EXPERTISE ET PRESTATIONS DE SERVICE
QUALITE DES LABORATOIRES

COMMISSION DE BIOLOGIE CLINIQUE ET D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE
COMITE DES EXPERTS

EVALUATION EXTERNE DE LA QUALITE
DES ANALYSES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE A DESTINATION DES
LABORATOIRES DE BIOLOGIE CLINIQUE ET D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE

RAPPORT ANNUEL GLOBAL

Biologie Moléculaire
Hémato-oncologie et examens génétiques
Art. 33 bis et 33 ter

2020

Version corrigée-13/04/2021

Sciensano/Programme EEQ/13-FRvc

Expertise et prestations de service
Qualité des laboratoires
Rue J. Wytsman, 14
1050 Bruxelles | Belgique

www.sciensano.be

ISSN: 2294-3471

COMITE DES EXPERTS

Sciensano					
Secrétariat		TEL:	02/642 55 22	FAX:	02/642 56 45
Nom coordinateur d'enquête	Joséphine Lantoine* et Bernard China	TEL:	02/642 53 94 et 02/642 53 85		
		e-mail:	Josephine.lantoine@sciensano.be ; bernard.china@sciensano.be		
Nom coordinateur d'enquête remplaçant	Vanessa Ghislain	TEL:	02/642 52 08		
		e-mail:	Vanessa.ghislain@sciensano.be		

Experts	Institution
Barbara Denys	UZGENT
Evelien Heylen	ZNA
Fréderic Lambert	CHU LIEGE
Brigitte Maes	Jessa Ziekenhuis
Freya Vaeyens	UZ Brussel
Jacques Van Huysse	AZ Sint Jan
Roberto Salgado	GZA
Patrick Pauwels	UZA
Pierre Heimann	LHUB

*coordinateur en formation

Une version provisoire de ce rapport a été transmise aux experts le :
26/11/2020

Ce rapport a été discuté lors de la réunion du comité des experts du :
03/12/2020

Un résumé de ce rapport a été présenté lors de la réunion de la Commission de biologie clinique/ d'anatomie pathologique du : NA

Corrections :

P6 : Echantillon-statut mutationnel BRAFV600E
P7 : résultats BRAF V600E : NM_004333.6(BRAF):c.1799_1800delinsAA (p.Val600Glu) remplacé par BRAF V600E.
P20 : EGFR-point 2. Résultats par laboratoires
P36 : FLT3-TP53 point 1. Résultats par échantillons (fréquences alléliques attendues)
P38 : 8 laboratoires n'ont pas détecté la mutation FLT3 ITD300. **6 laboratoires ont utilisé la technique NGS et 2 une technique PCR.**
P41-43 : résultats pour l'antigène RhCe

Autorisation de diffusion de rapport: Par Joséphine Lantoine et Bernard China, Coordinateurs d'enquête, le 13/04/2021 et la première version le 22/12/2020.

Josephine Lantoine Digitally signed by Josephine Lantoine

Tous les rapports sont également consultables sur notre site web :
https://www.wiv-isp.be/QML/activities/external_quality/rapports/_fr/rapports_annee.htm

Table des matières

INTRODUCTION **5**

BRAF V600E **6**

ECHANTILLON 6
PARTICIPATION 6
RÉSULTATS 6
CONCLUSIONS SUR LA PERFORMANCE DES LABORATOIRES 9

HER 2 ..... **10**

ECHANTILLON 10
PARTICIPATION 10
RÉSULTATS 10
CONCLUSIONS SUR LES PERFORMANCES DES LABORATOIRES 14

EGFR-RAS **16**

ECHANTILLONS 16
PARTICIPATION 16
RÉSULTATS 17
CONCLUSIONS SUR LES PERFORMANCES DES LABORATOIRES 30

MYELOIDE: JAK2/BCR-ABL/FLT3-TP53 ..... **31**

ECHANTILLONS 31
PARTICIPATION 31
RÉSULTATS 32
CONCLUSIONS SUR LES PERFORMANCES DES LABORATOIRES 39

ANTIGÈNE AUTRES QUE ABO ET RH ; D FAIBLE/D VARIANT **40**

ECHANTILLON 40
PARTICIPATION 40
RÉSULTATS 40
CONCLUSIONS DE L'ENQUÊTE 44

RH D'UN FŒTUS **45**

ECHANTILLONS 45
PARTICIPATION 45
RÉSULTATS 45
CONCLUSIONS DE L'ENQUÊTE 45

INTRODUCTION

En 2020, nous avons organisée 6 enquêtes portant sur les art.33 bis et 33 ter de la nomenclature INAMI.

L'enquête 2020/1 portait sur la détection de la mutation du gène BRAF V600 en cas de mélanome.

L'enquête 2020/2 portait sur la détection de l'amplification du gène HER2 en cas de cancer du sein non métastatique ou métastatique.

L'enquête 2020/3 portait sur la détection de la mutation EGFR T790M en cas de cancer du poumon et sur la détection des mutations des gènes RAS en cas de carcinome colorectal.

L'enquête 2020/4 portait sur la détermination d'autres antigènes d'érythrocytes que ABO et Rh et la détermination d'un D faible ou variant.

L'enquête 2020/5 portait sur la détection de la mutation JAK2V617F, la détection du gène de fusion BCR/ABL t(9 ;22) et de la détection des mutation FLT3 ITD300 ; FLT3 D835Y et des mutations du gène TP53.

L'enquête 2020/6 portait sur le génotypage RH1 d'un fœtus.

Pour la détection des mutations dans les gènes facteur II et facteur V, il a été demandé aux laboratoires de s'inscrire auprès du fournisseur ECAT. De même, pour certains autres paramètres il leur a été demandé de s'inscrire auprès de GenQA ou UKNEQAS Li. Un remboursement est prévu pour l'année 2020 pour les laboratoires qui nous ferons part de leurs résultats.

BRAF V600E

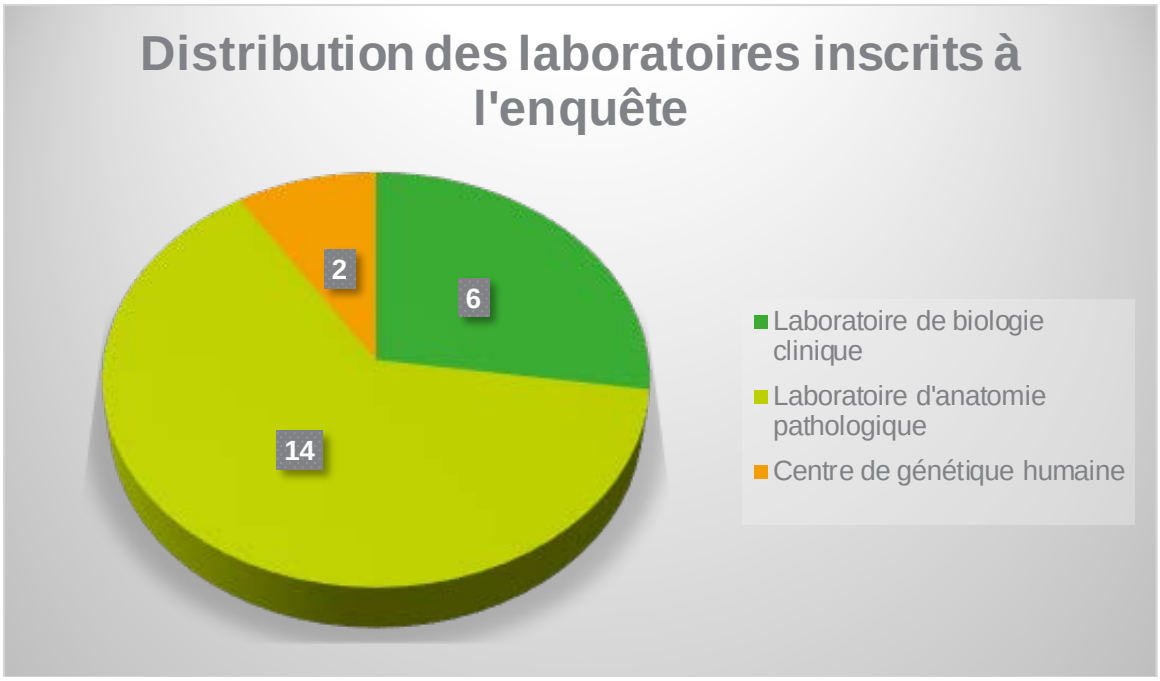
Echantillon

Les échantillons sont des coupes FFPE de 6 µm d'épaisseur provenant de biopsies de mélanomes. Ils proviennent de la biobanque Discovery Life Science située dans l'Ohio, USA.

Les échantillons sont accompagnés des données cliniques relatives à chaque patient : age, sexe, race, site de la tumeur, type de tumeur, données pathologiques, indications sur le traitement reçu par le patient si disponible et statut mutationnel BRAF V600E.

Participation

22 laboratoires étaient inscrits à l'enquête. La distribution des laboratoires s'effectue comme suit :



21 laboratoires ont répondu ; un laboratoire n'a pu obtenir de second envoi dû à la crise sanitaire engendrée par le COVID-19.

NB : Veuillez noter la différence avec le rapport préliminaire dans lequel nous avions indiqué 20 laboratoires participants. En effet, un laboratoire a finalement retrouvé les échantillons et les résultats des analyses effectuées. Les résultats nous ont été communiqués en juin.

Résultats

Les laboratoires participants ont reçu 2 lames FFPE pour chaque cas clinique. Ceux-ci ont dû rechercher la présence de la mutation BRAFV600E par des méthodes moléculaires. Il était également demandé aux laboratoires d'indiquer la fréquence allélique si déterminée ainsi que la méthode utilisée pour la détection de la mutation.

1. Résultats par échantillon

Echantillon	Résultats attendus	Résultats encodés	Nombre de laboratoires (%)
F00007697	BRAF V600E NON DETECTEE	NON DETECTEE	17/21 (80.1)
		DETECTEE	2/21 (9.5)
		PAS DETERMINE	2/21 (9.5)
C000047578.2E	BRAF V600E DETECTEE	NON DETECTEE	1/21 (4.8)
		DETECTEE	19/21 (90.5)
		PAS DETERMINE	1/21 (4.8)

2. Résultats par laboratoire

		F00007697	C000047578.2E
Labo	**Méthodes utilisées**	BRAF V600E	BRAF V600E
1	Idylla	NON DETECTEE	DETECTEE
2	Idylla	NON DETECTEE	DETECTEE
3	Idylla	**DETECTEE**	**NON DETECTEE**
4	Idylla	NON DETECTEE	DETECTEE
5	Idylla	NON DETECTEE	DETECTEE
6	Idylla	**DETECTEE**	DETECTEE
7	Idylla	NON DETECTEE	DETECTEE
8	Idylla	NON DETECTEE	DETECTEE
9	Idylla	**NON DETERMINE**	DETECTEE
10	Roche Cobas	NON DETECTEE	DETECTEE
11	WTB -PCR + sanger (Home-made)	NON DETECTEE	DETECTEE
12	PCR digitale Home-made	NON DETECTEE	DETECTEE
13	NGS custom panel ROCHE SeqCap EZ choice	NON DETECTEE	DETECTEE
14	NGS ILLUMINA Custom design	**NON DETERMINE**	DETECTEE
15	NGS Illumina Ampliseq focus panel	NON DETECTEE	DETECTEE
16	NGS ILLUMNA Truseq Amplicon Cancer Panel	NON DETECTEE	**NON DETERMINE**
17	NGS Qiagen AIT UMI-FFPE	NON DETECTEE	DETECTEE
	IDYLLA	NON DETECTEE	DETECTEE
18	NGS custom panel Qiagen-Qiaseq CDMS-151362-520	NON DETECTEE	DETECTEE

19	NGS SeqCAp EZ Hyper Cap Capture panel	NON DETECTEE	DETECTEE
20	NGS thermofischer Ampliseq custom panel	NON DETECTEE	DETECTEE
21	NGS-SeqCap Roche +Illumina custom panel (69 gènes)	NON DETECTEE	DETECTEE

3. Commentaires

- Concernant l'échantillon F00007697, les deux laboratoires n'ayant pu déterminer le statut mutationnel BRAF V600E ont déclaré ne pas avoir eu assez de matériel pour poursuivre l'analyse après extraction. Une augmentation de l'épaisseur des sections fournies aux laboratoires peut être envisagée pour les prochaines enquêtes BRAF.

- Concernant l'échantillon, C000047578.2E, le laboratoire n'ayant pu déterminé le statut mutationnel BRAF V600E a déclaré un problème technique.

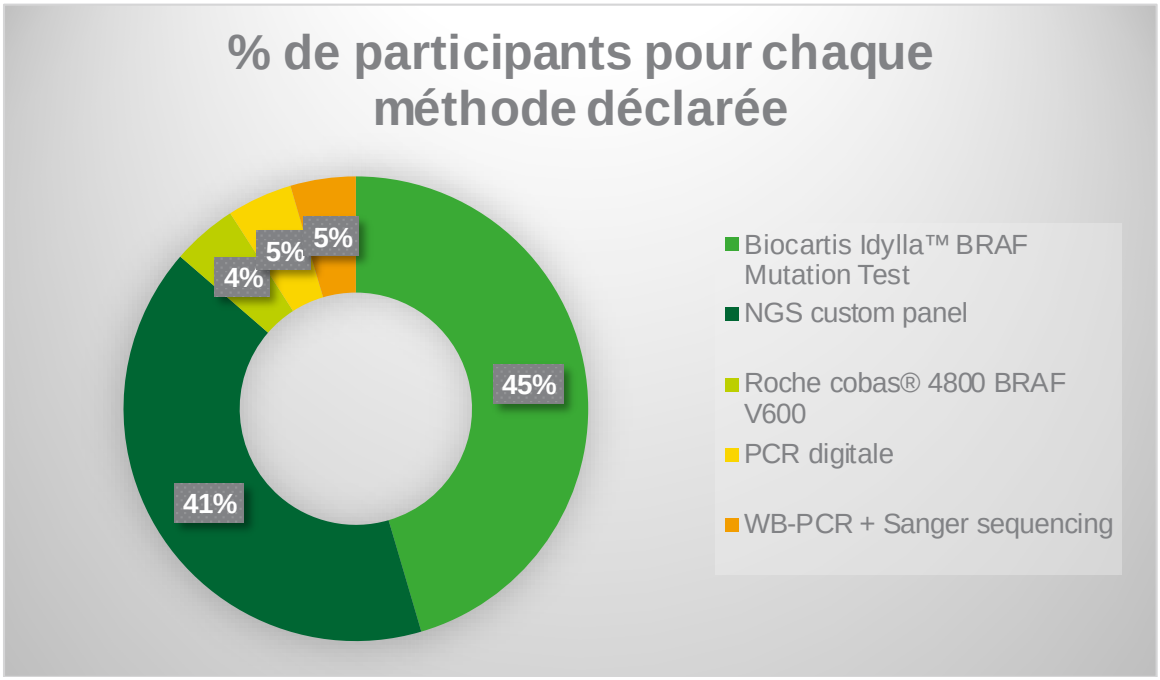
- Un laboratoire a utilisé deux techniques différentes (Idylla et NGS Qiagen) et les deux techniques ont données des réponses identiques.

- Les laboratoires ayant indiqué l'échantillon F00007697 comme positif ont tous les deux utilisé la technique Idylla. Néanmoins un seul des deux laboratoires a indiqué l'échantillon C000047578.2E comme négatif. Il est donc probable que ce laboratoire ait interverti les données lors de l'encodage.

Il est à noter qu'aucun des deux laboratoires ne nous a contacté après publication du rapport préliminaire.

4. Méthodes utilisées

Selon les 21 participants, les méthodes suivantes ont été utilisées pour la détection du statut mutationnel BRAF V600E lors de cette enquête :



Les méthodes les plus utilisées par les laboratoires pour la détection de la mutation BRAFV600E sont la méthode Idylla BRAF mutation test ainsi que le NGS.

Conclusions sur la performance des laboratoires

Les performances des laboratoires sont satisfaisantes pour cette enquête 2020/1-BRAFV600E.

De manière générale, ceux-ci ont bien détecté la mutation dans l'échantillon positif. Seul 1 laboratoire a déclaré cet échantillon négatif (inversion des données probable). Néanmoins, un laboratoire a quant à lui déclaré avoir détecté la mutation BRAF V600E dans l'échantillon négatif ce qui pourrait à terme mener à l'administration d'une thérapie ciblée à un patient mais dont le bénéfice pour le patient serait faible dû à l'absence de mutation BRAF V600E.

Les laboratoires n'ayant pu déterminé le statut mutationnel BRAF de l'un ou l'autre échantillon ont eu soit un problème technique soit pas assez de matériel après extraction.

HER 2

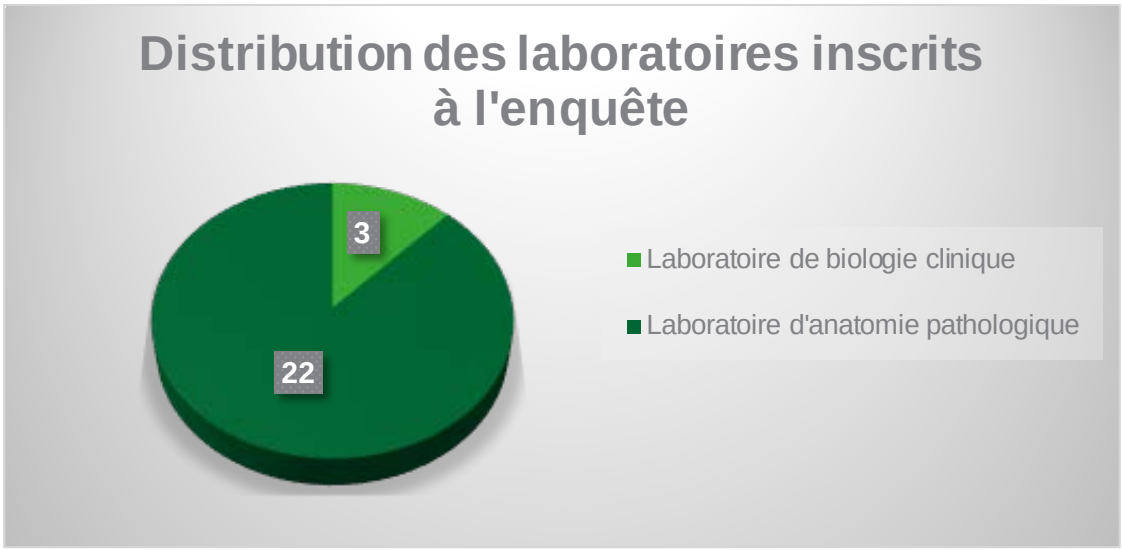
Echantillon

Les échantillons sont des coupes FFPE de 5 µm d'épaisseur provenant de biopsies de carcinomes mammaires. Ils proviennent de la biobanque Discovery Life Science située dans l'Ohio, USA.

Les échantillons sont accompagnés des données cliniques relatives à chaque patient : âge, sexe, race, site de la tumeur, type de tumeur, données pathologiques, indications sur le traitement reçu par le patient si disponible, les résultats de l'IHC et le statut de HER2 (amplifié ou non) sauf pour le cas équivoque IHC 2+.

Participation

25 laboratoires étaient inscrits à l'enquête. La distribution des laboratoires s'effectue comme suit :



Tous les laboratoires inscrits ont répondu à l'enquête.

Résultats

Les laboratoires ont reçu 2 lames FFPE pour 3 cas cliniques différents soit 6 lames au total. Il leur était demandé de détecter l'amplification du gène HER2 par des méthodes moléculaires de type ISH. Les résultats des tests immunohistochimiques précédemment réalisés leur étaient communiqués.

Dans le cadre de ce contrôle, il leur était demandé d'effectuer la détection sur au moins une lame par cas même s'il ne l'aurait pas fait en routine compte tenu du résultat de l'IHC. Il était également demandé aux laboratoires la méthode utilisée pour la détection de la mutation ainsi que les guidelines suivies. Une question supplémentaire concernant la demande d'une analyse ISH au vu du résultat de l'IHC leur était également posée pour chaque cas.

1. Résultats par échantillon

Echantillon	Résultats attendus	Résultats encodés	Nombre de laboratoires (%)
C00037963.2C	NON AMPLIFIE	NON AMPLIFIE	19/25 (76)
		AMPLIFIE	0
		EQUIVOQUE	0
		PAS DETERMINE	6/25 (24)
C00025143.A2	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE	0
		AMPLIFIE	25/25 (100)
		EQUIVOQUE	0
		PAS DETERMINE	0
C00084117.1	NON AMPLIFIE*	NON AMPLIFIE	22/26 (84.6)
		AMPLIFIE	1/26 (3.8)
		EQUIVOQUE	1/26 (3.8)
		PAS DETERMINE	2/26 (7.7)

***Déterminé par consensus des réponses des laboratoires participants**

Veuillez noter que le nombre de laboratoires participants supérieur à 25 pour l'échantillon C00084117.1 est dû au fait qu'un laboratoire a réalisé les analyses avec deux versions d'un même kit Ventana et a donné deux réponses différentes pour cet échantillon.

2. Résultats par laboratoire

		C00037963.2C	C00025143.A2	C00084117.1
Laboratoire	Méthodes utilisées	NON AMPLIFIE	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
1	Ventana-HER2 Dual ISH	NON AMPLIFIE	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
2	Ventana-HER2 Dual ISH	NON AMPLIFIE	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
3	Ventana-HER2 Dual ISH	NON AMPLIFIE	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
4	Ventana-HER2 Dual ISH	NON AMPLIFIE	AMPLIFIE	EQUIVOQUE*
5	Ventana-HER2 Dual ISH	**NON DETERMINE**	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
6	Ventana-HER2 Dual ISH	NON AMPLIFIE	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
7	Ventana-HER2 Dual ISH	NON AMPLIFIE	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
8	Ventana-HER2 Dual ISH	**NON DETERMINE**	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
9	Ventana-HER2 Dual ISH	NON AMPLIFIE	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
10	Ventana-HER2 Dual ISH	NON AMPLIFIE	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
11	Ventana-HER2 Dual ISH	NON AMPLIFIE	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
12	Ventana-HER2 Dual ISH	NON AMPLIFIE	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
13	Ventana-HER2 Dual ISH	NON AMPLIFIE	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
14	Ventana-HER2 Dual ISH	NON AMPLIFIE	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
15	Ventana-HER2 Dual ISH OLD kit	**NON DETERMINE**	AMPLIFIE	**NON DETERMINE**

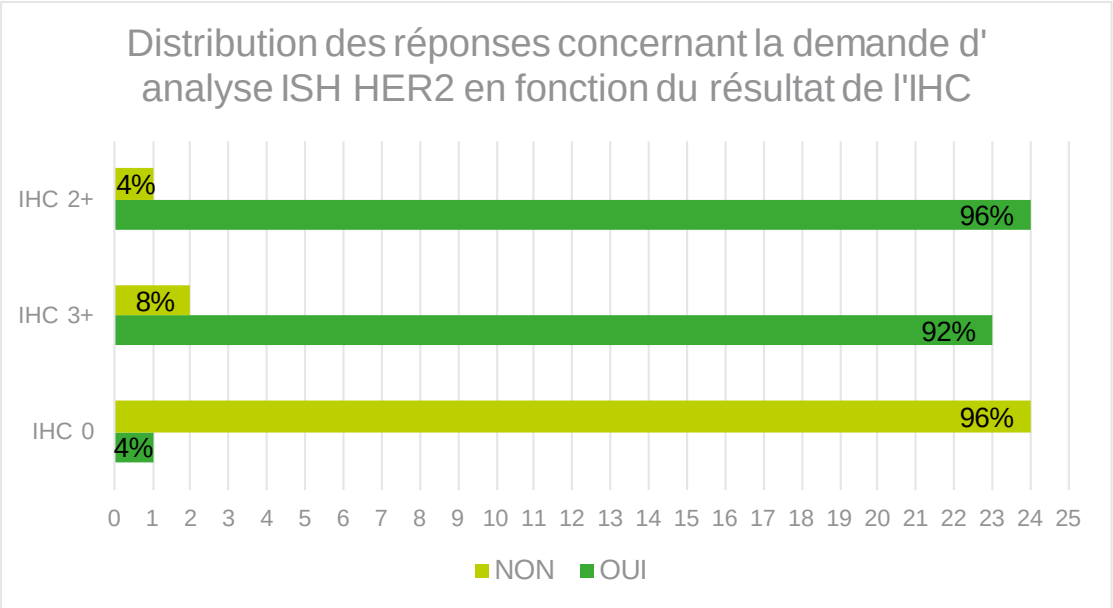
	Ventana-HER2 Dual ISH (Nouvelle version kit)			NON AMPLIFIE
16	Ventana-HER2 Dual ISH (Nouvelle version)	**NON DETERMINE**	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
17	Path Vysion HER2-DNA probe kit Abbot/Vysis	NON AMPLIFIE	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
18	Path Vysion HER2-DNA probe kit Abbot/Vysis	NON AMPLIFIE	AMPLIFIE	**AMPLIFIE**
19	Path Vysion HER2-DNA probe kit Abbot/Vysis	NON AMPLIFIE	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
20	Path Vysion HER2-DNA probe kit Abbot/Vysis	**NON DETERMINE**	AMPLIFIE	**NON DETERMINE**
21	Path Vysion HER2-DNA probe kit Abbot/Vysis	NON AMPLIFIE**	AMPLIFIE**	NON AMPLIFIE**
22	DAKO HER2 FISH pharmDX	NON AMPLIFIE	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
23	DAKO HER2 FISH pharmDX	**NON DETERMINE**	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
24	DAKO HER2 FISH pharmDX	NON AMPLIFIE	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE
25	Fish Dako (Agilent) HER2 IQ FISH pharm Dx (Dako Omnis)	NON AMPLIFIE	AMPLIFIE	NON AMPLIFIE

* Ce laboratoire a indiqué en commentaire que HER2 n'était pas amplifié sur base des guidelines ASCO-CAP 2017-2018.

** Ce laboratoire a émis une réserve concernant la validité de ses réponses. En effet, pour ce laboratoire, les coupes étaient trop épaisses rendant l'analyse non qualitative et l'interprétation difficile.

3. Réponses à la question supplémentaire

A la question « En routine, auriez-vous effectuer l'analyse ISH au vu du résultat de l'IHC ? », les laboratoires participants ont déclaré :



4. Commentaires

- Pour l'échantillon C00037963.2C, les laboratoires ont majoritairement bien répondu. Les quatre laboratoires ayant indiqué « non déterminé » en utilisant la technique Ventana ont soit :

  (i) pas pu effectuer l'analyse suite à une problème d'étiquetage de l'échantillon (firme DLS contactée). Le problème s'est révélé après la coloration. Une slide du tissu de l'échantillon A2 ayant été étiquetée comme provenant de l'échantillon 2C.

  (ii) pas pu effectuer l'analyse suite au détachement du tissu

  (iii) obtenu une analyse invalide après deux essais

  (iv) obtenu des contrôles externes corrects mais des contrôles internes non-valides avec les deux méthodes Ventana utilisées (ancienne et nouvelle version du kit).

- Le laboratoire ayant répondu non déterminé pour l'échantillon C00037963.2C avec la technique Path Vysion HER2-DNA probe kit Abbot/Vysis n'a pas obtenu de résultat interprétable suite à la FISH avec la présence d'autofluorescence et un faible voir une absence de signal de la sonde. Après discussion avec la firme, ceux-ci nous ont indiqué que le patient dont était issue la biopsie était sous Tamoxifen ce qui peut causer de l'autofluorescence en bruit de fond.

- Le laboratoire ayant répondu non déterminé pour l'échantillon C00037963.2C avec la technique DAKo PharmDx n'a pas obtenu de résultat interprétable suite à la FISH avec la présence d'un bruit de fond et une absence de signal de la sonde.

- Il est à noter que 3 laboratoires nous ont indiqué une qualité non optimale ou faible de l'échantillon C00037963.2C après coloration mais ont donné une réponse correcte. Cette faible qualité peut être due au traitement que le patient subissait au moment de la biopsie (traitement au Tamoxifen).

- Pour l'échantillon C00025143.A2, l'ensemble des laboratoires a donné une réponse correcte.

- Pour l'échantillon C00084117.1, seul un laboratoire a répondu « amplifié » et est donc hors consensus. Son ratio HER2/CEP17 était de 14.44.

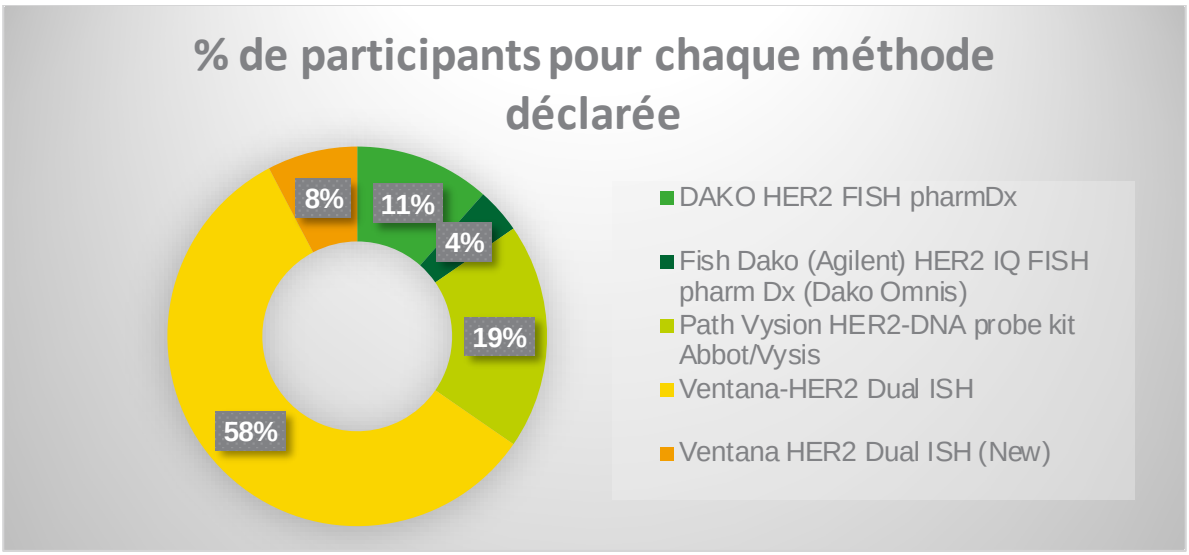
- Les deux laboratoires ayant répondu non déterminé pour l'échantillon C00084117.1 ont utilisé deux techniques différentes. Un laboratoire a utilisé la technique Ventana avec l'ancienne version du kit et n'a pas pu rendre un résultat avec cette version (présence de poussières) mais a donné une réponse correcte en utilisant la nouvelle version du kit. L'autre laboratoire a utilisé la technique Path Vysion HER2-DNA probe kit Abbot/Vysis et n'a pas obtenu de résultat interprétable suite à la FISH avec la présence d'autofluorescence et un faible voir une absence de signal de la sonde.

- Il est à noter qu'un laboratoire a remis des résultats « sous-réserve » pour l'ensemble des échantillons suite à des coupes trop épaisses rendant l'interprétation de l'analyse FISH difficile. Seul ce laboratoire a émis une critique concernant l'épaisseur des coupes. Les guidelines pour l'analyse FISH recommandent d'avoir des sections de 4-6 µm. La firme qui a préparé les échantillons a réalisé des sections de 5 µm à notre demande.

- Dans la majorité des cas, les laboratoires n'auraient pas réalisé l'analyse ISH pour la coupe ayant un IHC 0 mais bien pour une coupe avec un IHC 3+ ou 2+. Néanmoins, un laboratoire a déclaré le faire quand même pour un IHC 0 et un autre laboratoire a déclaré qu'il n'aurait pas demandé d'ISH quel que soit le résultat de l'IHC 0, 3+ ou 2+.

5. Méthodes utilisées

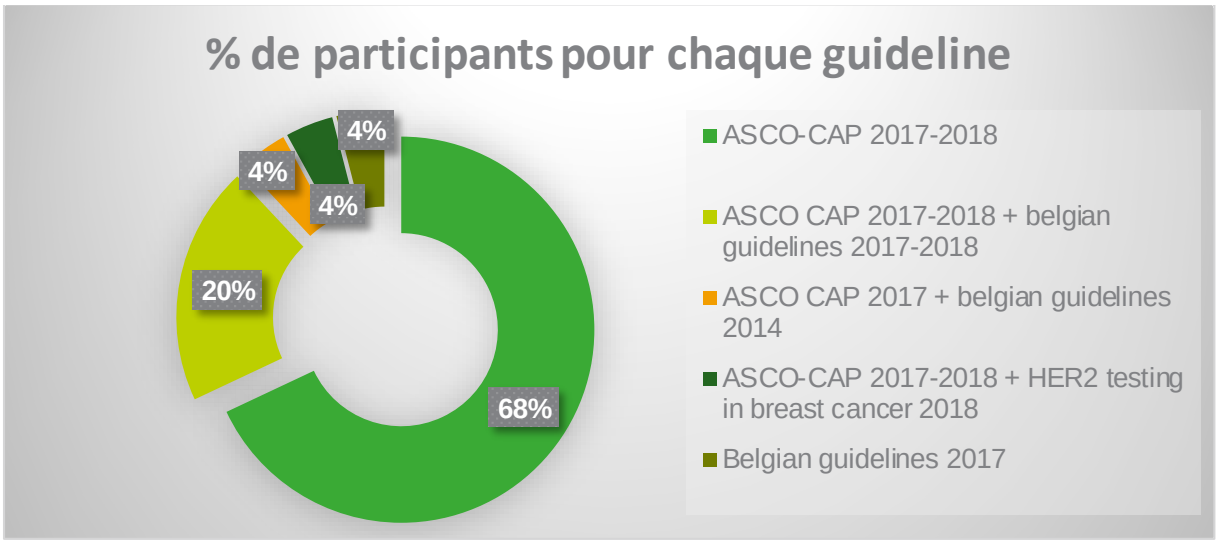
Selon les 25 participants, les méthodes suivantes ont été utilisées pour la détection de l'amplification de HER2 lors de cette enquête :



La méthode la plus utilisée par les laboratoires pour la détection de l'amplification du gène HER2 est la méthode Ventana HER2 Dual ISH.

6. Guidelines utilisées

Selon les 25 participants, les guidelines suivantes ont été utilisées pour la détection de l'amplification de HER2 lors de cette enquête :



Après discussion avec le comité d'experts et une recherche bibliographique, il n'existe pas à notre connaissance de guidelines belges datant de 2017-2018. La recommandation nationale en la matière est de suivre les guidelines ASCO-CAP 2017-2018.

Conclusions sur les performances des laboratoires

Les performances des laboratoires sont satisfaisantes pour cette enquête 2020/2-HER2.

De manière générale, les laboratoires ont répondu correctement pour le cas « non amplifié ». 100% des laboratoires ont détecté l'amplification de HER2 dans l'échantillon « amplifié. ». Pour l'échantillon équivoque, le consensus a indiqué un échantillon « non amplifié ». Un laboratoire a réalisé une faible performance sur cet échantillon en l'ayant donc indiqué comme « amplifié ».

Les laboratoires n'ayant pu déterminer le statut de HER2 pour les deux cas « non-amplifié » ont déclaré des problèmes techniques ou d'interprétation liés principalement aux échantillons envoyés pour l'enquête et non à la technique utilisée par le laboratoire. Suite aux diverses remarques concernant les échantillons, la firme produisant les échantillons a été contactée.

Nous avons pris le parti d'envoyer pour cette enquête comme pour l'enquête 2020/1 des échantillons réels provenant donc de vrai patients avec de vrai cas cliniques. En effet, les remarques des laboratoires sont souvent dirigées sur les échantillons et le fait qu'ils ne sont pas toujours représentatif à 100 % des échantillons de routine car provenant de lignées cellulaires. Il apparait néanmoins au regard de cette enquête 2020/2 HER2 que des échantillons réels ont toutefois posé des problèmes aux laboratoires.

Concernant l'épaisseur des coupes remise en cause par un laboratoire, il est intéressant de noter que les guidelines pour la FISH recommandent des sections de 4 à 6 µm. Pour cette enquête, des sections de 5 µm ont été utilisée, et sont donc dans la norme. Il apparait toutefois que des laboratoires utilisent parfois des sections d'épaisseur beaucoup plus faible de l'ordre de 2-3 µm. Un article publié dans *Scientific Report* en 2019 indique néanmoins que l'épaisseur des coupes a un impact sur l'analyse FISH et que des sections de plus faibles épaisseurs peuvent mener à un plus haut taux de faux-négatif (Yu J. *et al*, Sci Rep, 2019).

Après discussion avec le comité d'experts, il a été décidé d'envoyer des coupes de 4µm d'épaisseur pour le cycle 2021.

EGFR-RAS

Echantillons

a. EGFR

Suite à l'appel d'offre réalisé dans le cadre de la constitution d'un cahier de charge, les échantillons artificiels EGFR ont été fournis par la firme Elitech Benelux située à Sint-Martens-Latem, Belgique. Ceux-ci ont finalement fait appel à la firme Horizon Discovery Ltd-Waterbeach, United Kingdom pour la production des échantillons suite à la crise du COVID-19.

Les échantillons sont fournis avec un certificat garantissant la présence ou l'absence de la mutation ainsi que la fréquence allélique de la mutation.

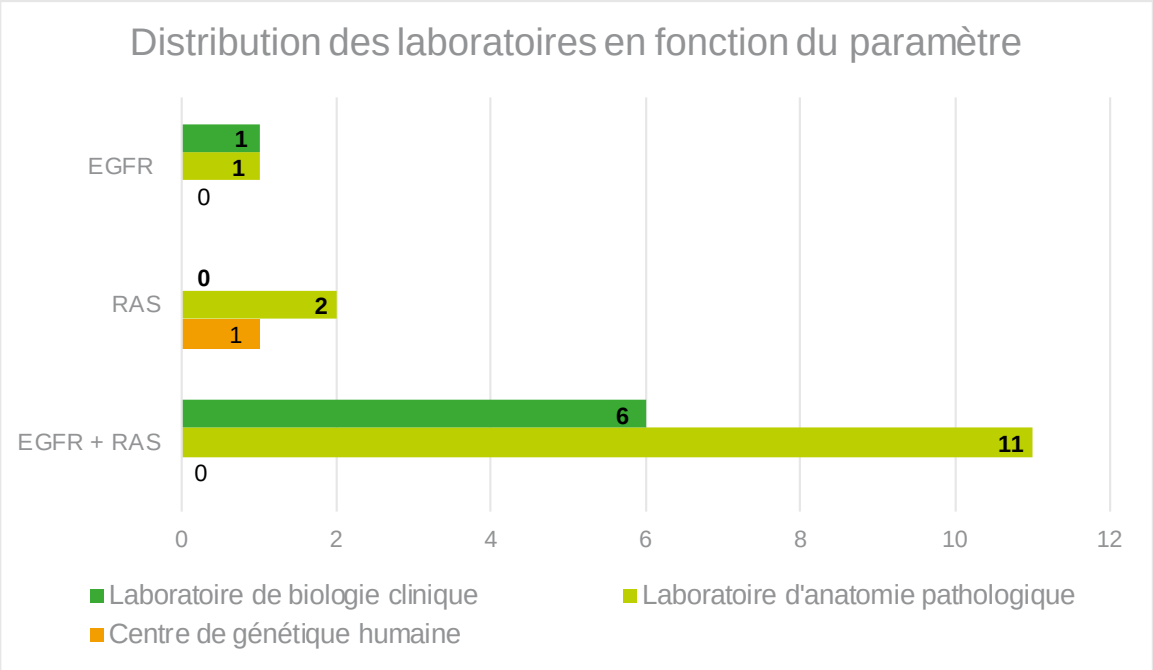
b. RAS

Suite à l'appel d'offre réalisé dans le cadre de la constitution d'un cahier de charge, les échantillons artificiels RAS ont été fournis par la firme Amplitech située à Compiègne, France qui est un revendeur des échantillons produits par Horizon Discovery Ltd-Waterbeach, United Kingdom.

Les échantillons sont fournis avec un certificat garantissant la présence ou l'absence de la mutation ainsi que la fréquence allélique de la mutation.

Participation

22 laboratoires se sont inscrits pour l'enquête EGFR-RAS. La distribution des laboratoires inscrits en fonction des paramètres s'effectue comme suit :



Les 19 laboratoires inscrits pour le paramètre EGFR ont répondu. 19 Laboratoires inscrits sur 20 ont répondu pour le paramètre RAS, un laboratoire ayant fait une demande de second envoi tardif.

Résultats

a. EGFR

Les laboratoires ont reçu deux tubes contenant chacun une section FFPE de 15 µm. Il leur était demandé de rechercher la présence de la mutation EGFR T790M par des méthodes moléculaires pour chacun des échantillons ainsi que la méthode utilisée et la fréquence allélique si déterminée. Il leur était aussi demandé d'indiquer si d'autres mutations que celle EGFR T790M avait été détectées.

1. Résultats par échantillon

Echantillon	Résultats attendus	Résultats encodés	Nombre de laboratoires (%)
ET-1	NM_005228.5(EGFR):c.2369C>T (p.Thr790Met) DETECTEE	DETECTEE	19/19 (100)
		NON DETECTEE	0
		PAS DETERMINE	0
ET-2	NM_005228.5(EGFR):c.2369C>T (p.Thr790Met) NON DETECTEE	DETECTEE	0
		NON DETECTEE	19/19 (100)
		PAS DETERMINE	0

2. Résultats par laboratoire

		ET-1	Autres mutations détectées							
Lab	**Méthodes utilisées**	**NM_005228.5(EGFR):c.2369C>T (p.Thr790Met)**	NM_005228.5(EGFR):c.2573T>G (p.Leu858Arg)	NM_005228.5(EGFR):c.2155G>A (p.Gly719Ser)	NM_004333.6(BRAF):c.1799_1800delinsAA (p.Val600Glu)	NM_006218.4(PIK3CA):c.3140A>G (p.His1047Arg)	ALK c.3980A>G (p.Tyr1327Cys)	NM_000059.3(BRCA2):c.5351del (p.Asn1784fs)	BAP1 c.1564c>A (p.Pro522Thr)	FGFR1 c.449C>T (p.Pro150Leu)
1	Idylla EGFR Mutation assay	DETECTEE								
2	NGS Roche Nimblegen Seq Cap EZ choice custom panel	DETECTEE (AF:50%)								
3	NGS ampliseq custom design	DETECTEE (AF:41.8%)			DETECTEE (AF:65.6%)	DETECTEE (AF:43.7%)				
4	NGS agilent SureMASTR Tumor Hotspot	DETECTEE (AF:49%)			DETECTEE (AF:67%)	DETECTEE (AF:49%)	DETECTEE (AF:50%)			
5	NGS Qiagen QiAActAIT UMI FFPE	DETECTEE (AF:44%)			DETECTEE (AF:68%)	DETECTEE (AF:47%)				
6	NGS Illumina Ampliseq for Illumina focus panel	DETECTEE (AF:44%)								
7	Biocartis realtime EGFR detect 2M kit	DETECTEE								
8	NGS Agilent Sure MASTR HOTSPOT	DETECTEE (AF:49.1%)			DETECTEE (AF:66%)	DETECTEE (AF:48%)				
9	NGS Thermo Fischer Oncomine Focus Assay	DETECTEE (AF:52%)			DETECTEE (AF:64%)	DETECTEE (AF:51%)				
10	NGS home made Seq Cap VATU	DETECTEE (AF:49%)								

11	NGS Illumina Next Seq custom panel	DETECTEE (AF:46%)			DETECTEE (AF:66%)	DETECTEE (AF:47%)	DETECTEE (AF:49%)		DETECTEE (AF:49%)	DETECTEE (AF:50%)
12	Bio rad DDPCR EGFR mutation assay et Bio Rad DDPCR EGFR exon 19 deletion screening	DETECTEE (AF:49.9%)								
13	NGS Qiagen Qiaseq Targeted DNA custom panel	DETECTEE (AF:43.8%)			DETECTEE (AF:67%)	DETECTEE (AF:51.3%)				
14	NGS Thermo Fischer Ampliseq colon and lung panel	DETECTEE (AF:49%)								
15	Idylla EGFR Mutation assay	DETECTEE								
16	NGS illumina/qiagen Qiaseq custom panel	DETECTEE (AF:48%)			DETECTEE (AF:69%)	DETECTEE (AF:49%)		DETECTEE (AF:46%)		
17	Idylla EGFR Mutation assay	DETECTEE								
18	NGS Ampliseq Ion Torrent PGM	DETECTEE (AF:53%)			DETECTEE (AF:67%)	DETECTEE (AF:50%)				
19	Idylla EGFR Mutation assay	DETECTEE								

		ET-2	Autres mutations détectées							
Lab	**Méthodes utilisées**	**NM_005228.5(EGFR):c.2369C>T (p.Thr790Met)**	NM_005228.5(EGFR):c.2573T>G (p.Leu858Arg)	NM_005228.5(EGFR):c.2155G>A (p.Gly719Ser)	NM_004333.6(BRAF):c.1799_1800delinsAA (p.Val600Glu)	NM_006218.4(PIK3CA):c.3140A>G (p.His1047Arg)	ALK c.3980A>G (p.Tyr1327Cys)	NM_000059.3(BRCA2):c.5351del (p.Asn1784fs)	BAP1 c.1564c>A (p.Pro522Thr)	FGFR1 c.449C>T (p.Pro150Leu)
1	Idylla EGFR Mutation assay	NON DETECTEE								
2	NGS Roche Nimblegen Seq Cap EZ choice custom panel	NON DETECTEE	DETECTEE (AF:3.6%)							
3	NGS ampliseq custom design	NON DETECTEE			DETECTEE (AF:67%)	DETECTEE (AF:51.2%)				
4	NGS agilent SureMASTR Tumor Hotspot	NON DETECTEE			DETECTEE (AF:68%)	DETECTEE (AF:52%)	DETECTEE (AF:52%)			
5	NGS Qiagen QiAActAIT UMI FFPE	NON DETECTEE			DETECTEE (AF:68%)	DETECTEE (AF:47%)				
6	NGS Illumina Ampliseq for Illumina focus panel	NON DETECTEE								
7	Biocartis realtime EGFR detect 2M kit	NON DETECTEE								
8	NGS Agilent Sure MASTR HOTSPOT	NON DETECTEE			DETECTEE (AF:68.4%)	DETECTEE (AF:49.1%)				
9	NGS Thermo Fischer Oncomine Focus Assay	NON DETECTEE			DETECTEE (AF:64%)	DETECTEE (AF:44%)				
10	NGS home made Seq Cap VATU	NON DETECTEE		DETECTEE (AF:31%)						
11	NGS Illumina Next Seq custom panel	NON DETECTEE			DETECTEE (AF:67%)	DETECTEE (AF:48%)	DETECTEE (AF:49%)		DETECTEE (AF:49%)	DETECTEE (AF:46%)

12	Bio rad DDPCR EGFR mutation assay et Bio Rad DDPCR EGFR exon 19 deletion screening	NON DETECTEE								
13	NGS Qiagen Qiaseq Targeted DNA custom panel	NON DETECTEE			DETECTEE (AF:66.5%)	DETECTEE (AF:47.2%)				
14	NGS Thermo Fischer Ampliseq colon and lung panel	NON DETECTEE								
15	Idylla EGFR Mutation assay	NON DETECTEE								
16	NGS illumina/qiagen Qiaseq custom panel	NON DETECTEE			DETECTEE (AF:69%)	DETECTEE (AF:50%)		DETECTEE (AF:47%)		
17	Idylla EGFR Mutation assay	NON DETECTEE								
18	NGS Ampliseq Ion Torrent PGM	NON DETECTEE			DETECTEE (AF:68%)	DETECTEE (AF:47%)				
19	Idylla EGFR Mutation assay	NON DETECTEE								

3. Réponses aux questions supplémentaires

A la question, « Quel est le niveau d'indications cliniques requis par votre laboratoire pour effectuer un test de dépistage de mutations EGFR ? », les laboratoires participants ont déclaré :

Indications cliniques	Nombre de participants
Assez pour l'éligibilité à une thérapie EGFR	4
Le patient a un NSCLC	8
Assez pour l'éligibilité à une thérapie EGFR et le patient a un NSCLC	5
Pas d'indication clinique demandée	2

A la question, « Pour des échantillons de type FFPE, votre laboratoire prévoit-il une évaluation de la coupe H&E par un pathologiste préalablement à l'analyse moléculaire ?», les laboratoires participants ont déclaré :

Evaluation H&E coupe EGFR	Nombre de participants
OUI	19
NON	0

A la question, « Votre laboratoire utilise-t-il une technique de micro/macrodissection pour enrichir le contenu cellulaire préalablement à l'analyse ? », les laboratoires participants ont déclaré :

Macro/microdissection	Nombre de participants
OUI micro ou macrodissection	14
OUI si nécessaire	1
OUI, macrodissection si TC<20%	1
OUI, macrodissection si TC<10%	1
OUI, micro et macrodissection	1
NON	1

A la question, « Quels types d'échantillons sont-ils acceptés par votre laboratoire pour le dépistage de mutations EGFR ?», les laboratoires participants ont déclaré :

Type d'échantillons utilisé	Nombre de participants *
Coupe FFPE	17
Cytologique bloc (biopsie incluses)	11
Cytologique en milieu liquide	2
Cytologique frottis	2
Tissu frais	2
Tissu congelé	2
ADN circulant	1

*Le nombre de laboratoires est supérieur à 19 car plusieurs réponses sont possibles par laboratoires.

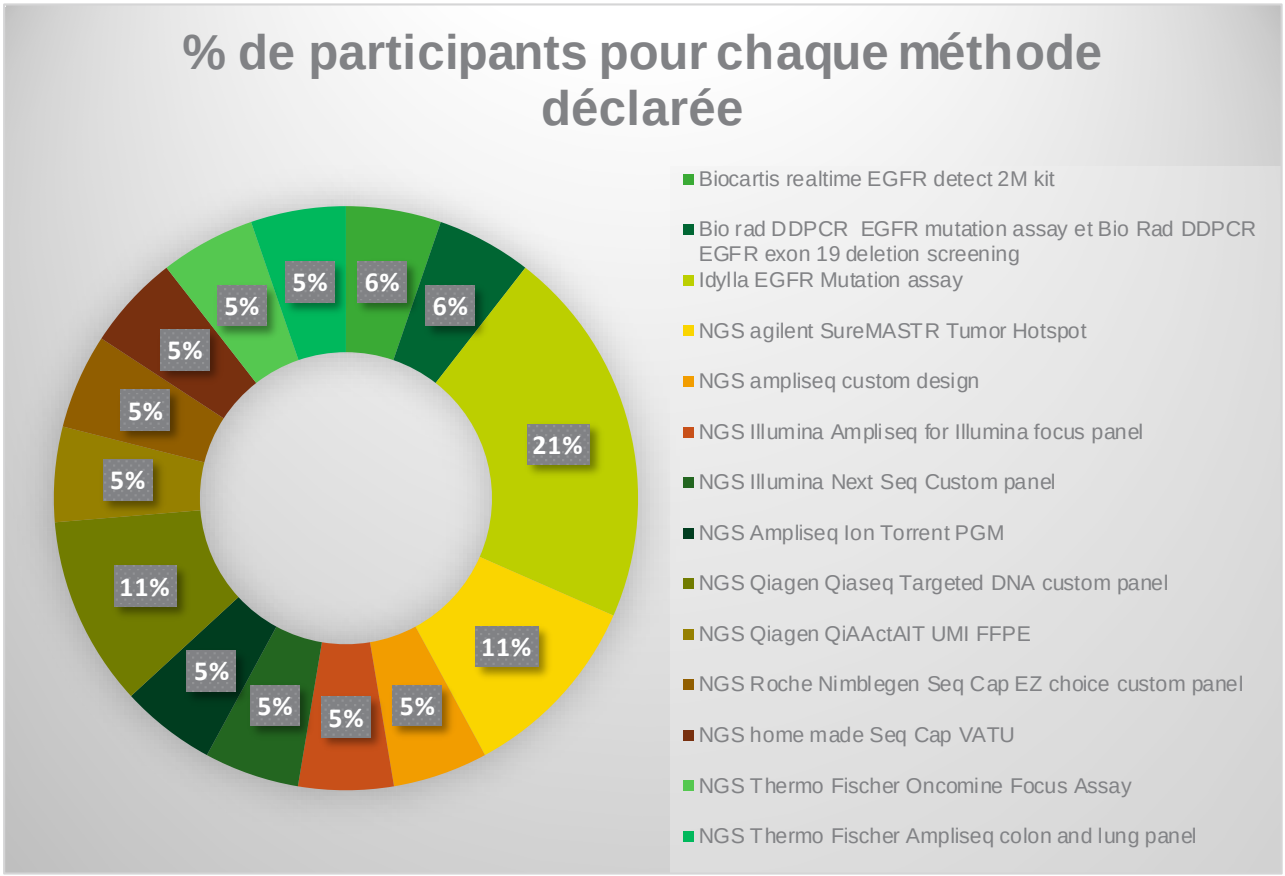
A la question, « En routine, quelles sont les mutations rapportées par votre laboratoire ? », les laboratoires participants ont déclaré :

Mutations EGFR rapportées en routine	Nombre de participants
exon 18, exon 19, (in frame del) exon 20 (S768I), exon 20 (T790M), exon 20 (ins/del), exon 21 (L858R), exon 21 (L861Q)	7
exon 18, exon 19, (in frame del) exon 20 (S768I), exon 20 (T790M) exon 21 (L858R), exon 21 (L861Q)	1
exon 18, exon 19, exon 20 (S768I), exon 20 (T790M), exon (ins/del), exon 21 (L858R), exon 21 (L861Q) + toutes les mutations 18-21 + CNV	1
Toutes mutations des exons 18-21	7
toutes mutations dans les exons 2, 3,4, 6, 7, 8, 12, 13, 15, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25	1
tous les exons	1
toutes les mutations des exons 18 à 21 et celles cliniquement relevantes	1

4. Commentaires

- Tous les laboratoires ont répondu correctement pour la détection de la mutation EGFR T790M dans les deux échantillons.
- La fréquence allélique indiquée par le fournisseur pour l'échantillon ET-1 est de 50% ce qui correspond avec la fréquence allélique déclarée par les laboratoires.
- 10 laboratoires sur les 13 utilisant la technique NGS ont indiqué la présence d'autres mutations. Les mutations BRAF V600E et PIK3CA H1047R sont les plus souvent détectées avec une fréquence allélique moyenne de 66.6% et 48.4% respectivement pour l'échantillon ET-1 et avec une fréquence allélique moyenne de 67.2 % et 48.55% respectivement pour l'échantillon ET-2.

5. Méthodes utilisées



Les méthodes les plus utilisées pour la détection de mutations du gène EGFR sont le NGS et l'Idylla EGFR mutation assay.

b. RAS

Les laboratoires ont reçu quatre tubes contenant chacun 1 copeau FFPE (15 µm) correspondant aux cas cliniques 1, 2, 3 et 4. Il leur était demandé de rechercher la présence de mutations des gènes KRAS et NRAS par des méthodes moléculaires. Il leur était également demandé de préciser la fréquence allélique de la mutation (si déterminée) ainsi que la méthode utilisée.

1. Résultats par échantillon

Echantillon	Résultats attendus (AF)	Résultats encodés	Nombre de laboratoires (%)
KRAS-1	NM_004985.5(KRAS):c.35G>T (p.Gly12Val) NON DETECTEE	NON DETECTEE	19/20 (95)
		DETECTEE	0
		NON DETERMINE	1/20 (5)
KRAS-2	NM_004985.5(KRAS):c.35G>T (p.Gly12Val) **(50%)** DETECTEE	NON DETECTEE	0
		DETECTEE	19/20 (95)
		NON DETERMINE	1/20 (5)
NRAS-3	NM_002524.5(NRAS):c.182A>G (p.Gln61Arg) NON DETECTEE	NON DETECTEE	19/20 (95)
		DETECTEE	0
		NON DETERMINE	1/20 (5)
NRAS-4	NM_002524.5(NRAS):c.182A>G (p.Gln61Arg) **(50%)** DETECTEE	NON DETECTEE	0
		DETECTEE	19/20 (95)
		NON DETERMINE	1/20 (5)

2. Résultats par laboratoire

		KRAS-1	KRAS-2	NRAS-3	NRAS-4
Labo.	**Méthodes utilisées**	NM_004985.5(KRAS):c.35G>T (p.Gly12Val)	NM_004985.5(KRAS):c.35G>T (p.Gly12Val)	NM_002524.5(NRAS):c.182A>G (p.Gln61Arg)	NM_002524.5(NRAS):c.182A>G (p.Gln61Arg)
1	NGS Roche Nimblegen Seq Cap EZ choice custom panel	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :57%)	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :54%)
2	NGS illumina custom panel	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :50.3%)	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :49%)
3	NGS agilent SureMASTR Tumor Hotspot	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :51%)	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :51%)
4	NGS Qiagen QiAActAIT UMI FFPE	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :58%)	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :45%)
5	NGS Illumina Ampliseq for Illumina focus panel	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :48%)	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :49%)
6	**Idylla KRAS mutation test**	NON DETECTEE	DETECTEE	NON DETECTEE	DETECTEE
7	NGS Agilent Sure MASTR HOTSPOT	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :50.5%)	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :47,8%)
8	Idylla KRAS mutation test et Idylla NRAS-BRAF mutation test	NON DETECTEE	DETECTEE	NON DETECTEE	DETECTEE
9	NGS home made Seq Cap VATU	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :50%)	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :52%)
10	Idylla KRAS mutation test et Idylla NRAS-BRAF mutation test	NON DETECTEE	DETECTEE	NON DETECTEE	DETECTEE
11	NGS Illumina Next Seq custom panel	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :48%)	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :48%)
12	NGS Qiagen Qiaseq Targeted DNA custom panel	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :38.1%)	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :49.6%)
13	NGS Thermofischer Scientific Ion Ampliseq colon and lung panel V2	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :52%)	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :49%)

14	Idylla KRAS mutation test et Idylla NRAS-BRAF mutation test	NON DETECTEE	DETECTEE	NON DETECTEE	DETECTEE
15	NGS illumina/qiagen Qiaseq custom panel	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :36%)	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :45%)
16	Idylla KRAS mutation test	NON DETECTEE	DETECTEE	NON DETECTEE	DETECTEE
17	NGS Ampliseq Ion Torrent PGM	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :40%)	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :51%)
18	Idylla KRAS mutation test et Idylla NRAS-BRAF mutation test	NON DETECTEE	DETECTEE	NON DETECTEE	DETECTEE
19	NGS Roche Kapa Hyper Cap panel	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :51%)	NON DETECTEE	DETECTEE (AF :48%)
20	NA	NON DETERMINE	NON DETERMINE	NON DETERMINE	NON DETERMINE

3. Réponses aux questions supplémentaires

A la question, « En routine, votre laboratoire réalise-t-il le dépistage KRAS/NRAS sur des lésions primaires ou métastatiques uniquement ou sur les deux types ?», les laboratoires participants ont déclaré :

Dépistage en routine sur :	Nombre de participants
Lésions primaires	0
Lésions métastatiques	4
Les deux	15

A la question, « En routine, quelles sont les mutations KRAS rapportées par votre laboratoire ? », les laboratoires participants ont déclaré :

Mutations KRAS rapportées en routine	Nombre de participants
Codon 12, 13, 59, 61, 117 et 146 uniquement	6
Toutes mutations dans l'exon 2, l'exon 3 et l'exon 4 (autres que codons 12, 13, 61, 146)	4
codon 12, 13, 59, 61, 117, 146 + autres mutations de l'exon 2	1
Toutes mutations dans l'exon 2, l'exon 3 et l'exon 4	8

A la question, « En routine, quelles sont les mutations NRAS rapportées par votre laboratoire ? », les laboratoires participants ont déclaré :

Mutations NRAS rapportées en routine	Nombre de participants
Codon 12, 13, 61	4
Toutes mutations dans l'exon 2 et exon 3	7
Toutes mutations dans l'exon 2, l'exon 3 (autres que codons 12, 13, 61)	5
codon 12, 13, 59, 61,	1
codon 12, 13, 59, 61 + exon 4	1
codon 12, 13, 59, 61, 117, 146	1

4. Commentaires

- Le laboratoire n'ayant pu répondre à l'enquête (non déterminé) a déclaré un problème technique à savoir que les échantillons envoyés n'ont pas passé le QC post librairies. Les 19 autres laboratoires ont donné une réponse correcte pour les 4 échantillons.

- La fréquence allélique indiquée par le fournisseur pour les échantillons KRAS-2 et NRAS-4 est de 50% ce qui correspond avec la fréquence allélique déclarée par les laboratoires.

- Les laboratoires rapportent de manière générale toutes les mutations des exons 2,3 et 4 du gène KRAS et des exons 2 et 3 du gène NRAS.

- 79% des laboratoires ont déclaré effectuer l'analyse sur des lésions primaires aussi bien que métastatiques.

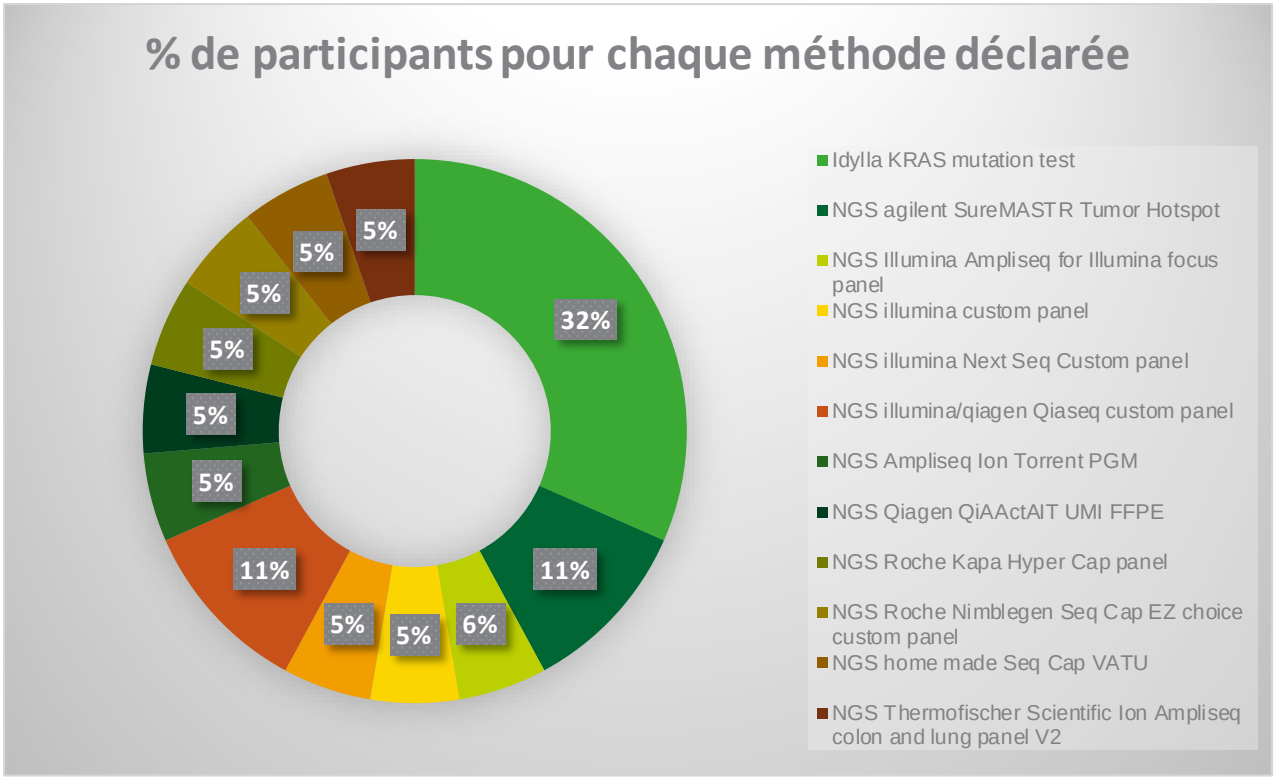
- Il est à noter qu'un laboratoire nous a déclaré utiliser la technique Idylla KRAS mutation aussi pour la détection du gène NRAS. Ce laboratoire ne nous a pas répondu lorsque nous lui avons demandé des précisions sur cette déclaration.

- Certains laboratoires ont indiqué en commentaire que le statut KRAS négatif était associé avec une réponse positive aux anti-EGFR dans le cadre des cancers colorectaux métastatiques sous réserve néanmoins de la présence d'autres mutations de type NRAS et BRAF. Alors que sa présence est associée à une résistance aux anti-EGFR. De même pour le gène NRAS.

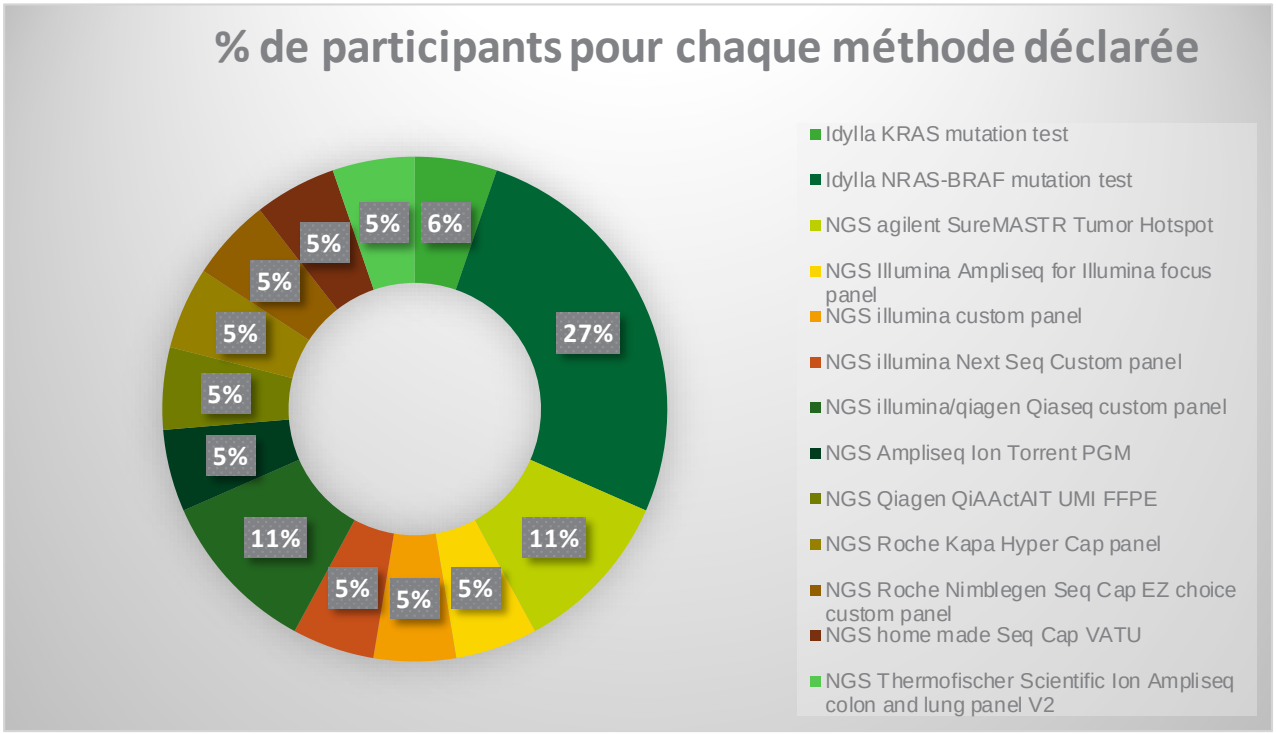
- Un laboratoire nous a indiqué qu'en routine, le cas clinique ne rentrait pas dans les critères pour une demande d'analyse NGS. Celui-ci effectue le dépistage seulement sur des lésions métastatiques.

5. Méthodes utilisées

5.1 KRAS



5.2 NRAS



Les méthodes les plus utilisées pour la détection de mutations du gène KRAS sont le NGS et l'Idylla KRAS mutation test.

Les méthodes les plus utilisées pour la détection de mutations du gène NRAS sont le NGS et l'Idylla NRAS-BRAF mutation test.

Conclusions sur les performances des laboratoires

Les performances des laboratoires sont très satisfaisantes pour cette enquête 2020/3-EGFR/RAS.

Tous les laboratoires ont répondu correctement pour la détection de la mutation EGFR T790M.

Seul un laboratoire n'a pu déterminer la présence des mutations KRAS G12V et NRAS Q61R suite à un problème technique et à une demande de second envoi trop tardif.

Un laboratoire nous a demandé d'envoyer des coupes FFPE de 5 µm d'épaisseur montées sur slide en double exemplaire en lieu et place des copeaux de 15 µm envoyés. Néanmoins, il n'est pas toujours possible d'obtenir ce type de coupe notamment lorsque ceux-ci doivent être de vrai échantillons patients. Pour cette enquête, le choix s'est porté sur des échantillons artificiels sachant que les deux enquêtes précédentes (2020/1 et 2020/2) comportaient déjà des échantillons patients. Nous avons alors signifié au laboratoire que si nos échantillons ne rentrait pas dans ses critères d'acceptation en routine, il pouvait ne pas faire l'analyse mais devait nous spécifier cela. Celui-ci nous a pourtant renvoyé des résultats qui se sont avérés corrects.

Pour le cycle 2021, les échantillons RAS seront effectivement des coupes FFPE de 5 µm d'épaisseur provenant d'échantillons de patients. Par contre, cela n'a pas été possible d'en trouver pour le gène EGFR. Il a donc été décidé d'envoyer des échantillons artificiels mais de persévérer dans la recherche d'échantillons patients dans le cadre du cycle 2022.

MYELOIDE: JAK2/BCR-ABL/FLT3-TP53

Echantillons

a. JAK2 V617F

Suite à l'appel d'offre réalisé dans le cadre de la constitution d'un cahier de charge, les échantillons JAK2 ont été fournis par la firme Amplitech située à Compiègne, France qui est un revendeur des échantillons produits par Horizon Discovery Ltd-Waterbeach, United Kingdom. Les échantillons sont fournis avec un certificat garantissant la présence ou l'absence de la mutation ainsi que la fréquence allélique de la mutation.

b. BCR-ABL

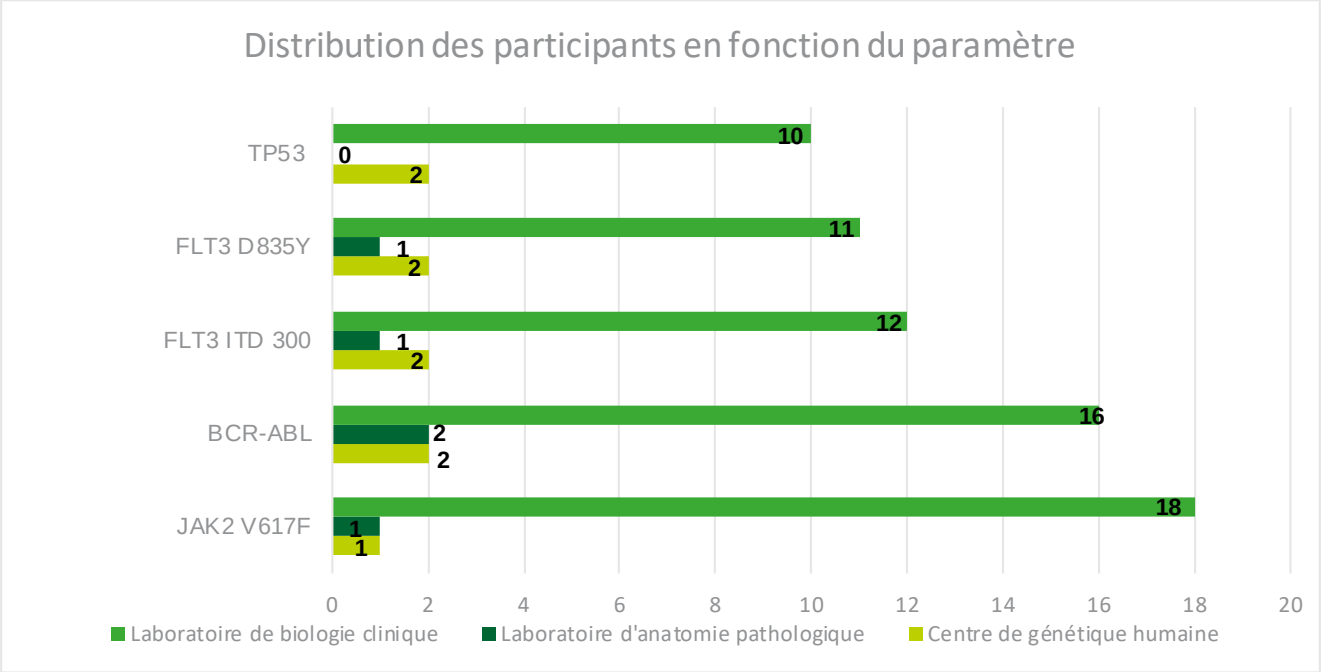
Suite à l'appel d'offre réalisé dans le cadre de la constitution d'un cahier de charge, les échantillons BCR-ABL1 ont été fournis par la firme Elitech Benelux située à Sint-Martens-Latem, Belgique. Les échantillons sont fournis avec un certificat garantissant la présence ou l'absence du gène de fusion BCR-ABL et le nombre de copies ABL.

c. FLT3-TP53

Les échantillons FLT3-TP53 ont été fournis par la firme Amplitech située à Compiègne, France qui est un revendeur des échantillons produits par Horizon Discovery Ltd-Waterbeach, United Kingdom. L'échantillon contient différentes mutations pour différents gènes d'intérêts impliqués dans les leucémies myéloïdes. Les échantillons sont fournis avec un certificat garantissant la présence ou l'absence de la mutation ainsi que la fréquence allélique de la mutation.

Participation

24 laboratoires se sont inscrits pour l'enquête JAK2/BCR-ABL/FLT3-TP53. La distribution des participants en fonction des paramètres s'effectue comme suit :



Sur les 24 laboratoires inscrits tout paramètres confondus nous avons eu :

- Un centre de génétique qui s'est désinscrit après envoi des échantillons car ils ont remarqué en interne un doublon d'inscription avec leur laboratoire de biologie clinique qui s'était lui-même inscrit.
- Un laboratoire d'anatomie pathologique qui s'était inscrit pour BCR-ABL par erreur.

- Un laboratoire de biologie clinique qui n'a pu participer à l'enquête pour le paramètre JAK2 suite au COVID-19. La mise en place de leur technique in-house ayant pris du retard.
- Un laboratoire de biologie clinique qui s'était inscrit pour le paramètre TP53 mais n'a pas répondu car il a effectué le contrôle via un autre fournisseur d'EEQ.

- 14 laboratoires qui n'ont pu participer à l'enquête pour le paramètre BCR-ABL t(9 ;22) car leur analyse est réalisée en routine sur de l'ARN ou de l'ADNc et non de l'ADN génomique comme envoyé.

De plus, 3 laboratoires de biologie clinique ont répondu pour le paramètre TP53 alors qu'ils n'étaient pas initialement inscrits et un laboratoire de biologie clinique a répondu pour le paramètre FLT3 D835Y alors qu'il n'était pas inscrit.

Résultats

a. JAK2 V617F

Les laboratoires ont reçu deux tubes contenant chacun 20 µl d'ADN dans du Tris-EDTA (concentration en ADN : 50 ng/µl). Nous leur avons demandé de rechercher la présence de la mutation JAK2 V617F par des méthodes moléculaires pour chacun des échantillons.

1. Résultats par échantillon

Echantillon	Résultats attendus (AF)	Résultats encodés	Nombre de laboratoires (%)
JK-1	NM_004972.3(JAK2):c.1849G>T (p.Val617Phe) NON DETECTEE	DETECTEE	0
		NON DETECTEE	19/19 (100)
		NON DETERMINE	0
JK-2	NM_004972.3(JAK2):c.1849G>T (p.Val617Phe) **(50%)** DETECTEE	DETECTEE	19/19 (100)
		NON DETECTEE	0
		NON DETERMINE	0

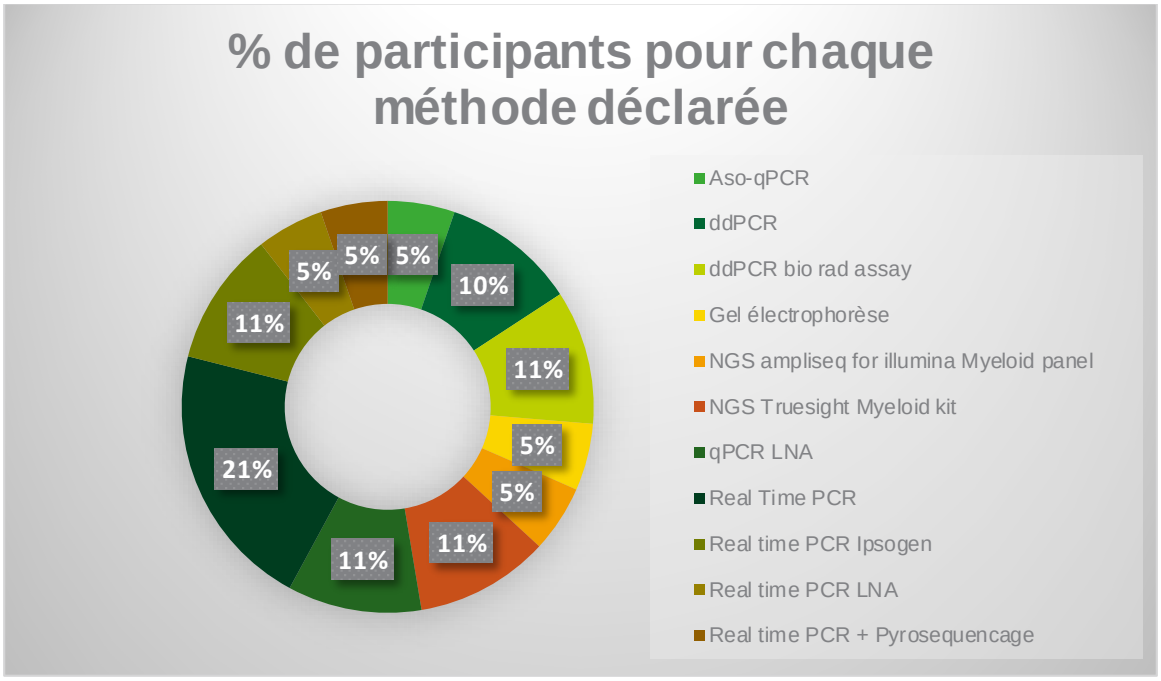
2. Résultats par laboratoire

		JK-1	JK-2
Labo.	**Méthodes utilisées**	NM_004972.3(JAK2):c.1849G>T (p.Val617Phe)	NM_004972.3(JAK2):c.1849G>T (p.Val617Phe)
1	NGS Truesight Myeloid kit	NON DETECTEE	DETECTEE
2	ddPCR mutation assay bio rad	NON DETECTEE	DETECTEE
3	Real Time PCR	NON DETECTEE	DETECTEE
4	Gel électrophorèse	NON DETECTEE	DETECTEE
5	Real time PCR Ipsogen JAK2	NON DETECTEE	DETECTEE
6	Real time PCR	NON DETECTEE	DETECTEE
7	qPCR LNA	NON DETECTEE	DETECTEE
8	LNA Real time PCR	NON DETECTEE	DETECTEE
9	In house real time PCR	NON DETECTEE	DETECTEE
10	NGS Trusight Myeloid kit	NON DETECTEE	DETECTEE
11	In house TaqMan real-time PCR	NON DETECTEE	DETECTEE
12	ddPCR	NON DETECTEE	DETECTEE
13	Aso-qPCR	NON DETECTEE	DETECTEE
14	LNA-qPCR	NON DETECTEE	DETECTEE
15	Real time PCR Ipsogen JAK2	NON DETECTEE	DETECTEE
16	NGS ampliseq for illumina Myeloid panel	NON DETECTEE	DETECTEE
17	PCR en temps réel + Pyrosequencage	NON DETECTEE	DETECTEE
18	ddPCR bio rad assay	NON DETECTEE	DETECTEE
19	ddPCR	NON DETECTEE	DETECTEE

3. Commentaires

- L'ensemble des laboratoires ont répondu correctement à l'enquête pour ce paramètre.

4. Méthodes utilisées



Les méthodes les plus utilisées pour la détection de la mutation JAK2 V617F sont la technique Real time PCR (45%), la technique ddPCR (22%) ainsi que la technique qPCR (16%).

b. BCR-ABL

Les laboratoires ont reçu deux tubes contenant chacun 50 µl d'ADN génomique dans du Tris-EDTA (concentration en ADN : 20 ng/µl). Nous leur avons demandé de rechercher la présence de la translocation BCR-ABL t(9 ;22) (major and minor breakpoints) par des méthodes moléculaires pour chacun des échantillons.

1. Résultats par échantillon

Echantillon	Résultats attendus	Résultats encodés	Nombre de laboratoires (%)
BA-1	t(9 ;22) DETECTEE	DETECTEE	3/4 (75)
		NON DETECTEE	1/4 (25)
		NON DETERMINE	0
BA-2	t(9 ;22) NON DETECTEE	DETECTEE	0
		NON DETECTEE	3/4 (75)
		NON DETERMINE	1/4 (25)

2. Résultats par laboratoire

		BA-1	BA-2
Laboratoire	**Méthodes utilisées**	**t(9 ;22)**	**t(9 ;22)**
1*	RT-PCR- selon EAC protocol (Gabert et al. Leukemia 2003) avec LC480 Roche	DETECTEE	NON DETECTEE
2**	Real time PCR TaqMan probes	NON DETECTEE	NON DETECTEE
3***	RT-PCR	DETECTEE	NON DETERMINE
4	RT-PCR- GeneXpert avec kit BCR-ABL Ultra -Cepheid	DETECTEE	NON DETECTEE

*Ce laboratoire a émis l'hypothèse que les échantillons envoyés étaient de l'ADN plasmidique au vu de leurs échantillons de standardisation inclus en routine dans chaque analyse.

**Ce Laboratoire a émis des résultats sous réserve au vu du faible nombre de copies ABL détectées dans l'échantillons BA-1.

***Ce laboratoire a émis des résultats sous réserve car l'ADN génomique n'est pas validé en routine.

3. Commentaires

- 14 laboratoires nous ont informé lors de la réception des échantillons ne pouvoir effectuer l'analyse sur de l'ADN génomique. L'analyse dans leur laboratoire se faisant à partir d'ADN complémentaire ou d'ARN.

- Un laboratoire a émis des réserves quant à sa réponse. En effet, un échantillon de type ADN génomique n'est pas validé pour cette analyse. De plus, le laboratoire nous a indiqué qu'il fallait normalement 10,000 copies ABL pour une affirmation correcte hors celui-ci n'en a détecté que 2737 copies dans l'échantillon BA-1.

- Un autre laboratoire a aussi émis une réserve à propos du résultat rendu à cause du faible nombre de copies ABL détectées par rapport à la norme. Cela ne leur permet donc pas d'émettre une interprétation correcte.

4. Méthodes utilisées

La méthode la plus utilisée par les laboratoires est la RT-PCR.

c. FLT3-TP53

Les laboratoires ont reçu un tube contenant 20 µl d'ADN dans du Tris-EDTA (concentration en ADN : 25 ng/µl). Nous leur avons demandé de rechercher la présence des mutations FLT3 D835Y ; FLT3 ITD300 ainsi que la présence de mutations du gène TP53 par des méthodes moléculaires selon ce qui est applicable pour leur laboratoire en fonction des prestations pour lesquelles ils s'étaient inscrits.

1. Résultats par échantillon

Echantillon	Résultats attendus (AF)	Résultats encodés	Nombre de laboratoires (%)
MYE	FLT3 ITD300 **(4.70%)** DETECTEE	DETECTEE	6/14 (42.9)
		NON DETECTEE	8/14 (57.1)
		NON DETERMINE	0
	NM_004119.3(FLT3):c.2503G>T (p.Asp835Tyr) **(4.97%)** DETECTEE	DETECTEE	13/14 (92.9)
		NON DETECTEE	1/14 (7.1)
		NON DETERMINE	0
	NM_000546.5(TP53):c.722C>T (p.Ser241Phe) **(5.20%)** DETECTEE	DETECTEE	12/13 (92.3)
		NON DETECTEE	1/13 (7.7)
		NON DETERMINE	0

Autres TP53 mutations détectées :

Mutations détectées	Nombre de participants
NM_000546.5(TP53):c.1101-2A>C	10
NM_000546.6(TP53):c.215C>G (p.Pro72Arg)	1

2. Résultats par laboratoire

2.1 FLT3 ITD et FTL3 D835Y

			MYE	
Labo.	**Méthodes utilisées FLT3 ITD**	**Méthodes utilisées FLT3 D835Y**	FLT3 ITD300	NM_004119.3(FLT3):c.2503G>T (p.Asp835Tyr)
1	NGS Truesight Myeloid kit		**NON DETECTEE**	DETECTEE (AF: 5.4%)
2	conditions and primers from WG Molecular Diagnostics	PCR multiplexe and Capillary Electrophoresis Assay	**NON DETECTEE**	DETECTEE
3	electrophorèse capillaire + NGS		DETECTEE (AF: 4%)	DETECTEE (AF: 5.2%)
4	PCR electrophorèse capillaire	NGS custom panel Qiagen	**NON DETECTEE**	DETECTEE (AF: 7.1%)
5	NGS Miseq Qiaseq targeted custom panel		**NON DETECTEE**	DETECTEE (AF: 4.56%)
6	Capture Based NGS		**NON DETECTEE**	DETECTEE (AF: 4.4%)
7	NGS + PCR Capillary Electrophoresis		DETECTEE (AF: 0.2%)	DETECTEE (AF: 4.9%)
8	Fragment analyse	NGS trusight Myeloid kit	DETECTEE (AF: non déterminée; <20%)	DETECTEE (AF: 5.4%)
9	NGS custom Ampliseq		**NON DETECTEE**	DETECTEE (AF: 4.5%)
10	PCR avec analyse de fragment + NGS		DETECTEE (AF : 4.5%)	DETECTEE (AF: 5.4%)
11	PCR multiplexe + PCR RFLP avec analyse de fragments		DETECTEE (AF : 1.3%)	DETECTEE (AF: 12%)
12	NA		NA	NA
13	NGS ampliseq for illumina Myeloid panel + analyse de fragment		**NON DETECTEE**	DETECTEE (AF: 5%)
14	NGS Archer VP myeloid		DETECTEE	**NON DETECTEE**
15	PCR + analyse de fragment		**NON DETECTEE**	DETECTEE (AF: 7%)

2.2 TP53

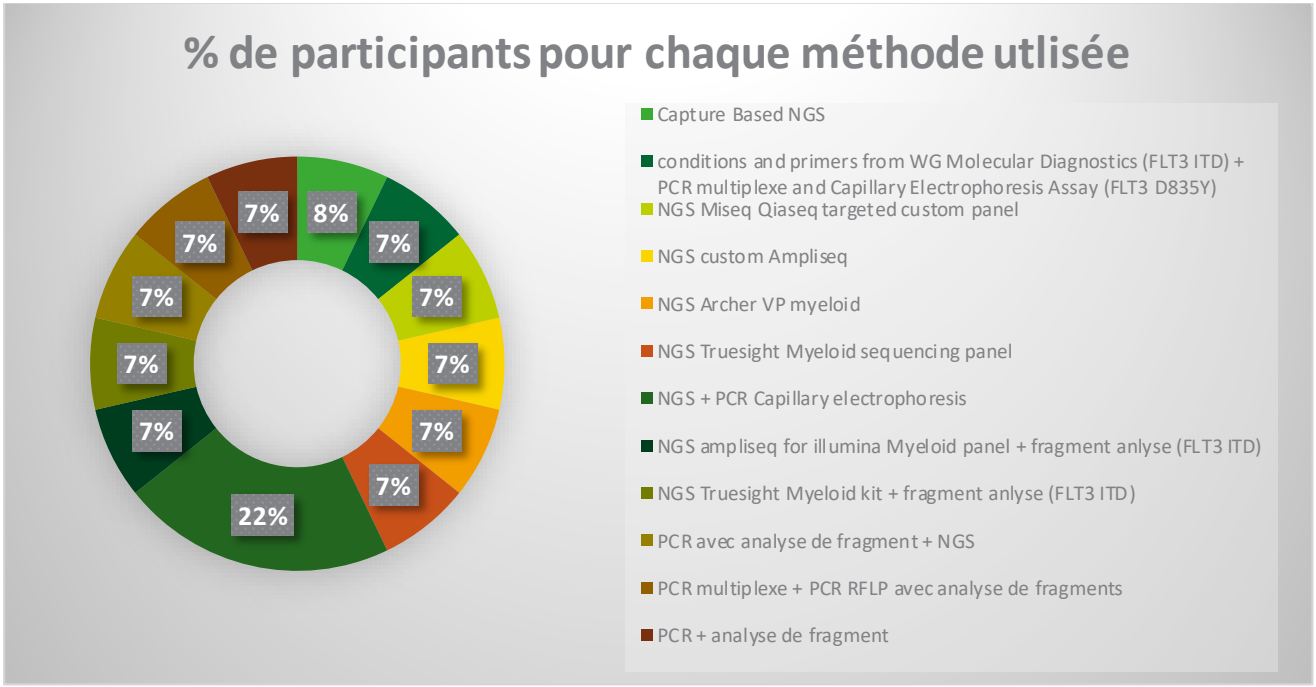
		MYE	Autres mutations détectées	
Labo.	**Méthodes utilisées**	NM_000546.5(TP53):c.722C>T (p.Ser241Phe)	NM_000546.5(TP53):c.1101-2A>C	NM_000546.6(TP53):c.215C>G (p.Pro72Arg)
1	NGS Truesight Myeloid kit	DETECTEE (AF:5.5%)		
2	NON REPONDU			
3	NGS	**NON DETECTEE**	DETECTEE (AF: 6.2%)	
4	NGS custom panel Qiagen	DETECTEE (AF: 5.46%)	DETECTEE (AF: 6.46%)	
5	NGS Miseq Qiaseq targeted custom panel	DETECTEE (AF: 4.69%)		DETECTEE (AF: 92%)
6	Capture Based NGS	DETECTEE (AF: 4.7%)	DETECTEE (AF: 5%)	
7	NGS	DETECTEE (AF: 5.1%)	DETECTEE (AF: 4.9%)	
8	NGS trusight Myeloid kit	DETECTEE (AF: 5.5%)	DETECTEE (AF: 5.1%)	
9	NGS	DETECTEE (AF: 4.3%)	DETECTEE (AF: 5%)	
10	NGS	DETECTEE (AF: 4.3%)	DETECTEE (AF: 4.4%)	
11	Sure Mastr CLL NGS	DETECTEE (AF: 6%)	DETECTEE (AF: 5%)	
12	NGS Qiagen Gene reader kit BRCA advanced FFPE	DETECTEE (AF: 4.38%)	DETECTEE	
13	NGS ampliseq for illumina Myeloid panel	DETECTEE (AF: 5%)	DETECTEE (AF: 5%)	
14	NA	NA	NA	NA
15	NGS	DETECTEE (AF: 4%)	DETECTEE (AF: 6%)	

3. Commentaires

- 8 laboratoires n'ont pas détecté la mutation FLT3 ITD300. 6 laboratoires ont utilisé la technique NGS et 2 une technique PCR.
- 1 laboratoire n'a pas détecté la mutation FLT3 D835Y. Celui-ci a utilisé la technique NGS Archer VP Myeloid.
- 1 laboratoire n'a pu détecter la mutation TP53 S241F avec sa technique NGS mais a détecté la mutation NM_000546.5(TP53):c.1101-2A>C avec la même technique.
- Les fréquences alléliques indiquée par les laboratoires sont dans l'ensemble très proche de celles attendues. Seuls 3 laboratoires ont indiqué des fréquences alléliques supérieure pour la mutation FLT3 D835Y et 2 laboratoires ont indiqué des fréquences alléliques nettement inférieure pour FLT3 ITD300.

4. Méthodes utilisées

A. FLT3 ITD et FLT3 D835Y



La technique la plus utilisée est la technique NGS qui peut être combinée à de la PCR-CE ou à de l'analyse de fragment pour la détection de la mutation FLT3 ITD. La technique PCR combinée à de l'analyse de fragment pour la détection de la mutation FLT3 ITD est également utilisée.

B. TP53

La technique la plus utilisé pour la détection de mutations du gène TP53 est la technique NGS.

Conclusions sur les performances des laboratoires

Les performances des laboratoires pour la détection de la mutation JAK2 V617F sont très satisfaisantes. L'ensemble des laboratoires ayant détecté la présence de la mutation dans l'échantillon commercial correspondant.

Concernant la détection de la translocation t(9 ;22) du gène de fusion BCR ABL, seuls 4 laboratoires ont pu répondre à l'enquête car les échantillons envoyés ne correspondaient pas à des échantillons de routine pour les autres laboratoires et ceux-ci se sont donc retrouvés dans l'incapacité d'effectuer l'analyse. Il est à noter que deux des laboratoires ayant répondu ont émis une réserve quant à leurs réponses. Le nombre de copies ABL était trop faible que pour donner une interprétation correcte.
Cette enquête sera à nouveau proposée l'année prochaine afin de pouvoir analyser les performances des laboratoires. Des échantillons conforment aux échantillons de routine seront cette fois envoyés.

Concernant la détection de la mutations FLT3 ITD, la plus grande fréquence d'erreurs peut provenir d'une part de la faible fréquence allélique de la mutation dans l'échantillon et d'autre part de la technique NGS utilisée par certains laboratoires.

Concernant la détection de mutations du gène TP53, les performances des laboratoires participants sont satisfaisantes. Seul un laboratoire n'a pu détecter la présence de la mutation S241F attendue pour l'échantillon.

Antigène autres que ABO et RH ; D faible/D variant

Echantillon

L'ADN a été extrait par le laboratoire du service « Qualité des laboratoires » via un kit commercial *QIAamp DNA Blood Mini Kit* à partir du sang prélevé chez un donneur sain. La concentration en ADN et la pureté de l'échantillon ont été mesurées via la technique de quantification spectrophotométrique, Nanodrop. La concentration en ADN de l'échantillon a été mesurée à 800 ng/µl et sa pureté (A260/A280) était de 1,89.

Participation

9 laboratoires de biologie clinique étaient inscrits pour cette enquête. 8 pour l'ensemble des paramètres et 1 laboratoire seulement pour la détermination d'autres antigènes que ABO et Rh.

L'ensemble des laboratoires inscrits ont participé à l'enquête.

Résultats

Les laboratoires ont reçu 1 tube de 150 µl d'ADN génomique humain extrait à partir de sang d'une femme enceinte avec un kit commercial. La concentration en ADN de l'échantillon ainsi que sa pureté leur étaient données. Il leur était demandé de déterminer la présence d'autres antigènes que ABO et Rh et de déterminer la présence d'un D faible ou d'un D variant par une méthode de biologie moléculaire.

1. Résultats par antigènes

Echantillon	Antigènes	Résultats encodés	Nombre de laboratoires (%)
ABO	MNS	M+ N+ S- s+	6/9 (66.7)
		S- s+	1/9 (11.1)
		M+ N+ S- s+, Uvar -	1/9 (11.1)
		M+ N+ S- s+, Uvar P2-, uVar NY-	1/9 (11.1)
	Lutheran	Lu(a)-, Lu(b) +	4/9 (44.4)
		NA	5/9 (55.6)
	Kell	K- k+	5/9 (55.6)
		K-, k+, Kp(a)-, Kp(b)+	1/9 (11.1)
		K-, k+, Kp(a)-, Kp(b)+, Js(a)-, Js(b) +	3/9 (33.3)
	Duffy	Fya+, Fyb-	4/9 (44.4)
		Fya+, Fyb-, Fynull-	1/9 (11.1)
		Fya+, Fyb-, Fyx- Fynull-	1/9 (11.1)
		Fya+, Fyb-, Fyx-, Fy Gatabox-	2/9 (22.2)
		Fya+, Fyb-, Fy Gatabox-	1/9 (11.1)
	Kidd	Jka-, Jkb+	9/9 (100)
	Diégo	Dia-, Dib+	3/9 (33.3)
		Dia-, Dib+, Wra-, Wrb+	1/9 (11.1)
		N.A	5/9 (55.6)

	Scianna	Sc1 + Sc2-	1/9 (11.1)
		N.A	8/9 (88.9)
	Dombrock	Doa+, Dob-	7/9 (77.8)
		Doa+, Dob-, Hy+, Joa+	1/9 (11.1)
		N.A	1/9 (11.1)
	Colton	Coa+, Cob-	4/9 (44.4)
		N.A	5/9 (55.6)
	Landsteiner-Wiener	LWa +, LWb-	1/9 (11.1)
		N.A	8/9 (88.9)
	VEL	Vel+	3/9 (33.3)
		N.A	6/9 (66.7)
	RhCe	CcEe	4/9 (44.4)
		C c E e CW-	2/9 (22.2)
		N.A	3/9 (33.3)
	Cartwright	Yta+ Ytb-	3/9 (33.3)
		N.A	6/9 (66.7)
	Knops	Kna+ Knb+	2/9 (22.2)
		N.A	7/9 (77.8)
	Wright	Wra-, Wrb +	1/9 (11.1)
		N.A	8/9 (88.9)

Echantillon	Résultats encodés	Nombre de laboratoires (%)
ABO	Pas de D faible	7/7 (100)*
	Pas de variance détectée	8/8 (100)

*Un laboratoire nous a indiqué après l'enquête ne pas rechercher pas la présence de D faible.

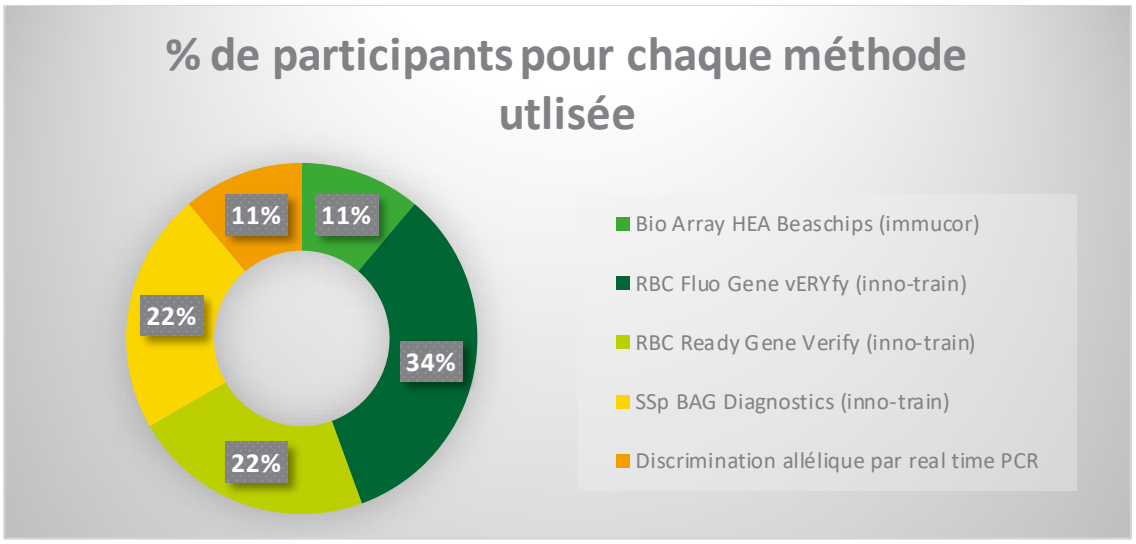
2. Résultats par laboratoire

				ABO														
Labo	**Méthodes utilisées ABO/Rh**	**Méthodes utilisées D faible**	**Méthodes utilisées D variant**	MNS	Lutheran	Kell	Lewis	Duffy	Kidd	Diégo	Scianna	Dombrock	Colton	Landsteiner-Wiener	VEL	Autre	D faible	D variant
1	RBC Fluo Gene vERYfy (inno-train)	Weak D SSp BAGene kit	Partial D type SSP BAGene kit	M+ N+ S- s+, Uvar-	Lu(a)- Lu(b)+	K- k+ Kp(a)- Kp(b)+ Js(a)- Js(b)+	NA	Fya+ Fyb- FyGatabox-	Jka- Jkb+	Dia- Dib+	NA	Doa+ Dob-	Coa+ Cob-	NA	NA	**RhCE**: C c E e **Cartwright**: Yta+ Ytb- **Knops**: Kna+ Knb+ **Wright**: Wra- Wrb +	Pas de D faible	RhD +
2	Bio Array HEA Beaschips (immucor)	Bio Array RHD Beadchips (immucor)	Bio Array RHD Beadchips (immucor)	M+ N+ S- s+	Lu(a)- Lu(b)+	K- k+ Kp(a)- Kp(b)+ Js(a)- Js(b)+	NA	Fya+ Fyb-	Jka- Jkb+	Dia- Dib+	Sc1+ Sc2-	Doa+ Dob- Hy+ Joa+	Coa+ Cob-	LWa + LWb-	NA	NA	Pas de D faible	Pas de variance
3	SSp BAG Diagnostics (inno-train)	BAG Diagnostics	BAG Diagnostics	M+ N+ S- s+	Lu(a)- Lu(b)+	K- k+ Kp(a)- Kp(b)+	NA	Fya+ Fyb- Fyx- Fynull-	Jka- Jkb+	Dia- Dib+ Wra- Wrb+	NA	Doa+ Dob-	Coa+ Cob-	NA	NA	**Cartwright**: Yta+ Ytb- **Knops**: Kna+ Knb+	Pas de D faible	Pas de variance
4	RBC Ready Gene Verify (innot-train)	RBC Ready Gene Weak D SSP kit	RBC Ready Gene SSp CDE kit	M+ N+ S- s+		K- k+	NA	Fya+ Fyb- Fynull-	Jka- Jkb+	NA	NA	Doa+ Dob-	NA	NA	Vel+	**RhCE**: C c E e CW-	Pas de D faible	Pas de variance
5	BAGene SSP	Weak D SSp BAGene kit	Partial D type SSP BAGene kit	M+ N+ S- s+	Lu(a)- Lu(b) +	K-, k+ Kp(a)- Kp(b)+ Js(a)- Js(b)+	NA	Fya+ Fyb-	Jka- Jkb+	Dia- Dib +	NA	Doa+ Dob-	Coa+ Cob-	NA	Vel+	**Cartwright**: Yta+ Ytb-	Pas de D faible	Pas de variance
6	RBC Fluo Gene vERYfy (inno-train)	RBC Fluo Gene Dweak (inno-train)	RBC Fluogene CDE (inno-train)	M+ N+ S- s+	NA	K- k+	NA	Fya+ Fyb-	Jka- Jkb+	NA	NA	Doa+ Dob-	NA	NA	NA	**RhCE**: C c E e	Pas de D faible	pas de variance sous réserves de variants

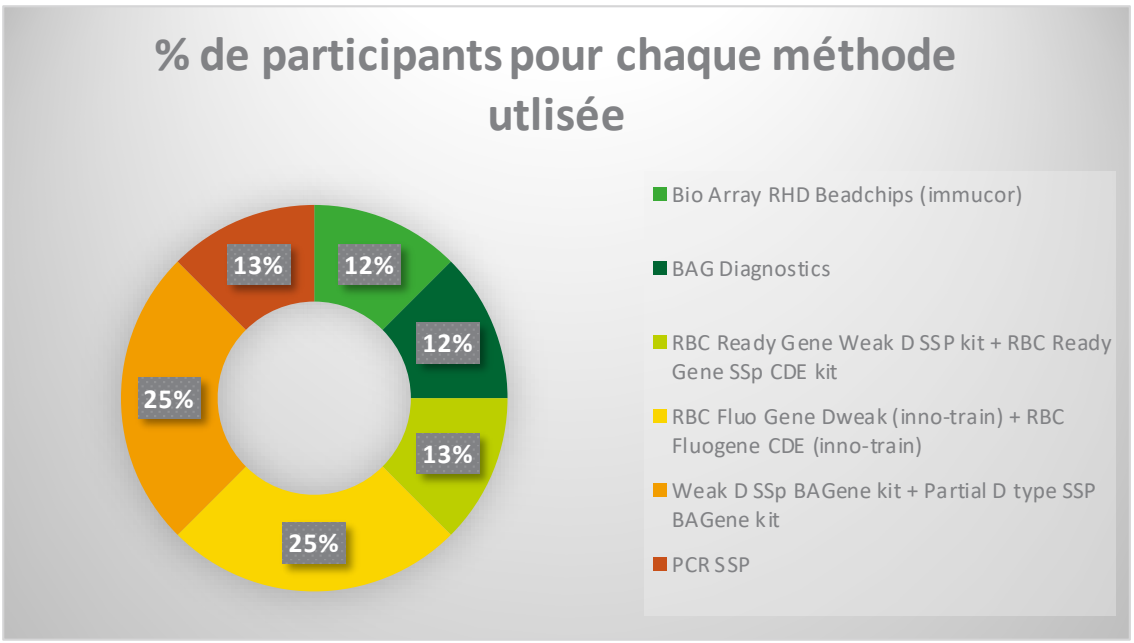
																		hors limites du kit
7	RBC Ready Gene Verify (innot-train)	NA	NA	M + N+ S- s+	NA	K- k+	NA	Fya+ Fyb- Fyx- FyGatabox-	Jka- Jkb+	NA	NA	Doa+ Dob-	NA	NA	Vel+	RhCE: C+ c+ E+ e+	NA	NA
8	Discrimination allélique par real time PCR	NA	PCR SSP	S- s+	NA	K- k+	NA	Fya+ Fyb-	Jka- Jkb+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	**RhCE**: C c E e	NA	Pas de variance
9	RBC Fluo Gene vERYfy (inno-train)	RBC Fluo Gene Dweak (inno-train)	RBC Fluogene CDE (inno-train)	M+ N+ S- s+, UvarP2 uVarNY-	NA	K- k+	NA	Fya+ Fyb- Fyx- Gatabox-	Jka- Jkb+	NA	NA	Doa+ Dob-	NA	NA	NA	**RhCE: C+ c+ E+ e+ CW-**	Pas de D faible	D+ Pas de variance

3. Méthodes utilisées

A. Détermination d'autres antigènes que ABO et Rh



B. Détermination de la présence d'un D faible ou variant



Conclusions de l'enquête

L'ensemble des laboratoires inscrits ont participé à l'enquête. Nous n'avons pas observé de discordance entre les résultats rendus par les laboratoires.

La méthode la plus utilisée pour la détermination d'antigènes autre que ABO et Rh est la méthode RBC Fluo Gene Verify.

Les méthodes les plus utilisées pour la détermination de D faible et de D variant sont la combinaison des méthodes RBC Fluo Gene D weak et RBC fluo Gene CDE ainsi que la combinaison des méthodes Weak D SSp BAGene kit et Partial D type SSp BAGene kit.

Rh d'un fœtus

Echantillons

L'ADN a été extrait par le laboratoire du service « Qualité des laboratoires » via un kit commercial *QIAamp DNA Blood Midi-Maxi Kit* à partir du sang prélevé chez une femme enceinte. La concentration en ADN extrait a été mesurée via une technique de fluorométrie (Qubit). La concentration de l'échantillon a été mesurée à 0,197 ng/µl.

Participation

3 laboratoires de biologie clinique étaient inscrits pour cette enquête. Un laboratoire nous a indiqué après l'envoi des échantillons une erreur dans son inscription et qu'il ne faisait pas cette analyse en routine.

Seul 2 des 3 laboratoires inscrits ont donc participé à l'enquête.

Résultats

Les laboratoires ont reçu 1 tube de 100 µl d'ADN génomique humain extrait avec un kit commercial. La concentration de l'échantillon en ADN leur était donnée. Il leur était demandé d'utiliser cet échantillon pour réaliser la recherche de génotype Rh1 du fœtus.

Le cas clinique était le suivant :

Cas clinique : La patiente et son conjoint sont d'origine caucasienne. La grossesse est spontanée et mono-fœtale. Le prélèvement sanguin a été effectué à 27 SA.

Echantillon	Résultats encodés	Méthode	Nombre de laboratoires (%)
ABO-2	Non concluant	Real time PCR	1/2 (50)
	RHD+ SRY	Real time PCR home made	1/2 (50)

Conclusions de l'enquête

Au vu du faible nombre de participants et des résultats non concluant, aucune conclusion ne peut être tirée de cette enquête.

FIN

© Sciensano, Bruxelles 2020.
Ce rapport ne peut pas être reproduit, publié ou distribué sans l'accord de Sciensano. Les résultats individuels des laboratoires sont confidentiels. Ils ne sont transmis par Sciensano ni à des tiers, ni aux membres de la Commission, des comités des experts ou du groupe de travail EEQ.