265P mutatieonderzoek bij de diagnose van Waldenström macroglobulinemie te onderzoeken. De diagnose van WM wordt momenteel bemoeilijkt door de afwezigheid van een specifieke merker, waardoor het in de praktijk soms moeilijk is om WM te onderscheiden van andere B-cel aandoeningen met een monoklonaal IgM paraproteïne zoals (splenisch) MZL, CLL, MCL en het zeldzame IgM MM. Daarnaast zal nagegaan worden welke methode zich het best zou kunnen lenen om het onderzoek uit te voeren in een routine moleculair laboratorium en hoe men dit zal aanpakken in het ziekenhuis AZ Delta te Roeselare.

QUESTION(S)

1. Wat is de waarde van MYD88 L265P mutatieanalyse bij Waldenström macroglobulinemie?
 - 1.1 Diagnostisch
 - 1.2 Prognostisch
 - 1.3 Opvolging therapie

2. Welke methode leent zich momenteel het best om MYD88 L265P mutatieanalyse uit te voeren?
 - 2.1 Staal
 - 2.2 Staalvoorbereiding
 - 2.3 Analysetechniek

3. Moet MYD88 L265P mutatie analyse aangeboden worden in het AZ Delta Roeselare ziekenhuis?
 - 3.1 Wat zijn de indicaties voor MYD88 mutatie onderzoek?
 - 3.1.1 Heden
 - 3.1.2 Perspectief voor de toekomst
 - 3.2 Bij hoeveel patiënten zou MYD88 mutatieonderzoek een meerwaarde zijn in het AZ Delta ziekenhuis?
 - 3.3 Wat is de kostprijs van MYD88 mutatieonderzoek?
 - 3.4 Wat zijn de terugbetalingscriteria voor MYD88 mutatieonderzoek?
 - 3.5 Besluit

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: “Waldenstrom macroglobulinemia” “MYD88 protein; human”; “diagnosis”; “Myeloid differentiation Factor 88”

- 2) Pubmed (Medline; from 1966): "Waldenstrom macroglobulinemia" AND "MYD88 protein"; "Waldenstrom macroglobulinemia" AND "MYD 88"; "myd88 l265p"

- 3) SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>), National Guideline Clearinghouse (<http://www.ngc.org/>), Institute for Clinical Systems Improvement (<http://www.icsi.org>), The National Institute for Clinical Excellence (<http://www.nice.org.uk/>), Cochrane (<http://www.update-software.com/cochrane>), Health Technology Assessment Database (<http://www.york.ac.uk/inst/crd/htahp.htm>)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1) Guidelines and Recommendations

Anderson KC, Alsina M, Bensinger et al. National Comprehensive Cancer Network guideline: Waldenström's macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphoma version 2.2013. *JNCCN* 2012;10:1211-1218.

Owen RG, Treon SP, Al-Katib AA et al. Clinicopathological definition of Waldenström's Macroglobulinemia: Consensus Panel Recommendations from the second international workshop on Waldenström's macroglobulinemia. *Seminars in Oncology* 2003;30:110-115.

Ansell SM, Kyle RA, Reeder CB et al. Diagnosis and management of Waldenström macroglobulinemia: Mayo stratification of macroglobulinemia and risk-adapted therapy (mSMART) guidelines. *Mayo Clin Proc.* 2010 Sep;85(9):824-33.

Owen RG, Kyle RA, Stone MJ et al; VIth International Workshop on Waldenström macroglobulinaemia. Response assessment in Waldenström macroglobulinaemia: update from the VIth International Workshop. *Br J Haematol.* 2013 Jan;160(2):171-6.

Dimopoulos MA, Gertz MA, Kastritis E et al. Update on treatment recommendations from the Fourth International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *J Clin Oncol.* 2009 Jan 1;27(1):120-6.

2) Reviews

Janz S. Waldenström Macroglobulinemia: clinical and immunological aspects, natural history, cell of origin, and emerging mouse models. *ISRN* 2013; Article ID 815325.

Buske C, Leblond V. How to manage Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia.* 2013 Apr;27(4):762-72. doi: 10.1038/leu.2013.36. Epub 2013 Feb 6. Review.

Landgren O, Tager N. MYD88 and beyond: novel opportunities for diagnosis, prognosis and treatment in Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia.* 2014 Feb 27. doi: 10.1038/leu.2014.88. [Epub ahead of print]

Bianchi G, Sacco A, Kumar S et al. Candidate genes of Waldenström's macroglobulinemia: current evidence and research. *Appl Clin Genet.* 2013 Jul 17;6:33-42.

van den Brand M, van Krieken JH. Recognizing nodal marginal zone lymphoma: recent advances and pitfalls. A systematic review. *Haematologica.* 2013 Jul;98(7):1003-13

Zinzani PL. The many faces of marginal zone lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012;2012:426-32.

Lin P, Medeiros LJ. Lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia: an evolving concept. *Adv Anat Pathol.* 2005 Sep;12(5):246-55.

3) Original Articles

Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med.* 2012 Aug 30;367(9):826-33.

Poulain S, Roumier C, Decambron A et al. MYD88 L265P mutation in Waldenström macroglobulinemia. *Blood.* 2013 May 30;121(22):4504-11.

Jiménez C, Sebastián E, Chillón MC et al. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia.* 2013 Aug;27(8):1722-8.

Gachard N, Parrens M, Soubeyran I et al. IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenström macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia.* 2013 Jan;27(1):183-9.

Varettoni M, Arcaini L, Zibellini S et al. Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms. *Blood*. 2013 Mar 28;121(13):2522-8.

Xu L, Hunter ZR, Yang G et al. MYD88 L265P in Waldenström macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood*. 2013 Mar 14;121(11):2051-8.

Willenbacher W, Willenbacher E, Brunner A, Manzl C. Improved accuracy of discrimination between IgM multiple myeloma and Waldenström macroglobulinaemia by testing for MYD88 L265P mutations. *Br J Haematol*. 2013 Jun;161(6):902-4.

Ondrejka SL, Lin JJ, Warden DW, Durkin L, Cook JR, Hsi ED. MYD88 L265P somatic mutation: its usefulness in the differential diagnosis of bone marrow involvement by B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol*. 2013 Sep;140(3):387-94.

Varettoni M, Zibellini S, Arcaini L et al. MYD88 (L265P) mutation is an independent risk factor for progression in patients with IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2013 Sep 26;122(13):2284-5.

Xu L, Hunter ZR, Yang G et al. Detection of MYD88 L265P in peripheral blood of patients with Waldenström's Macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia*. 2014 Feb 10. [Epub ahead of print]

Mori N, Ohwashi M, Yoshinaga K et al. L265P mutation of the MYD88 gene is frequent in Waldenström's macroglobulinemia and its absence in myeloma. *PLoS One*. 2013 Nov 5;8(11):e80088.

Landgren O, Staudt L. MYD88 L265P somatic mutation in IgM MGUS. *N Engl J Med*. 2012 Dec 6;367(23):2255-6

Hunter ZR, Xu L, Yang G et al. The genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood*. 2014 Mar 13;123(11):1637-46.

Yang G, Zhou Y, Liu X et al. A mutation in MYD88 (L265P) supports the survival of lymphoplasmacytic cells by activation of Bruton tyrosine kinase in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2013 Aug 15;122(7):1222-32.

Ansell SM, Hodge LS, Secreto FJ et al. Activation of TAK1 by MYD88 L265P drives malignant B-cell Growth in non-Hodgkin lymphoma. *Blood Cancer J*. 2014 Feb 14;4:e183.

Fonseca R, Braggio E. The MYDAs touch of next-gen sequencing. *Blood*. 2013 Mar 28;121(13):2373-4.

Treon SP, Hunter ZR. A new era for Waldenström macroglobulinemia: MYD88 L265P. *Blood*. 2013 May 30;121(22):4434-6.

Ngo VN, Young RM, Schmitz R et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011 Feb 3;470(7332):115-9.

Braggio E, Fonseca R. Genomic abnormalities of Waldenström macroglobulinemia and related low-grade B-cell lymphomas. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013 Apr;13(2):198-201.

Wang CZ, Lin J, Qian J et al. Development of high-resolution melting analysis for the detection of the MYD88 L265P mutation. *Clin Biochem*. 2013 Mar;46(4-5):385-7

Treon SP, Patterson CJ, Munshi NC, Anderson KC. Proceedings of the Seventh International Workshop on Waldenström Macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013 Apr;13(2):181-3.

Campo E, Swerdlow SH, Harris NL et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 2011;117:5019-5032.

Schmitz R, Young RM, Ceribelli et al. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature*. 2012;490(7418):116-20.

Montesinos-Rongen M, Godlewska E, Brunn A et al. Activating L265P mutations of the MYD88 gene are common in primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol.* 2011;122(6):791-2

Pham-Ledard A, Cappellen D, Martinez F et al. MYD88 somatic mutation is a genetic feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *J Invest Dermatol.* 2012 Aug;132(8):2118-20

Wang L, Lawrence MS, Wan Y et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2011 Dec 29;365(26):2497-506. doi: 10.1056/NEJMoa1109016. Epub 2011 Dec 12.

Arcaïni L, Varettoni M, Boveri E et al. Distinctive clinical and histological features of Waldenström's macroglobulinemia and splenic marginal zone lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2011 Feb;11(1):103-5.

Berger F, Traverse-Glehen A, Felman P et al. Clinicopathologic features of Waldenstrom's macroglobulinemia and marginal zone lymphoma: are they distinct or the same entity? *Clin Lymphoma.* 2005 Mar;5(4):220-4.

Paiva B, Montes MC, García-Sanz R et al. Multiparameter flow cytometry for the identification of the Waldenström's clone in IgM-MGUS and Waldenström's Macroglobulinemia: new criteria for differential diagnosis and risk stratification. *Leukemia.* 2014 Jan;28(1):166-73.

Hendriks RW, Yuvaraj S, Kil LP. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat Rev Cancer.* 2014 Apr;14(4):219-32.

Ghobrial IMI, Fonseca R, Gertz MA et al. Prognostic model for disease-specific and overall mortality in newly diagnosed symptomatic patients with Waldenstrom macroglobulinaemia. *Br J Haematol.* 2006 Apr;133(2):158-64.

4) Reference Works, Handbooks and Databases

WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. WHO Press 2008, p. 54-63

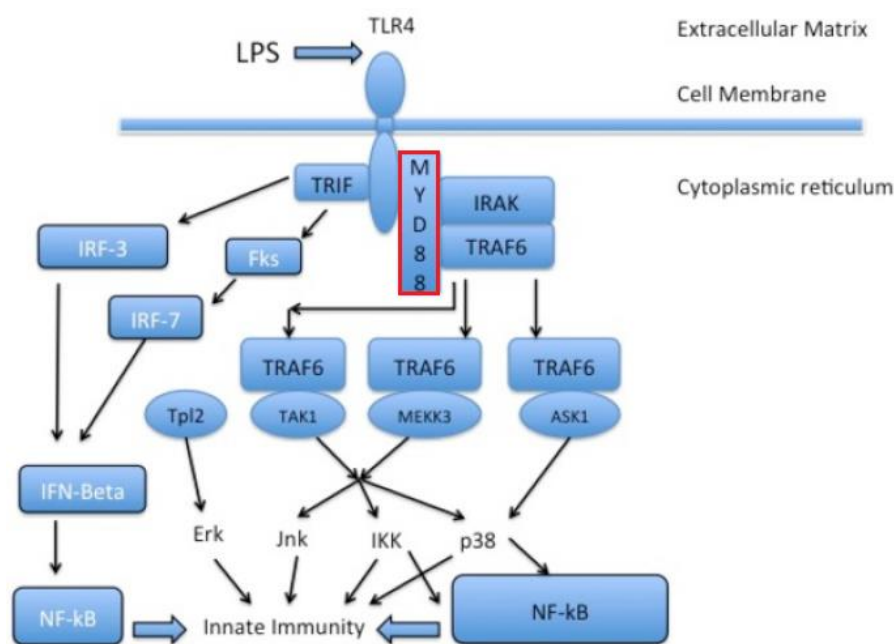
APPRAISAL

I. Wat is de waarde van MYD88 L265P mutatieanalyse bij Waldenström macroglobulinemie?

I.1 Diagnostisch

I.1.1 Inleiding en pre-klinisch onderzoek

MYD88 werd het eerst geïdentificeerd als myeloid differentiatie primair respons gen 88 in 1990. Het opvolgend werk door Muzio et al. en Wesche et al. identificeerde MYD88 als een proximale adaptor van de interleukin (IL)-1R signaal pathway waarbij MYD88 het signaal doorgeeft aan nucleair factor κ B (NF- κ B) transcriptie factor in antwoord op de IL-1R signaaloverdracht. Studies toonden aan dat MYD88 een cruciale adaptor is voor signaal transmissie binnen de IL-1/IL-18/Toll-like receptor (TLR) superfamilie. Na oligomerisatie van de IL-1R of TLR wordt MYD88 gerekruteerd naar het activated receptor complex (ARC) als homodimeer dat complexeert met IL-1R-geassocieerd kinase (IRAK) 4 om IRAK1 en IRAK2 te activeren. Dit activeert tumor necrosis factor receptor geassocieerde factor 6 (TRAF6) wat leidt tot NF- κ B activatie via I κ B-alpha fosforylatie. (Figuur 3)



Figuur 3: Stimulatie van Toll-like receptor 4 (TLR4) zorgt voor de activatie van twee pathways: de MYD88-dependente en de MYD88-independente pathway. De MYD88-dependente pathway is betrokken bij de vroege fase van nucleair factor- κ B (NF- κ B) activatie, wat leidt tot productie van inflammatoire cytokines. De MYD88-independente pathway activeert interferon (IFN)- γ regulatory factor (IRF3) en is betrokken in de late fase van NF- κ B activatie, welke beide leiden tot productie van IFN en de expressie van IFN-induceerbare genen. (Landgren et al. 2014)

Ngo et al. ontdekten voor het eerst MYD88 mutaties in biopsie stalen van lymfomen. Sequentieanalyses toonden als veruit de meest voorkomende mutatie, de substitutie van (T->C) op positie 3818541 in chromosoom 3p22.2 aan, wat aanleiding geeft tot een aminozuur substitutie van leucine naar proline in het MYD88. De mutatie werd teruggevonden bij 29% van de geactiveerd B-cel-like (ABC) diffuus grootcellig B-cel lymfomen (DLBCL), 1.7% van de Burkitt lymfomen, 1.4% van de germinal center B DLBCL en 9% van de maag mucosa-geassocieerde lymfoom (MALT) biopsies. Net zoals bij ABC-DLBCL konden Yang et al. aantonen dat in WM de cel overleving verhoogd wordt door MYD88 L265P over-expressie. De over-expressie van MYD88 L265P bevordert de overleving van cellen ten opzichte van WT MYD88 cellen, wat overeenkomt met de gain-of-function mutatie zoals gerapporteerd door Ngo et al. in ABC DLBCL cellen. De studies van Ngo et al. en Yang et al. toonden ook aan dat IRAK en BTK onafhankelijk zorgen voor downstream NF- κ B activatie en dat gecombineerd gebruik van IRAK- en BTK- inhibitoren zorgt voor een synergistische tumor cel doding in MYD88 L265P WM cellen.

In een recente studie kon men bij 4.8% van de Burkitt lymfoom biopsie stalen via RNA sequencing en interferentie screening MYD88 gen mutaties terugvinden (locatie(s) werden niet gespecificeerd). Ook andere grootcellige B-cel lymfomen dragen de MYD88 L265P mutatie waaronder primair centraal nerveus systeem lymfoma (36%) en primair cutaan DLBCL van het leg-type (69%).

1.1.2 Klinisch onderzoek

Treon et al. vertaalden voorgaand preklinisch werk in de klinische praktijk. Aan de hand van whole genome sequencing, geconfirmeerd met Sanger sequencing, toonden Treon et al. bij 49 van de 54 (91%) patiënten met WM de MYD88 L265P mutatie aan. Deze mutatie kwam het meest voor, naast een mediaan van 3419 somatische varianten. In tabel 3 wordt een overzicht geven van de daaropvolgende studies (tem 1 april 2014) waarbij MYD88 L265P mutatie in WM en gerelateerde aandoeningen werd onderzocht.

Afhankelijk van de gebruikte analyse techniek en de studiepopulatie wordt de MYD88 L265P mutatie in 67-100% van de patiënten met WM aangetoond. Daartegenover komt deze mutatie zelden of niet voor bij andere IgM-gerelateerde aandoeningen zoals splenisch marginale zone lymfoom (16/233; 0-21%), nodaal marginale zone lymfoom (2/37; 0-20%); chronische lymfoïde leukemie (7/174; 0-7%), mantelcel lymfoom (0/17; 0%), hairy cel leukemie (1/48; 0-8%) en multiple myeloom (0/103; 0%). Daarenboven moet opgemerkt worden dat niet kan worden uitgesloten dat een aantal van deze MYD88 L265P positieve lymfoproliferatieve aandoeningen toch WM of LPL zijn, gezien de moeilijke differentiatie tussen onder andere MZL en LPL.

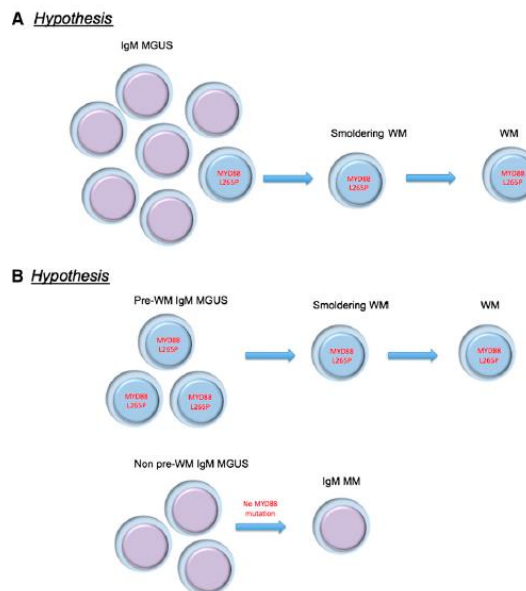
Tabel 3: Frequentie van voorkomen van de MYD88 L265P mutatie bij Waldenström macroglobulinemie en gerelateerde B-cel aandoeningen (literatuuronderzoek tot 1 mei 2014). * alleen studies uitgevoerd op beenmergstalen; RT (real-time); PCR (polymerase chain reaction); BM (beenmerg); PB (perifeer bloed).

Author	Method	Sample	WM	non-IgM LPL	IgM MGUS
Treon et al. 2012	Sanger sequencing	CD19+ cells BM	49/54 (91%)	3/3 (100%)	2/21 (10%)
Poulain et al. 2013	Sanger sequencing	CD19+ cells BM	53/67 (79%)	-	1/2 (50%)
Jiménez et al. 2013	RT AS-PCR	BM	101/117 (86%)	0/9 (0%)	27/31 (87%)
Gachard et al. 2013	Sanger sequencing	BM	18/27 (67%)	-	-
Varettoni et al. 2013	AS-PCR	BM	58/58 (100%)	-	36/77 (47%)
Xu et al. 2013	AS-PCR + RT AS-PCR	CD19+ cells BM	97/104 (93%)	-	13/24 (54%)
Willenbacher et al. 2013	Sanger sequencing	BM	6/7 (86%)	-	-
Odrejka et al. 2013	AS-PCR	BM	13/13 (100%)	-	-
Varettoni et al. 2014	AS-PCR	BM	8/9 (89%)	-	71/136 (52%)
Xu et al. 2014	(RT) AS-PCR	PB CD19+ cells	291/337 (86%)	1/1 (100%)	6/12 (50%)
	(RT) AS-PCR	BM CD19+ cells	177/188 (94%)	-	6/12 (50%)
La-gren et al. 2012	Sanger sequencing	BM	-	-	5/9 (56%)
Mori et al. 2013	AS-PCR	BM	18/25 (72%)	-	-
Ansell et al. 2014	RT-AS-PCR	BM (NS)	34/35 (97%)	0/5 (0%)	-
TOTAL MYD88 L265P positive/total number of patients *			923/1041 (90%)	4/18 (22%)	161/312 (52%)
TOTAL % MYD88 L265P positive *			67-100%	0-100%	10-87%

Vervolg Tabel 3: Frequentie van voorkomen van de MYD88 L265P mutatie bij Waldenström macroglobulinemie en gerelateerde B-cel aandoeningen (literatuuronderzoek tot 1 mei 2014).

Author	Method	Sample	WM	sMZL	nMZL	MZL NS	MALT	MM	CLL	healthy donors	HCL	MCL	FL
Treon et al. 2012	Sanger sequencing	CD19+ cells BM	49/54 (91%)	1/21 (5%)	1/5 (20%)	-	-	0/10 (0%)	-	0/15 (0%)	-	-	-
Poulain et al. 2013	Sanger sequencing	CD19+ cells BM	53/67 (79%)	-	-	1/16 (6%)	-	0/5 (0%)	0/9 (0%)	-	-	0/10 (0%)	1/23 (4%)
Jiménez et al. 2013	RT AS-PCR	BM	101/117 (86%)	3/14 (21%)	-	-	-	0/24 (0%)	0/39 (0%)	0/38 (0%)	0/35 (0%)	-	-
Gachard et al. 2013	Sanger sequencing	BM	18/27 (67%)	2/53 (4%)	0/11 (0%)	-	2/28 (7%)	-	-	-	-	-	-
Varettoni et al. 2013	AS-PCR	BM	58/58 (100%)	5/84 (6%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xu et al. 2013	AS-PCR + RT AS-PCR	CD19+ cells BM	97/104 (93%)	2/20 (10%)	-	-	-	0/14 (0%)	1/26 (4%)	0/40 (0%)	-	-	-
Willenbacher et al. 2013	Sanger sequencing	BM	6/7 (86%)	-	-	-	-	0/4 (0%)	-	-	-	-	-
Odrejka et al. 2013	AS-PCR	BM	13/13 (100%)	0/6 (0%)	-	-	-	0/8 (0%)	0/9 (0%)	-	1/13 (8%)	0/7 (0%)	0/6 (0%)
Varettoni et al. 2013	AS-PCR	BM	8/9 (89%)	-	-	1/2 (50%)	-	-	-	-	-	-	-
Xu et al. 2014	(RT) AS-PCR	PB CD19+ cells	291/337 (86%)	-	-	-	-	-	-	0/40 (0%)	-	-	-
	(RT) AS-PCR	BM CD19+ cells	177/188 (94%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La-gren et al. 2012	Sanger sequencing	BM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mori et al. 2013	AS-PCR	BM	18/25 (72%)	-	-	-	-	0/38 (0%)	-	-	-	-	-
Ansell et al. 2014	RT-AS-PCR	BM (NS)	34/35 (97%)	3/35 (8%)	1/21 (5%)	-	1/23 (4%)	-	-	0/5 (0%)	-	-	-
Wang et al. 2011	Whole-genome sequencing	BM CD19+ cells	-	-	-	-	-	-	6/91 (7%)	-	-	-	-
TOTAL MYD88 L265P positive/total number of patients *			923/1041 (90%)	16/233 (7%)	2/37 (5%)	2/18 (11%)	3/51 (6%)	0/103 (0%)	7/174 (4%)	0/138 (0%)	1/48 (2%)	0/17 (0%)	1/29 (3%)
TOTAL % MYD88 L265P positive *			67-100%	0-21%	0-20%	6-50%	4-7%	0%	0-7%	0%	0-8%	0%	0-4%

Belangrijk is dat de MYD88 L265P mutatie geen duidelijk onderscheid kan maken tussen IgM MGUS en WM. Bij de initiële studies gebaseerd op sequencing werd de mutatie bij slechts 10-56% van de IgM MGUS patiënten aangetoond. Gevoeligere technieken zoals allel-specifieke PCR verhoogden echter het percentage van IgM MGUS patiënten met MYD88 L265P mutatie (47-87 %). Deze bevindingen zijn belangrijk in het begrijpen van de evolutie van IgM MGUS naar WM of andere lymfomen. Twee hypothesen werden beschreven door Fonseca et al. De ene hypothese gaat ervan uit dat de mutatie kritisch en essentieel is voor de ziekteontwikkeling, de andere hypothese gaat ervan uit dat er verschillende biologische subtypes zijn van IgM MGUS (Figuur 4).



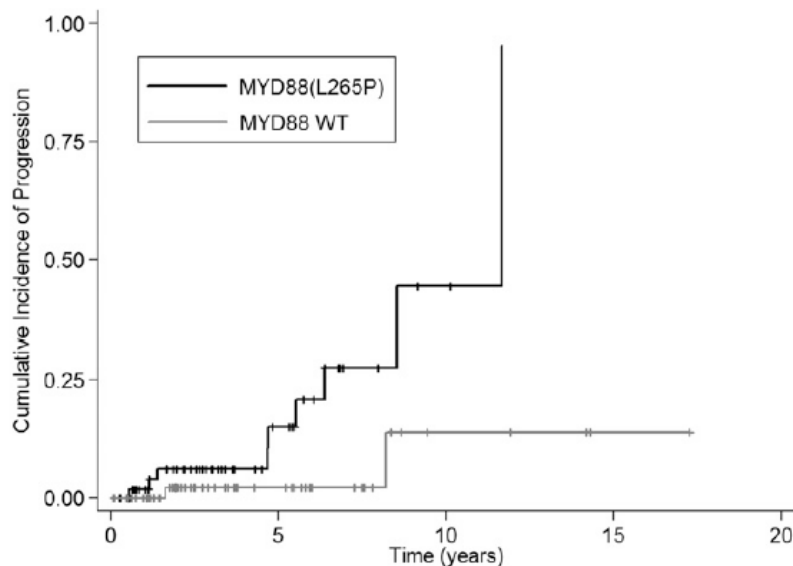
Figuur 4 : Hypothesen voor de MYD88 L265P mutatie in IgM MGUS en WM pathogenese. (A) MYD88 L265P mutatie is een essentiële component in de kritische en universele stap van IgM-MGUS tot WM. (B) Er zijn verschillende biologische subtypes van IgM MGUS, waarbij MYD88 L265P mutatie wordt gevonden in het subtype dat ontwikkelt tot WM. (Fonseca et al. 2013)

1.2 Prognostisch

1.2.1 IgM MGUS

De groep van Varettoni et al. deed reeds het meeste onderzoek betreffende de prognostische waarde van de MYD88 mutatie bij IgM MGUS patiënten. Men toonde in een initiële retrospectieve case-control studie aan dat IgM MGUS patiënten (n=77) met MYD88 mutatie een significant hoger risico hadden om te evolueren tot WM of een andere lymfoproliferatieve aandoening ten opzichte van patiënten zonder MYD88 mutatie. Negen patiënten evolueerden naar WM (n=7) of naar MZL (n=2). Zes van de zeven patiënten die evolueerden naar WM hadden de MYD88 L265P mutatie en één patiënt had geen MYD88 mutatie noch bij diagnose van MGUS, noch bij diagnose van progressie. Van de twee patiënten die evolueerden tot MZL, had één patiënt de MYD88 L265P mutatie. Later in 2013 publiceerden Varettoni et al. een studie om de prognostische rol, in de eerder beschreven studie, te confirmeren. Er werden 136 IgM MGUS patiënten geïncludeerd met een mediane opvolging van 34 maanden. Gedurende de follow-up evolueerden 11 patiënten (8%) tot WM (n=9) of MZL (n=2). Acht van de negen patiënten die tot WM evolueerden en 1 van de 2 patiënten die tot MZL evolueerden droegen de MYD88 L265P mutatie. De andere twee patiënten droegen het wild-type MYD88 zowel op diagnose als op het moment

van progressie. De 5- en 10-jaars cumulatieve incidentie tot progressie was respectievelijk 15% en 45% bij patiënten met MYD88 mutatie in vergelijking met 2% en 14% bij patiënten met MYD88 wild-type ($P=0.027$) (Figuur 5). In multivariaat analyse waren MYD88 mutatie en de concentratie van serum paraproteïne independente prognostische factoren voor progressie. Men concludeerde dat de aanwezigheid van zowel de MYD88 mutatie en een serum M-proteïne $>1.5\text{g/dl}$ op diagnose patiënten identificeert met een hoog risico op progressie tot WM of andere lymfoproliferatieve aandoening.



Figuur 5: Cumulatieve probabiteit tot progressie naar WM of andere lymfoproliferatieve aandoeningen in patiënten met IgM MGUS afhankelijk van hun MYD88 mutatie status. WT (wild-type) (Varettoni et al. 2013)

1.2.2 Waldenström macroglobulinemie

In een studie van Jiménez et al. werd aan de hand van retrospectieve data nagegaan of er een verschil is in evolutie van ziekte bij WM patiënten met wild-type MYD88 en MYD88 L265P. Men toonde heel kleine verschillen aan waarbij de wild-type MYD88 patiënten een kleiner M-proteïne (1.77 vs 2.72 g/dl, $p=0.022$), meer lymfocytose (24 vs 5%, $p=0.006$), hogere lactaat dehydrogenase spiegel (371 vs 265 UI/L, $p=0.002$), atypisch immunofenotype (CD23-CD27++ FMC7++), minder immunoglobuline zware keten variabele gen (IGHV) somatische hypermutatie (57% vs 97%, $p=0.012$) en minder IGHV3-23 gen selectie (9 vs 27%, $p=0.014$) vertonen ten opzichte van de MYD88 gemuteerde patiënten. Echter op het vlak van tijd tot eerste therapie, antwoord op behandeling, progressie-vrije overleving en totale overleving werd geen verschil gezien.

1.3 Opvolging therapie

Het gebruik van MYD88 voor het opvolgen van therapie werd tot op heden slechts in één studie onderzocht. Xu et al. beschreven bij 7 patiënten die chemotherapie kregen ter behandeling van hun WM, een sterke correlatie tussen beenmerginvasie in histologisch onderzoek en de concentratie mutant MYD88 L265P, bepaald door kwantitatieve real-time AS PCR ($r=0.89$, $p=0.008$). In één patiënt werd een complete respons bekomen (normalisatie van IgM, geen IgM monoklonaal proteïne op serum proteïne elektroforese/ immuunfixatie en ondetecteerbare beenmerg invasie) met daarbij ook een ondetecteerbaar MYD88 L265P. Deze bevindingen

suggereren een mogelijke rol van kwantitatief MYD88 L265P opvolging als indicator voor therapierespons en ziektecontrole.

2. Welke methode leent zich momenteel het best om MYD88 L265P mutatieanalyse uit te voeren?

2.1. Staal

Alle studies gebruiken beenmergcellen om de MYD88 L265P mutatie op te sporen. Recent verscheen echter het eerste artikel waarbij MYD88 L265P mutatieonderzoek werd uitgevoerd op mononucleaire cellen uit het perifere bloed.

Xu et al. voerden een studie uit waarbij men de aanwezigheid van de MYD88 mutatie opspoorde bij patiënten met WM, IgM MGUS en non-IgM LPL. Het mutatieonderzoek werd parallel bij de meerderheid van de patiënten op beenmerg en perifeer bloed uitgevoerd (Tabel 4). De MYD88 mutatie kon aangetoond worden in 86% en 94% van de WM patiënten in respectievelijk het perifere bloed en het beenmerg. Bij de patiënten met IgM MGUS kon de mutatie bij 50% van de patiënten in het beenmerg, en bij 42% van de patiënten in het perifere bloed worden aangetoond. De lagere sensitiviteit in het perifere bloed zorgt ervoor dat voor het stellen van de diagnose, bij een negatief resultaat op perifere bloed, steeds een analyse op het beenmerg noodzakelijk is ter confirmatie. De auteurs zijn daarnaast van mening dat kwantitatieve PCR voor MYD88 L265P mutatie in perifere bloed een potentiële waarde kan hebben om het onderscheid te maken tussen IgM MGUS en WM. Nieuwe studies zijn nodig om deze mogelijke rol te bevestigen.

Momenteel is er weinig evidentie om de MYD88 L265P mutatie in het perifere bloed op te sporen. WM is primair een beenmergziekte waardoor het voor de hand ligt dat het mutatieonderzoek wordt uitgevoerd op beenmerg.

Tabel 4: Samenvatting van het onderzoek van Xu et al. betreffende het opsporen van de MYD88 L265P mutatie aan de hand van real-time (RT) allel-specifieke (AS)-PCR in perifere bloed en in beenmerg bij patiënten met WM (Waldenström Macroglobulinurie), IgM MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance), non-IgM LPL (lymfoplasmocytair lymfoom) en gezonde donoren. PB (perifere bloed); BM (beenmerg)

			MYD88 mutation positive patients/ total number of patients (percentage)			
Author	Method	Sample	WM	IgM-MGUS	non-IgM LPL	healthy donors
Xu et al. 2014	(RT) AS-PCR	PB CD19+ cells	291/337 (86%)	6/12 (50%)	1/1 (100%)	0/40 (0%)
	(RT) AS-PCR	BM CD19+ cells	177/188 (94%)	5/12 (42%)	-	-

2.2 Staalvoorbereiding

MYD88 mutatieonderzoek wordt uitgevoerd op DNA geëxtraheerd uit beenmerg. Verschillende onderzoekers voeren voorafgaand aan de extractie een selectie uit op CD19+cellen. Geen enkele studie beschrijft een vergelijking tussen het al dan niet uitvoeren van deze selectie op CD19+ cellen. Aangezien het onderzoek naar

de MYD88 mutatie, wat een specifieke puntmutatie betreft, meestal heel specifiek is (bijvoorbeeld allel-specifieke PCR) en gevoelige technieken worden gebruikt (zie onderdeel 2.3), lijkt het aannemelijk dat voorselecteren van enkel CD19+ cellen niet noodzakelijk is voor de analyse van MYD88.

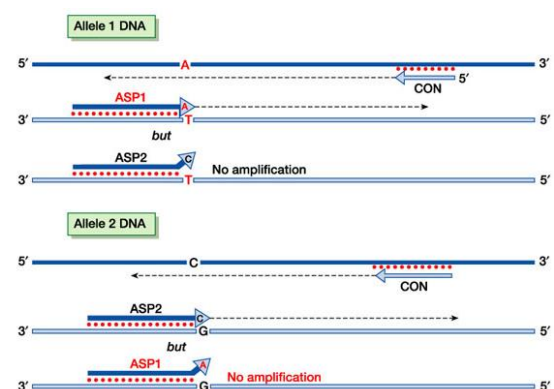
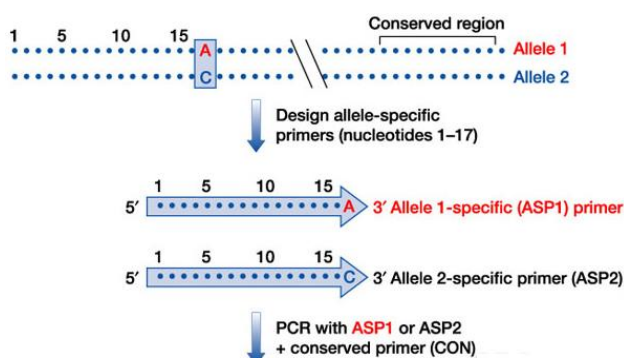
2.3 Analysetechniek

De ontdekking van de MYD88 L265P mutatie en het initiële onderzoek gebeurde aan de hand van whole genome sequencing. De studies die kort hierop volgden maakten gebruik van gen-specifieke amplificatie met directe sequencing (Tabel 5). In 2013 verschenen echter de eerste allel-specifieke (AS) polymerase chain reaction (PCR) technieken voor het detecteren van de MYD88 L265P mutatie.

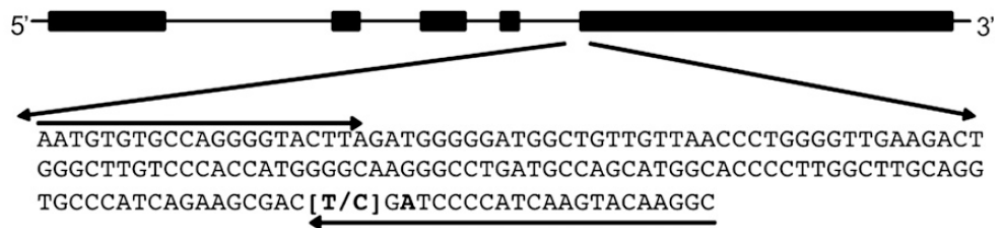
Tabel 5: Overzicht van de in de literatuur verschenen MYD88 L265P mutatie analyse technieken. ND (niet bepaald)

Detection method MYD88 L265P mutation	Sensitivity	References
Whole-genome sequencing	ND	Treon et al. 2012; Hunter et al. 2014
Sanger sequencing of MYD88 gene	ND	Treon et al. 2012; Poulain et al. 2013, Willenbacher et al. 2013, Mori et al. 2013
RFLP + Sanger sequencing	ND	Gachard et al. 2013
Allele-specific PCR		
a) conventional AS-PCR	0,10%	Varettonni et al. 2013; Ondrejka et al. 2013
b) real-time AS-PCR		
SYBR green	0,08%	Xu et al. 2013; Xu et al 2014;
probe detection	0,25%	Jiménez et al. 2013; Ansell et al. 2014
Melting-curve analysis	5%	Wang et al. 2013

Een allel-specifieke PCR is een techniek waarbij twee primers worden ontwikkeld, nl. een mutant-specifieke primer en een wild type-specifieke primer (Figuur 6). Bij het gebruik van deze primers zal pas amplificatie optreden wanneer de primer kan aanhechten aan het target DNA. Om de specificiteit te optimaliseren wordt meestal een mismatch op 3 basen van het 3' uiteinde van de primer geïntroduceerd (Figuur 7).



Figuur 6: Ontwikkeling en werkingsprincipe van een allel-specifieke PCR. A Er worden twee verschillende primers ontwikkeld, met elk één nucleotide verschil op de plaats die aanhecht aan de positie van de puntmutatie. B Verloop van de polymerase chain reaction (PCR). Er treedt slechts amplificatie op wanneer de primer kan aanhechten aan de compatibele streng.



Figuur 7: Voorbeeld van primer ontwikkeling voor allel-specifieke PCR voor het opsporen van de MYD88 L265P mutatie. De reverse primers met een interne mismatch aan het 3' uiteinde en de forward primer worden aangegeven met een pijl. (Xu et al. 2013)

3. Moet MYD88 L265P mutatie analyse aangeboden worden in het AZ Delta Roeselare ziekenhuis? Hoe zal dit praktisch in het werk gaan?

3.1. Wat zijn de indicaties voor MYD88 mutatieonderzoek?

3.1.1 Heden

a) Diagnose Waldenström macroglobulinemie

Aan de hand van MYD88 L265P kunnen patiënten met WM of IgM MGUS onderscheiden worden van patiënten met MZL, CLL, MM en HCL (Tabel 3). Bij de opstart van behandeling is het van groot belang om de correcte diagnose te stellen, aangezien de verschillende lymfoproliferatieve aandoeningen een verschillende therapeutische aanpak vergen. Zo is bijvoorbeeld de behandeling van WM, CLL, MCL en MZL verschillend. In overleg met de klinisch hematologen in AZ Delta Roeselare werd beslist dat wanneer er twijfel bestaat over de diagnose van WM, MYD88 L265P kan helpen om WM te onderscheiden van andere gerelateerde IgM-producerende B-cel aandoeningen. De casus beschreven onder Attachment 3 illustreert deze waarde.

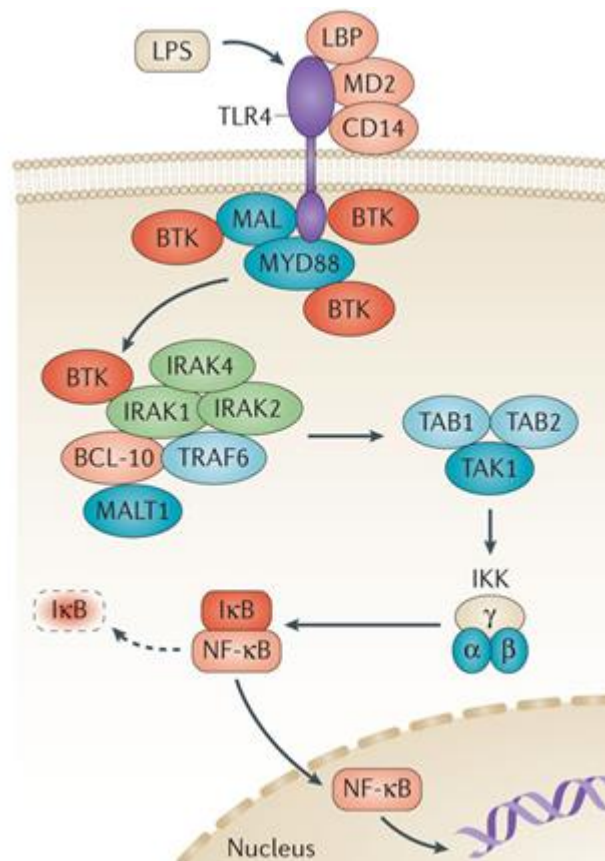
Er wordt geconcludeerd dat MYD88 L265P mutatie voornamelijk een rol kan spelen bij patiënten met moeilijk te differentiëren B-cel aandoeningen. Wanneer anatomopathologie, cytologie, moleculaire diagnostiek en flowcytometrie geen éénduidige diagnose geven, kan MYD88 L265P mutatieonderzoek een meerwaarde betekenen.

b) Prognose bij IgM MGUS

MYD88 L265P heeft naast een diagnostische rol ook een mogelijke prognostische rol bij IgM MGUS patiënten. Patiënten met de MYD88 mutatie hebben een significant hogere cumulatieve incidentie om te evolueren tot WM, dan patiënten met wild-type MYD88 (Varettoni et al. 2014). Echter deze prognostische waarde heeft maar een beperkte waarde in de klinische praktijk aangezien patiënten pas worden behandeld indien zich symptomen voordoen. Mogelijks kan dit mutatieonderzoek wel aangewezen zijn bij jonge patiënten met IgM MGUS, om al dan niet te beslissen tot striktere follow-up. Er wordt geconcludeerd dat er voorlopig maar een beperkte tot geen plaats is voor MYD88 L265P mutatieonderzoek bij IgM MGUS.

3.1.2 Perspectief voor de toekomst

Het laatste jaar werden enkele belangrijke studies gepubliceerd, welke de basis vormen voor het onderzoek naar inhibitoren van MYD88 en MYD88 downstream elementen. Ibrutinib, een BTK kinase inhibitor, heeft veelbelovende activiteit getoond bij WM in een fase I studie en een lopende fase 2 klinische studie. Men heeft daarenboven kunnen aantonen dat het gecombineerd gebruik van IRAK en BTK inhibitoren zorgt voor een verhoogde inhibitie van NF- κ B signaaloverdracht en een meer robuuste WM cel doding. (Figuur 8) Daarnaast kan het ontwikkelen van MYD88 inhibitoren zorgen voor een rechtstreekse blokkering van zowel de BTK- als de IRAK signaal pathways. In de toekomst kan het opsporen van MYD88 L265P bij patiënten met WM helpen om die patiënten te identificeren die meer baat hebben bij behandelingen die gebaseerd zijn op inhibitie van de MYD88 signaalpathway. Daarnaast kan men mogelijks in de toekomst aan de hand van (kwantitatief) MYD88 therapierespons opvolgen.



Figuur 8: Schematische voorstelling van de myeloid differentiation primary response 88 (MYD88)-dependente Toll-like receptor (TLR) signaal-pathway. TLR signalering induceert verschillende transcriptiefactoren, waaronder nuclear factor- κ B (NF- κ B), welke zorgt voor celproliferatie. BTK (bruton tyrosine kinase) helpt bij de TLR signaal overdracht door te interageren met 5 verschillende molecules: de intracellulaire domeinen van de meeste TLR, MYD88 en MYD88 adaptor-like proteïne (MAL), IL (interleukine)-IR-geassocieerd kinase I (IRAK1) en het TIR-bevattende adaptor proteïne dat interferon-beta induceert (TRIF (niet weergegeven), onderdeel van de MYD88-independente pathway). I κ B: inhibitor van κ B; LBP: lipopolysaccharide bindend proteïne. (Hendriks et al. 2014)

3.2. Bij hoeveel patiënten zou MYD88 mutatieonderzoek een meerwaarde zijn in het AZ Delta ziekenhuis Roeselare?

In 2014 zal bij de patiënten waar geen duidelijk onderscheid kan gemaakt worden tussen WM of een andere IgM-gerelateerde lymfoproliferatieve aandoeningen een MYD88 L265P onderzoek worden uitgevoerd. Van 1 januari tot 1 april ging dit over twee gevallen. Er wordt verwacht dat er gemiddeld ongeveer 10 analyses per jaar zouden kunnen worden uitgevoerd.

3.3. Wat is de kostprijs van het MYD88 mutatieonderzoek?

Voor de berekening van de kostprijs voor MYD88 mutatieonderzoek wordt rekening gehouden met het aantal stalen, reagens en materiaal kosten, werkuren voor extractie en analyse, werkuren voor interpretatie van de resultaten en kosten voor de controles. In AZ Delta wordt steeds de voorkeur gegeven aan real-time PCR technieken ten opzichte van conventionele technieken. Traditionele sequencing wordt niet gebruikt om eenvoudige mutaties, zoals de MYD88 puntmutatie, aan te tonen. Momenteel zijn er twee mogelijke technieken met vergelijkbare sensitiviteit beschreven in de literatuur die zouden kunnen worden opgestart in AZ Delta Roeselare (Tabel 5):

-real-time allel-specifieke PCR met SYBR green detectie (Xu et al. 2013/2014)

-commerciële real-time PCR (qBiomarker Somatic Mutation Assay for MYD88_85940 (SABiosciences, Qiagen Xo, Hilden, Germany) met allel-specifieke amplificatie met Amplification Refractory Mutation System (ARMS) technologie en hydrolysis probe detectie. (Jiménez et al. 2013)

Daarnaast zou ook een real-time PCR assay die gebruik maakt van mutant- of wild-type specifieke MGB (Minor Groove Binder) hydrolyse proben en een LNA (locked nucleic acid) wild-type blokkerend oligonucleotide kunnen opgestart worden (Techniek gebruikt door Dr. P. De Schouwer ZNA ziekenhuis Antwerpen en Dr. B. Maes Jessa ziekenhuis Hasselt)

In tabel 6 wordt de kostenberekening weergegeven voor het opsporen van de MYD88 L265P mutatie in beenmerg met de qBiomarker Somatic mutation assay in AZ Delta Roeselare. De weergegeven kostprijs is de prijs van de analyse indien deze enkel voor deze test wordt opgestart. De reële kostprijs zal lager liggen omdat bv. de DNA-extractie gepoold wordt samen met stalen voor andere analyses.

Tabel 6: Kostenberekening MYD88 mutatie analyse met qBiomarker Somatic Mutation Assay for MYD88 in AZ Delta Roeselare. ¹Alle reagentia en materiaal voor extractie, PCR en kwaliteitscontrole. ²Werkuren voor het inzetten van de stalen en verwerken van de resultaten door MLT en wetenschappelijk medewerker.

Aantal stalen per run	Prijs per staal (euro) ¹	Prijs rekening houdend met 10% extra "verlies" (euro)	Prijs per staal incl. 21% BTW (euro)	Totaal prijs per staal incl BTW en incl. werkuren ² (euro)
1	67,7	74,5	90,1	253,1
2	43,2	47,5	57,5	139,0
3	35,0	38,5	46,6	100,9
4	30,9	34,0	41,1	81,9
5	28,5	31,3	37,9	70,5
6	26,8	29,5	35,7	62,9
7	25,7	28,2	34,2	57,4
8	24,8	27,3	33,0	53,4

3.4. Wat zijn de terugbetalingscriteria voor MYD88 mutatieonderzoek?

Als geaccrediteerde test volgens ISO 15189 kan MYD88 mutatie onderzoek terugbetaald worden volgens artikel 33 bis 588453-588464 *Opsporen van verworven chromosoom of genafwijkingen (met uitsluiting van immuunglobuline- of een T-celreceptorgenherschikking), door middel van een moleculair biologische methode: in de diagnostische investigatiefase van een chronische lymfoïde aandoening (non-Hodgkin lymfoom, chronische lymfatische leukemie, multiple myeloom), exclusief een acute leukemie, Burkitt's lymfoom of T- of B-lymfoblastisch lymfoom en refractaire anemie met blastenoverproductie (RAEB) (Diagnoseregule 1,6: aanrekening maximaal 3x per diagnostische investigatiefase)). (Zie Attachment 4)*

Dit nomenclatuurnummer komt overeen met een B3000 waarde (bedrag 2014: 127.75 euro). Indien de patiënt niet gehospitaliseerd is en geen rechthebbende is met voorkeursregeling is er 8.68 euro voor rekening van de patiënt.

3.5. Besluit

In AZ Delta zal het MYD88 mutatieonderzoek nog niet zelf worden uitgevoerd, wegens het lage aantal geschatte stalen per jaar (ong 10 per jaar). Er wordt een doorstuuranalyse gecreëerd naar het Jessa ziekenhuis te Hasselt. Met de hematologen werd afgesproken om de mutatie op te sporen bij patiënten waar met de huidige diagnostische middelen ((immuno-)histologie, cytologie, flowcytometrie, moleculaire diagnostiek en genetika) geen onderscheid kan worden gemaakt tussen WM en andere IgM-gerelateerde lymfoproliferatieve aandoeningen, waaronder MZL, CLL en MCL. Mogelijks zal MYD88 mutatieonderzoek in de toekomst verder aan belang winnen wanneer het opgenomen wordt in diagnostische criteria en wanneer het belangrijk wordt om patiënten te selecteren voor specifieke therapeutische middelen die inwerken op de MYD88 signaalpathway.

COMMENTS

Het is belangrijk om bij deze CAT rekening te houden met de datum van publicatie (mei 2014). De CAT werd geschreven in een periode waarin de publicaties betreffende MYD88 L265P elkaar snel opvolgden.

TO DO/ACTIONS

- 1) Doorstuuranalyse creëren in AZ Delta Roeselare voor het MYD88 L265P mutatie onderzoek.
- 2) Opvolging van de literatuur.

ATTACHMENTS

Attachment 1

Recent werd een prognostische score ontwikkeld, die de patiënten onderverdeelt in drie risicogroepen met een 5-jaars-overleving van 86% voor de laag-risicogroep tot 36% voor de hoog-risico groep. Deze International Prognostic Index (ISSWM) is opgesteld op basis van eenvoudig in de klinische praktijk te bepalen parameters.

Risk group	Low	Intermediate	High
Score	0-1 (except age)	Age or 2	≥3
5-Year OS (%)	87	68	36
Risk factors			
Age ≥65 years		1	
Other risk factors ^a			
Hb ≤11.5g/dl		1	
Thrombo ≤100 × 10 ⁹ /l		1	
β ₂ M >3mg/l		1	
IgM >70g/l		1	

Abbreviations: β₂M, β₂ microglobulin; Hb, hemoglobin; IgM, monoclonal protein concentration; OS, overall survival; Thrombo, thrombocytes.

^a Each of the risk factors counts as one.

Attachment 2

Samenvatting van de literatuurstudie betreffende MYD88 mutatie bij patiënten met Waldenström macroglobulinemie en gerelateerde B-cel aandoeningen. (literatuursearch tot 01/05/2014)

MYD 88 in multiple myeloma/IgM MGUS and related lymphoma.					
Author	Journal	Study population	Material and methods	Results	Conclusions
Treon et al. 2012	N Eng J Med	30 MW (paired normal-tissue and tumor-tissue in 10 patients); 24 additional MW, 3 non-IgM LPL; 46 marginal zone lymphoma; 10 myeloma; 21 IgM MGUS; 15 healthy donors	A. whole genome sequencing of BM CD19+ cells . B. Sanger sequencing MYD88 gen of BM CD19+ cells	MYD88 L265P positive: LPL 91% ; myeloma (also IgM secreting myeloma) 0%; marginal zone lymphoma: 7%; IgM MGUS 10%; 0% healthy donors	MYD88 L265P mutation is a commonly recurring mutation in MW that can be useful in differentiating MW and non-IgM LPL from other B-cell disorders
Poulain et al. 2013	Blood	67 MW (no familial forms); 5 MM; 9 CLL, 6 HCL, 23 FL, 10 MCL, 2 IgM MGUS, 16 MZL	Sanger sequencing exon 5 of MYD88 gene of BM cells	MYD88 L265P positive: WM 79% (3% homozygous); MZL 6%; FL 4%; HCL, MM, MCL and CLL 0%; 50% (1/2) IgM MGUS	Confirmed high incidence of somatically acquired MYD88 L256P mutation. MYD88 gene might undergo genetic alternations through other mechanisms (UPD, gain of chromosome 3),
Jiménez et al. 2013	Leukemia	117 MW; 31 IgM MGUS; 25IgA/IgM MGUS; 24MM; 9 LPL; 14 splenic MZL; 48 non-germinal center DLBCL; 28 germinal center DLBCL; 35 HCL; 39 CLL	RT-AS PCR (sensitivity $2,5 \times 10^{-3}$) BM cells. Commercial allele-specific amplification with Amplification Refractory Mutation System (ARMS) technology and hydrolysis probe detection: qBiomarker Somatic Mutation Assay for MYD88_85940 (SABiosciences, Qiagene Xo, Hiden, Germany)	MYD88 L265P positive: MW 86% ; IgM MGUS 87% ; splenic MZL 21% ; non germinal center DLBCL 19%. Absent in all other groups.	By using an ASO-PCR with a low detection limit, low tumor burden infiltration, characteristic for immunoproliferative B-cell disorders, such as MW, amyloidosis, myeloma en MGUS can be detected. This explains the different MYD88 L25P positivity frequency in MGUS in contrast with other studies using Sanger sequencing, which is much less sensitive (20-30% of all cells have to carry the mutation). CT value of ASO-PCR was correlated with the number of tumor cells detected by flowcytometry. Wild type MYD88 had smaller M-protein, more lymphocytosis, higher LDH levels, atypical immunophenotype (CD23-CD27+FM7+) less IGHV somatic hypermutation and less IGHV-23 gene selection. No difference in time to first treatment, response to treatment or progression-free or overall survival.
Gachard et al. 2013	Leukemia	53 SMZL (spleen) ; 11 NMZL (lymph nodes), 28 MALT, 27 WM/LPL	RFLP (BsiE1 digestion) + sanger sequencing exon 5 MYD88 gene BM cells	MYD88 L265P positive: 67% LPL/MM; 4% SMZL; 0% NMZL; 7% MALT	Antigen exposure history of these four entities is different and MYD88 L265P is specifically associated with WM/LPL
Varettoni et al. 2013	Blood 2013 121:2522-2528	58 MW; 77 IgM MGUS; 84 SMZL; 52 B-CLPD	Conventional AS-PCR (allele-specific PCR) (sensitivity 10^{-3}) with sequencing as confirmation on BM (mononuclear) cells.	MYD88 L265P positive: WM 100% ; IgM-MGUS 47%; SMZL 6%; B-CLPD 4%	MYD88 L256P mutation in IgM MGUS associated with greater disease burden at diagnosis, higher levels of IgM, deeper suppression of polyclonal IgG and IgA. MYD88 not a founding mutation in IgM MGUS but rather a genetic lesion associated with disease progression. Case-control study found that MYD88 mutation was associated with a significantly higher risk in IgM MGUS of progression to WM or to other lymphoproliferative disorders. MYD88 mutation may represent a useful prognostic marker.
Xu et al. 2013	Blood 2013 121:2051-2058	140 MW; 24 IgM MGUS; 40 healthy donors; 26 CLL; 20 splenic MZL; 14 MM (3IgM MM); 9 IgG MGUS	Conventional AS-PCR with Sanger sequencing (sensitivity 0,1%) and real-time AS-PCR (sensitivity 0,08%) with SYBR green BM CD19+ cells	MYD88 L256P positive: WM 93% ; IgM MGUS 54%; sMZL 10%; CLL 4%; MM 0%; IgGMMGUS 0%; HD 0%	Development of 2 AS-PCR assays with a sensitivity 0,1%, lower than typically appreciated by routine BM analysis. In IgM MGUS patients, 3 patients with the lowest delta Ct value developed to MM. A longitudinal study has to clarify if the detection and/or levels of the MYD88 L256P mutation predict ultimate WM evolution. High rate of concordance between MYD88 Ct and BM disease involvement in MM patients undergoing treatment. Potential use in diagnostic discrimination and/or response assessment.
Willenbacher et al. 2013	Br. J. Haematology 2013 161:884-904	7 MW and 4 IgM MM	Sanger sequencing BM cells	MYD88 L256P positive: 6/7 WM and 0% IgM MM	In contrast to the L265P mutation in exon 5, the results contradict a role of MYD 88 exon 3 and 4 mutations in both WM and IgM MGUS. This has to be investigated in a higher number of patients to confirm. The distinct genetic trait between MW and IgM MGUS can be exploited to discriminate these entities earlier in the disease course.

Author	Journal	Study population	Material and methods	Results	Conclusions
Ondrejka S. et al 2013	Am. J. Clin. Pathol. 2013 140:387-394	A. validation set: 13LPL; 6 sMZL; 9 CLL/SLL; 8 MM; 7MCL; 13 HCL; 2 HCLv; 6 FL B. 16 BCLNOS: after revision: 4LPL; 5 sMLZ; 1 extranodal MZL; 2 MM; 4 BCL (NOS)	Conventional AS-PCR (total DNA extraction from biopsy specimens)	A. MYD88 L256P positive: LPL 100%; HCL 1/13; other B-cell neoplasmas 0%. B. MYD88 L256P positive: LPL 4/4; 3/12 other cases.	Because MYD88 L256P mutation is not entirely specific for LPL, the results should be interpreted in the setting of other clinical, laboratory and pathologic findings. They recommend only testing for this mutation in problematic cases, where its presence would strongly favor LPL/MM. However it should not be used in cases with a clear diagnosis based on current WHO criteria.
Varettoni et al. 2013	Blood 2013 122:2284-2285	136 IgM MGUS patients followed for a total of 469 person years (median 34 months). 9 IgM MGUS patients progressed to WM and 2 to MZL.	Conventional AS-PCR (sensitivity of 0,1%) on BM mononuclear cells (n=92) or archival Giemsa-stained slides (n=44)	MYD88 L256P positive: 52% IgM MGUS. 8/9 MM and 1/2 MZL.	5- and 10- year cumulative incidence of progression was 15% and 45% in patients with MYD88 mutation compared with 2% and 14% in patients with wild type MYD88. Multivariate analysis indicated MYD88 mutation and serum M protein as independent prognostic factors for progression. Presence of both MYD88 mutation and serum M protein >1,5 g/dl identifies a subset of IgM-MGUS patients at high risk of progression. The 5- and 10-year progression rates were resp 1% and 12% for patients with none or one risk factor, and 31% to 60% for patients with 2 risk factors.
Xu et al. 2014	Leukemia 2014 (advanced online publication)	220 WM (118 untreated with smoldering (n=51) and symptomatic (n=7), 102 previously treated); 12 IgM MGUS, 3 polyclonal hyper IgM; 1 IgGLPL; 40 healthy donors.	real-time AS-PCR (0,08% sensitivity) with SYBR green A. PB non selected mononuclear cells. B. PB and BM CD19-selected mononuclear cells	MYD88 L256P positive: A. PB unselected mononuclear cells (n=81): sensitivity of 39,5% and specificity of 100% compared with BM CD19-selected analysis. B. PB (CD19-selected mononuclear cells) compared with BM mutation analysis: IgM MGUS sens 83%; untreated WM sens 98,1% and specificity of 100%; treated WM sens 73,7% and spec 100%.	It is feasible to detect MYD88 L256P mutation in PB with high sensitivity and specificity particularly for untreated WM and IgM MGUS patients. In the appropriate clinical context, and supported by PB MYD88 L256P delta Ct, the use of PB MYD88 L256P may help provide a method to establish diagnosis of WM and follow changes in underlying disease burden. Use of delta Ct could help distinguish WM from IgM MGUS, although further studies are warranted.
Mori et al. 2013	PlosOne 2013	25 WM; 2 non-IgM LPL; 1 low-grade B-cell lymphoma and 38 MM.	Sequencing of PCR products, BstE1 restriction enzyme digestion of PCR products and AS-PCR on mononuclear cells	MYD88 L256P positive with AS-PCR: 18/25 WM; 0/38 MM.	RFLP and AS-PCR more sensitive than direct sequencing.
Landgren et al. 2012	N Engl J Med 2012 367:23	9 IgM MGUS patients (proposed category of IgM-secreting precursor neoplasm: 5 lymphoplasmacytic, 2 plasma cell and 2 lymphoid).	Sanger sequencing BM cells	MYD88 L256 positive: 56%	Since all patients with an IgM spike and MYD88 L256P expression in malignant cells had both clonal B-cells and plasma cells in bone marrow, we propose that these cases represent a precursor to MM rather than a transformation from IgM MGUS to MM.
Hunter et al. 2014	Blood 2014 123(11):1637-46	30 MM (paired normal-tissue and tumor-tissue in 10 patients) (cfr Treon 2012)	A. whole genome sequencing of BM CD19+ cells and DNA from CD19-depleted PB mononuclear cells.	MYD88 L256 positive: 90% MM; CXCR4 positive: 27% MM	Nearly all patients with CXCR4 mutations had also carried MYD88 L256P mutation. WGS studies identified mutations in genes involving TLR, NF- κ B and CXCR4 signaling, chromatin remodeling and cell-cycle regulation. These findings may denote a multistep process for MM evolution from IgM MGUS to asymptomatic and symptomatic MM.
Ansell et al. 2014	Blood Cancer Journal 2014 (online 14 February)	32 MM; 5 LPL (not specified); 5 sMZL; 21 nMZL; 23 MALT	RT-AS-PCR Commercial allele-specific amplification with Amplification Refractory Mutation System (ARMS) technology and hydrolysis probe detection: qBiomarker Somatic Mutation Assay for MYD88_85940 (SABiosciences, Qiagen Xo, Hiden, Germany)	MYD88 L256P positive: 97% MM; 0% LPL; 4% MALT; 5% nMZL; 8% sMZL	High prevalence and specificity of MYD L256P mutation in MM. Cells harboring the mutation but not wild-type MYD88 exhibit constitutive signaling leading to hyperactivation of NF- κ B. They have established the role of TAK1 in both MM and DLBCL cell lines and have identified multiple pharmacodynamic mechanisms by which TAK1 inhibitors may limit growth and survival of malignant B-cells. The data suggest that targeting TAK1 inhibitors may limit growth and survival of malignant B-cells.
Wang et al. 2011	N Eng J Med 2011 365(26):2497-506	91 CLL	parallel sequencing of 88 whole exomes and whole genomes, together with sequencing of matched germline DNA	10% (9/91) MYD88 mutations (P258L, M232T and L265P (7% van CLL patients))	

Attachment 3**Casus M 54 j**

Initieel als CLL gediagnosticeerde aandoening met CLL-score van 4/5. Echter aanwezigheid van sterke CD20 expressie, expressie van CD79b en een laag aantal lymfocyten ($<5000/\mu\text{L}$). Bij verdere evolutie werd morfologisch de lymfoplasmocyttaire differentiatie duidelijker, terwijl het immuunfenotype gelijk bleef. Positiviteit van MYD88 L265P bevestigde de diagnose van Waldenström macroglobulinemie

Voorgeschiedenis

- 2007 arthroscopie meniscus verwijdering
- 04/2013 zona infectie

December 2013

-Auto-immuun hemolytische anemie met warme anti-lichamen, IgM kappa paraproteïne 1.42 g/dl

-Perifeer bloed

WBC $5.95 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4.20-9.80); RBC $1.74 \times 10^6/\mu\text{L}$ (4.30-5.71); Hb 6.2g/dL (13.7-17.1); BPL $39 \times 10^3/\mu\text{L}$ (62-351); reticulocyten $218.8 \times 10^3/\mu\text{L}$ (24.0-84.0); lymfocyten $0.64 \times 10^3/\mu\text{L}$ (1.15-3.25)

-Beenmergonderzoek:**Beenmergaspiraats****- cytomorfologie**

Hypercellulaire preparaten met sterk prolifererende erythroïde reeks met zekere graad van dyserythropoïese. Beeld passend bij auto-immuun hemolytische anemie. Hoognormaal aantal lymfocyten (20% van de witte bloedcellen).

- flowcytometrie

Binnen de lymfocyten 59% klonale B-lymfocyten: kappa zw+/CD5zw+/CD10-/CD20+/CD23+/CD38-/CD79b+/CD200+ (zie scatterplots) met CLL score van 4/5.

- genetisch onderzoek

Niet gestimuleerd is het karyotype normaal maar na stimulatie met TPA worden clonale afwijkingen gezien aspecifiek in een minderheid van de cellen (3/10 geanalyseerde cellen). Het betreft een kloon 46-47,XY,ADD(1)(Q41),+4,ADD(6)(Q16),ADD(12)(P13) [2] [CP3]. Dit bevestigt de aanwezigheid van een monoclonaal lymfoproliferatief proces.

Beenmergbotboor:

Beenmerg (coagulum en botboor): sterk hypercellulair, heterogeen samengesteld beenmerg met normaal voorkomende megakaryocyttaire en myeloïde reeks. Erythroïde reeks is sterk hyperplastisch met lichte maturatiestoornissen. Beeld passend bij hemolytische anemie. Met immunohistochemie wordt geen toename van het aantal CD34 positieve stamcellen gezien. Met immunohistochemische kleuringen voor CD20 en CD3 wordt een diffuse lymfocytose van

ongeveer 15% gezien, overwegend samengesteld uit CD3-positieve T-lymfocyten, vermengd met CD20-positieve-B-elementen. Geen grote expansieve B- of T-celclusters.

Maart 2014

Algemene malaise en asthenie bij patiënt met voorgeschiedenis van auto-immuun hemolytische anemie met IgM paraproteïne en monoclonale B-lymfocyten. Geen argumenten voor recidief hemolytische anemie (normaal haptoglobine, normaal LDH). PET-scan toont verdacht lytisch letsel in L4 en eveneens een FDG-capterend letsel tussen de linker nierbovenpool en de milt.

Perifeer bloed

WBC $7.150 \times 10^3/\mu\text{L}$ (4.20-9.80); RBC $3.16 \times 10^6/\mu\text{L}$ (4.30-5.71); Hb 9.1g/dL (13.7-17.1); BPL $133 \times 10^3/\mu\text{L}$ (62-351); reticulocyten $3.8 \times 10^3/\mu\text{L}$ (24.0-84.0); lymfocyten $510 \times 10^3/\mu\text{L}$ (1.15-3.25)

IgM kappa paraproteïne 4 g/dl

Beenmerg

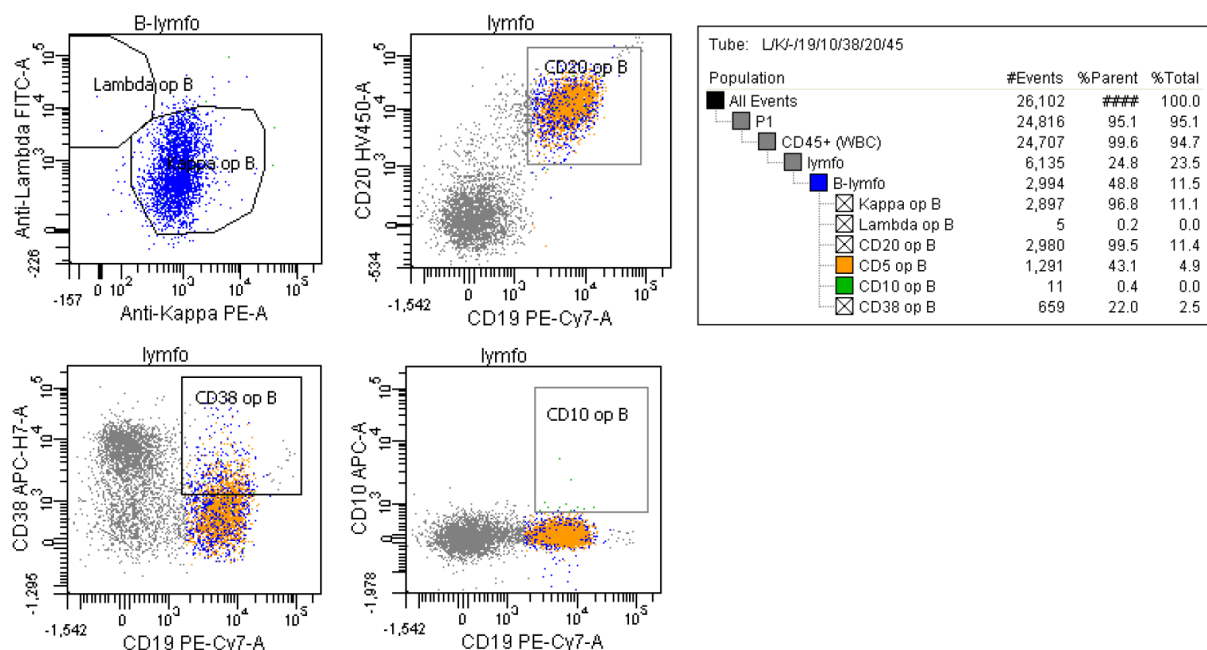
Beenmergaspiraat

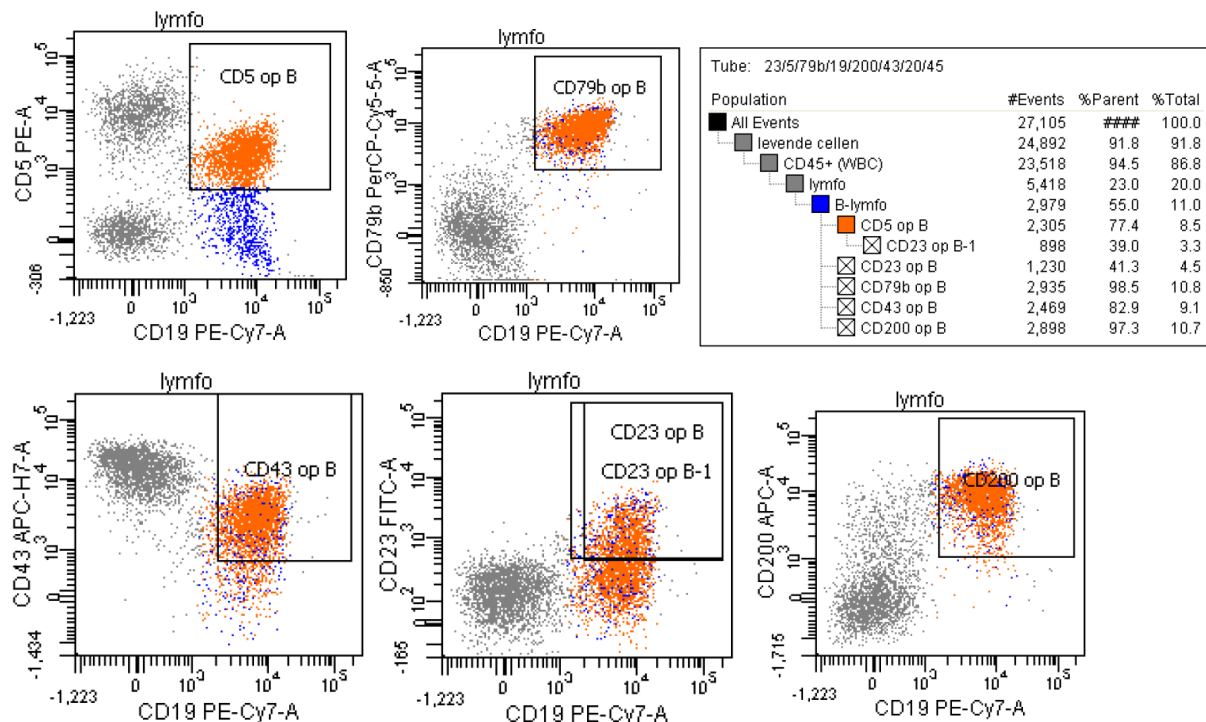
- Cytomorfologie

Normo- tot plaatselijk hypercellulaire beenmerg. Aanwezigheid van 68% lymfocyten van de WBC met verdringing van de overige reeksen. De lymfocyten zijn overwegend klein, weinig cytoplasma. Daarnaast aanwezigheid van grotere lymfocyten met lymfoplasmocytair voorkomen met hoog normaal aantal plasmacellen (3% van de WBC).

- Flowcytometrie

Binnen de lymfocyten 54% klonale B-lymfocyten: kappa zw+/CD5zw+/CD10-/CD20+/CD23+/CD38-/CD79b+/CD200+ (zie scatterplots) met CLL score van 4/5. Sterke CD20 en CD79b expressie is niet typisch voor CLL.





- Genetisch onderzoek
- Moleculaire diagnostiek

MYD88 L265P mutatie analyse (Jessa Ziekenhuis Hasselt): positief

Beenmergbotboor

Beenmerg: hypercellulair, nog heterogeen samengesteld beenmerg met sterk verhoogde cellulariteit. Massieve infiltratie door kleincellig B-cel non Hodgkin lymfoma met componenten plasmocyten en lymfoplasmocytoïde cellen. Compatibel met chronische lymfatische leukemie. Morbus Waldenström is niet uit te sluiten. Duidelijk toegenomen aantal reticulinevezels. Geen collageenfibrose. Beperkte ijzerreserves. De immunohistochemie voor CD20 en CD3 toont een gemengde diffuse lymfocytose van ongeveer 50%, met licht overwicht aan CD20-positieve B-elementen en vermengd met talrijke reactieve CD3-positieve T-elementen. Er is mogelijk zwakke co-expressie van CD20 met CD5 en mogelijk ook met CD23. Het betreft een kleincellig B-cel non-Hodgkin lymfoma, mogelijk overeenkomend met CLL. Echter te correleren met hematologie en flowcytometrie.

Biopsie wervel L4

De fragmenten worden voor een deel ingenomen door een diffuus groeiend letsel dat bestaat uit grote atypische lymfoïde elementen. Beeld erg suggestief voor een diffuus grootcellig B-cel lymfoma. Plaatselijk wordt residueel kleincellig lymfoom gezien. Er is vermoedelijk plasmocytair of lymfoplasmocytair differentiatie. Immunohistochemie toont aan dat de grote atypische lymfoïde elementen aankleuren voor CD20 en geen CD5 exprimeren. Het kleincellig infiltraat bestaat vooral uit CD3-positieve-T-lymfocyten. CD20-positieve-B-lymfocyten zijn zeldzamer. Op de kleine B-lymfocyten is er mogelijk co-expressie van CD5. Er is mogelijk een licht overwicht van kappa lichte ketenexprimerende immunocyten. Het

immunohistochemisch onderzoek bevestigt de diagnose van diffuus grootcellig B-cellymfoma. Mogelijk is er onderliggend een moeilijk te typeren kleincellig lymfoma.

Conclusie: DLBCL getransformeerd uit Waldenström macroglobulinemie waarvoor opstart van R-CHOP

Attachment 4

Vergoedingsvoorwaarden (2014) voor analyses die vallen onder artikel 33 bis van de nomenclatuur. (Bron: <http://www.inami.fgov.be/insurer/nl/rate/pdf/last/doctors/bio20140101nl-corr.pdf> (omzendbrief))

VI. Artikel 33 bis van de nomenclatuur (geen forfaitisering met vermindering honoraria tot 25%)

Moleculaire biologische testen op menselijk genetisch materiaal bij verworven aandoeningen

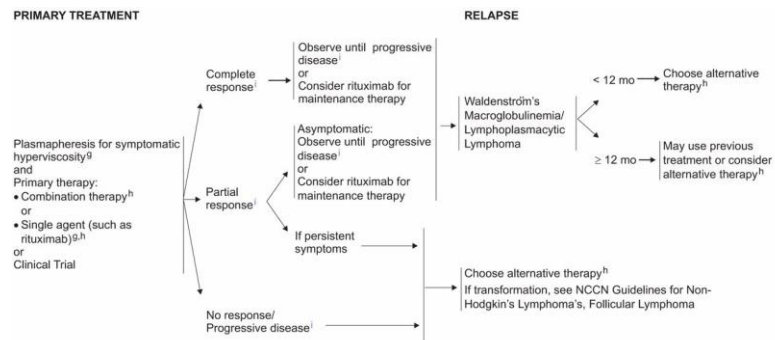
B = 0,042584 EUR

Codenummer				Honoraria 100%	Tegemoetkoming Ambulant		Tegemoetkoming Gehospitaliseerd	
					Rechttebenden met voorkeuregeling	Rechttebenden zonder voorkeuregeling	Rechttebenden met voorkeuregeling	Rechttebenden zonder voorkeuregeling
588431	588442	B	3000	127,75	127,75	119,07	127,75	127,75
588453	588464	B	3000	127,75	127,75	119,07	127,75	127,75
588475	588486	B	3000	127,75	127,75	119,07	127,75	127,75
588490	588501	B	3000	127,75	127,75	119,07	127,75	127,75
588512	588523	B	3000	127,75	127,75	119,07	127,75	127,75
588534	588545	B	3000	127,75	127,75	119,07	127,75	127,75
588556	588560	B	8000	340,67	340,67	331,99	340,67	340,67
588571	588582	B	3000	127,75	127,75	119,07	127,75	127,75
588593	588604	B	3000	127,75	127,75	119,07	127,75	127,75
588770	588781	B	3000	127,75	127,75	119,07	127,75	127,75
588792	588803	B	4000	170,34	170,34	161,66	170,34	170,34
588851	588862	B	4000	170,34	170,34	161,66	170,34	170,34
588814	588825	B	4000	170,34	170,34	161,66	170,34	170,34
588836	588840	B	3000	127,75	127,75	119,07	127,75	127,75
587016	587020	B	3500	149,04	149,04	140,36	149,04	149,04
587031	587042	B	3500	149,04	149,04	140,36	149,04	149,04
587053	587064	B	5000	212,92	212,92	204,24	212,92	212,92
589691	589702	B	4000	170,34	170,34	161,66	170,34	170,34
589713	589724	B	8000	340,67	340,67	331,99	340,67	340,67

Attachment 5

National Comprehensive Cancer Network aanbevelingen voor Waldenström macroglobulinemie /lymfoplasmocytair lymfoom versie 2.2013.





^gPlasmapheresis should be performed for patients with symptomatic hyperviscosity, and before treatment with rituximab containing regimen in patients with IgM ≥ 5000 mg/dL. IgM should be monitored closely in these patients thereafter and plasmapheresis considered again if symptomatic hyperviscosity occurs or if IgM ≥ 5000 mg/dL while on rituximab containing therapy.

^hSee Suggested Treatment Regimens (WMLPL-B).

ⁱSee Response Criteria for WMLPL (WMLPL-C).

Version 2.2013 © National Comprehensive Cancer Network, Inc. 2012. All rights reserved. The NCCN Guidelines® and this illustration may not be reproduced in any form without the express written permission of NCCN®.

WMLPL-2