

**RISQUES BIOLOGIQUES POUR LA SANTE
QUALITE DES LABORATOIRES**

**COMMISSION DE BIOLOGIE CLINIQUE/ D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE
COMITE DES EXPERTS**

**EVALUATION EXTERNE DE LA QUALITE
DES ANALYSES DE BIOLOGIE CLINIQUE/ D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE**

RAPPORT ANNUEL GLOBAL DEFINITIF

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

2021

Sciensano/Programme EEQ/14-FR

Risques biologiques pour la santé
Qualité des laboratoires
Rue J. Wytsman, 14
1050 Bruxelles | Belgique

www.sciensano.be

COMITE DES EXPERTS

Sciensano			
Secrétariat		TEL:	02/642 55 22
		FAX:	02/642 56 45
Nom coordinateur d'enquête	Joséphine Lantoine	TEL:	02/642 53 94
		e-mail:	Josephine.lantoine@sciensano.be
Nom coordinateur d'enquête remplaçant	Bernard China Vanessa Ghislain	TEL:	02/642 53 85 et 02/642 52 08
		e-mail:	Vanessa.ghislain@sciensano.be bernard.china@sciensano.be
Experts	Institution		
Barbara Denys	UZGENT		
Evelien Heylen	ZNA		
Frédéric 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		

Une version provisoire de ce rapport a été transmise aux experts le :03/01/2022

Ce rapport a été discuté lors de la réunion du comité des experts du : NA-discussion par email

Autorisation du rapport : par Joséphine Lantoine, coordinateur d'enquête

Signature du coordinateur d'enquête

Date de publication : 24/02/2022

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 MATIERES

Table des matières

INTRODUCTION	4
HER 2 (2021/1)	5
ECHANTILLON.....	5
PARTICIPATION.....	5
DÉTECTION D'ANTIGÈNE AUTRES QUE ABO ET RH + DÉTECTION DE D FAIBLE ET/OU D VARIANT	6
ECHANTILLON.....	6
PARTICIPATION.....	6
RÉSULTATS.....	6
CONCLUSIONS SUR LES PERFORMANCES DES LABORATOIRES.....	11
EGFR-RAS	12
ECHANTILLONS.....	12
PARTICIPATION.....	12
RÉSULTATS.....	13
CONCLUSIONS SUR LES PERFORMANCES DES LABORATOIRES.....	24
BRAF V600E	25
ECHANTILLON.....	25
PARTICIPATION.....	25
RÉSULTATS.....	25
CONCLUSIONS SUR LA PERFORMANCE DES LABORATOIRES.....	29
HER 2 (2021-5)	30
ECHANTILLON.....	30
PARTICIPATION.....	30
RÉSULTATS.....	30
CONCLUSIONS SUR LES PERFORMANCES DES LABORATOIRES.....	33
MYÉLOÏDE : JAK2	34
ECHANTILLONS.....	34
PARTICIPATION.....	34
RÉSULTATS.....	34
CONCLUSIONS SUR LES PERFORMANCES DES LABORATOIRES.....	37
EVALUATION EXTERNALISÉE : DÉTECTION DE MUTATIONS DANS LE GÈNE DU FACTEUR II ET LE GÈNE DU FACTEUR V (ECAT)	38
ECHANTILLONS.....	38
PARTICIPATION.....	38
RÉSULTATS.....	38
CONCLUSIONS SUR LES PERFORMANCES DES LABORATOIRES.....	39

INTRODUCTION

En 2021, nous avons organisée 5 enquêtes portant sur les art.33 bis et 33 ter de la nomenclature INAMI.

L'enquête 2021/1 portait sur la détection de l'amplification du gène HER2 en cas de cancer du sein non métastatique ou métastatique. (Annulée)

L'enquête 2021/2 portait sur la détermination d'autres antigènes d'érythrocytes que ABO et Rh et la détermination d'un D faible ou variant.

L'enquête 2021/3 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 2021/4 portait sur la détection de la mutation du gène BRAF V600 en cas de mélanome.

L'enquête 2021/5 portait sur la détection de l'amplification du gène HER2 en cas de cancer du sein non métastatique ou métastatique suite à l'annulation de l'enquête 2021/1.

L'enquête 2021/6 portait sur la détection de la mutation JAK2V617F.

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. Les performances des laboratoires à cette EEQ sont discutées en page 38.

De même, pour d'autres paramètres tel que le NIPT, la détection de mutation dans le gène TP53 dans le cadre de leucémie ou encore la détection de la mutation PDGFRA D842V dans le cadre d'un GIST, il leur a été demandé de s'inscrire auprès de GenQA. Un remboursement est prévu pour l'année 2021 pour les laboratoires qui nous feront part de leurs résultats.

HER 2 (2021/1)

Echantillon

Suite à l'appel d'offre réalisé dans le cadre de la constitution d'un cahier de charge, les échantillons artificiels HER2 ont été fournis par la firme Elitech Benelux située à Sint-Martens-Latem, Belgique. La firme Elitech a sous-traité la fabrication de ces échantillons à la firme ThermoFischer Scientific située à Fremont, USA.

Les échantillons sont des coupes FFPE de 3 µm d'épaisseur réalisées à partir de lignées cellulaires exprimant ou non l'amplification du gène HER2.

Les laboratoires ont reçu 2 lames pour chaque cas. Il leur a été demandé d'effectuer l'analyse sur au moins une des deux lames.

Participation

Suite à différents retours de laboratoires participants, la qualité de ces lames a été remise en question (matériel non-homogène : présence de bulles et/ou trous, décollement du tissu). Après investigation, il est apparu que la qualité de ces lames ne permettait pas d'effectuer une analyse optimale aboutissant à un résultat interprétable.

Dans ces conditions, il a été décidé d'annuler l'enquête. Conformément à notre système qualité et aux exigences de la norme ISO17043, une plainte officielle a été déposée auprès du fournisseur et une non-conformité en interne a été établie.

Une nouvelle enquête a été organisée le 13/09/2021. Les résultats de celle-ci sont décrits en p.30 (HER2-2021/5).

Détection d'antigène autres que ABO et RH + détection de D faible et/ou 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 45 ng/μl et sa pureté (A260/A280) était de 1.85.

Participation

10 laboratoires de biologie clinique étaient inscrits pour cette enquête : 7 pour l'ensemble des paramètres ; 1 laboratoire seulement pour la détermination d'autres antigènes que ABO et RH et la détermination d'un D variant ; 2 laboratoires seulement pour la détermination d'autres antigènes que ABO et Rh.

1 laboratoire s'est désinscrit après l'envoi des échantillons. Les 9 autres laboratoires ont quant à eux participé à l'enquête.

Résultats

Les laboratoires ont reçu 1 tube de 150 μl d'ADN génomique humain extrait à partir de sang extrait 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 (N)
<u>ABO2021</u>	MNS	MNS: NN ss	8/9
		MNS : NN ss Uvar P2-, Uvar NY-	1/9
	Lutheran	LU: Lu ^b Lu ^b	4/9
		NA	5/9
	Kell	KEL: kk	5/9
		KEL: kk Kp ^b Kp ^b Js ^b Js ^b	4/9
	Duffy	FY: Fy ^a Fy ^a Fy ^b Fy ^b	3/9
		FY: Fy ^a Fy ^a Fy ^b Fy ^b , Fy ^x - Fynull-	4/9
		FY: Fy ^a Fy ^a Fy ^b Fy ^b FyGATA - Fy ^x -	1/9
		FY: Fy ^a Fy ^a Fy ^b Fy ^b , Fy ^x - Fynull- FyGATA -	1/9
	Kidd	JK:Jk ^a Jk ^a Jk ^b Jk ^b	8/9
		NA	1/9
	Diégo	DI: Di ^b Di ^b	3/9
		DI: Di ^b Di ^b Wr ^b Wr ^b	1/9
		NA	5/9
	Scianna	SC: Sc1Sc1	1/9
		NA	8/9
	Dombrock	DO: Do ^a Do ^a Do ^b Do ^b	8/9
		DO: Do ^a Do ^a Do ^b Do ^b HyHy Jo ^a Jo ^a	1/9
	Colton	CO: Co ^a Co ^a	4/9
NA		5/9	
	LW: Lw ^a Lw ^a	2/9	

Landsteiner-Weiner	NA	7/9
VEL	VEL: Vel +	5/9
	NA	4/9
RhCe	RH: cc ee	4/9
	RH: cc ee CW-	1/9
	NA	4/9
Cartwright	YT: Yt ^a Yt ^a	3/9
	NA	6/9
Knops	KN: Kn ^a Kn ^a	1/9
	NA	8/9

*Les résultats sont présentés selon la nomenclature usuelle.

Echantillon	Résultats encodés	Nombre de laboratoires (N)
<u>ABO2021</u>	Pas de D faible ou de variance détectés– RHD négatif	5/8
	Non applicable compte tenu du RHD négatif	1/8
	D normal	1/8
	RHD*01N.01	1/8

NB : Un laboratoire a rendu des résultats pour le D faible bien qu'il n'était initialement pas inscrit.

2. Résultats par laboratoire

Lab	Méthodes utilisées ABO/Rh	ABO2021											
		MNS	Lutheran	Kell	Duffy	Kidd	Diégo	Scianna	Dombrock	Colton	Landsteiner-Wiener	VEL	Autre
1	RBC fluo gene Verify (inno-train)	NN ss	Lu ^b Lu ^b	kk Kp ^b Kp ^b Js ^b Js ^b	Fy ^a Fy ^b	Jk ^a Jk ^b	Di ^b Di ^b Wr ^b Wr ^b		Do ^a Do ^b	Co ^a Co ^a	Lw ^a Lw ^a		RHCE: cc ee Cartwright: Yt ^a Yt ^a Knops: Kn ^a Kn ^a
2	BioArray HEA BeasChips (immucor)	-1 2 -3 4	-1 2	-1 2 -3 4 -6 7	1 2	1 2	-1 2	1 -2	1 2 4 5	1 -2	5 -7		RhCE: -3 -3 4 5
3	PCR SSP Bag Diagnostics	M- N+ S- s+	Lu ^a - Lu ^b +	K- k+ kp ^a - kp ^b +	Fy ^a + Fy ^b + Fyx- Fynull-	Jk ^a + Jk ^b +	Di ^a - Di ^b +		Do ^a + Do ^b +	Co ^a + Co ^b -		Vel+	RhCE: C- c+ E- e+ Cartwright: Yt a+ b-
4	RBC Ready gene Verify (inno-train)	M- N+ S- s+		K- k+	Fy ^a + Fy ^b + Fyx- Fynull-	Jk ^a + Jk ^b +			Do ^a + Do ^b +			Vel+	RhCE: C- c+ E- e+ CW-
5	SSp BAG Diagnostics (inno-train)	-1 2 -3 4	-1 2	-1 2 -3 4 -6 7	1 2 Fyx- Fynull-	1 2	-1 2		1 2 4 5	1 -2		Vel+	Cartwright : 1-2
6	RBC fluo gene Verify (inno-train)	N s		k	FY1 (A) FY2 (B)				Do1(A) Do2(B)				RhCE: ce
7	RBC Ready gene Verify (inno-train)	M- N+ S- s+		K- k+	Fy ^a + Fy ^b + FyGATA- Fy ^x -	Jk ^a + Jk ^b +			Do ^a + Do ^b +			Vel+	
8	RBC Ready gene Verify (inno-train)	M- N+ S- s+		K- k+	Fy ^a + Fy ^b + Fy ^x - Fynull- mutation (- 67 T>c) Gatabox allèle Fy*02	Jk ^a + Jk ^b +			Do ^a + Do ^b +			Vel+	

					non détectée								
9	RBC Fluo Gene vERYfy (inno-train)	M- N+ S- s+, Uvar P2-, Uvar NY-		K- k+	Fy ^{a+} Fy ^{b+} Fyx- Fynull-	Jk ^{a+} Jk ^{b+}			Do ^{a+} Do ^{b+}				

Labo	Méthodes utilisées D faible	Méthodes utilisées D variant	ABO2021	
			D faible	D variant
1	Weak D SSp BAGene Kit	Partial D type SSp BAGene kit	pas de D faible	RhD négatif
2	RHD Beadchip BioArray Solution (immucor)	RHD Beadchip BioArray Solution (immucor)	Absence de D faible RhD-	Absence de D variant RhD-
3	Weak D SSp BAGene Kit	Combinaison Partial D type SSp BAGene kit + RH-type kit	pas de D faible	pas de D variant RHD*01N.01 (homozygote)
4	Ready gene SSP Innotrain kit weak D	Ready gene SSP innotrain kit CDE	négatif	Pas de variant RhD-
5	Weak D SSp BAGene Kit	Partial D type SSp BAGene kit	D normal	D normal
6	RBC fluo gene D weak (inno-train)	RBC fluo gene CDE (inno-train)	RHD*01N.01	RHD*01N.01
7	NA	NA	NA	NA
8	RBC Ready gene weak D	RBC Ready gene CDE	négatif RHD négatif	négatif RHD négatif
9	/	RBC fluo gene CDE (inno-train)	non applicable car RhD -	RhD -

3. Commentaires

- Nous avons remarqué des variations inter-laboratoires au niveau de la nomenclature utilisée pour le rapportage (nomenclature usuelle vs nomenclature internationale proposée par l'ISBT ; *Peyrard and Rouger, Tracli, 2009*). De plus, certains laboratoires rapportaient les génotypes et d'autres les phénotypes compliquant ainsi l'analyse des résultats. Un sondage a dès lors été envoyé en octobre aux participants afin de connaître les guidelines utilisées en routine. Suite aux résultats de celui-ci, le comité d'experts a décidé de demander l'utilisation de la nomenclature usuelle ainsi que le rapportage des génotypes pour les prochaines enquêtes.

4. Méthodes utilisées

A. Détermination d'autres gènes que ABO et Rh

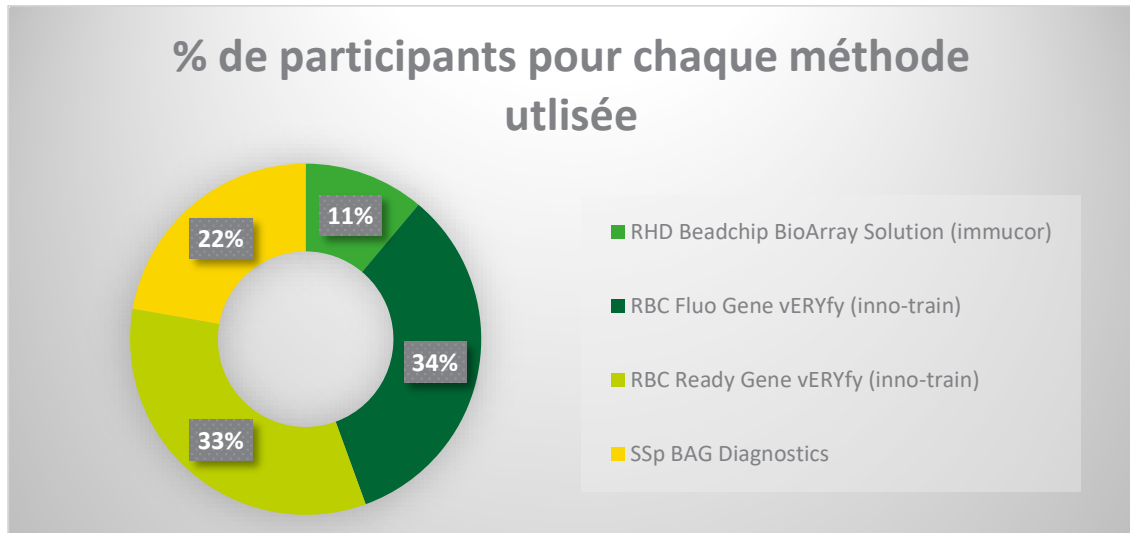


Chart 1 : Distribution des laboratoires par méthode pour la détection d'autres gènes que ABO et Rh

B. Détermination de la présence d'un D variant

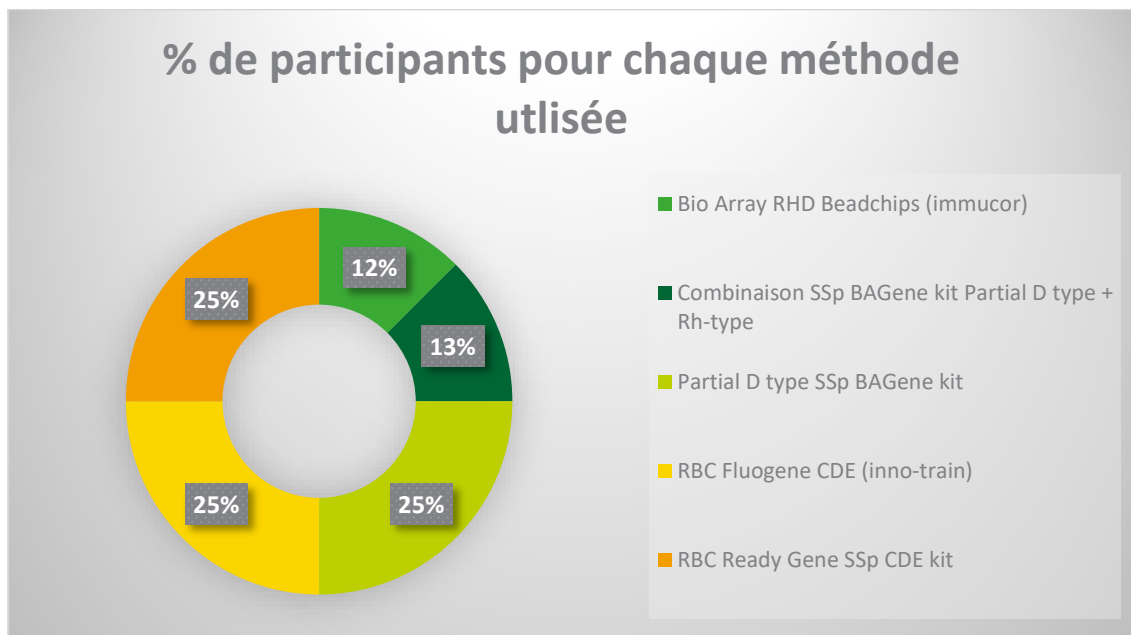


Chart 2 : Distribution des laboratoires par méthode pour la détermination d'un D variant

C. Détermination de la présence d'un D faible

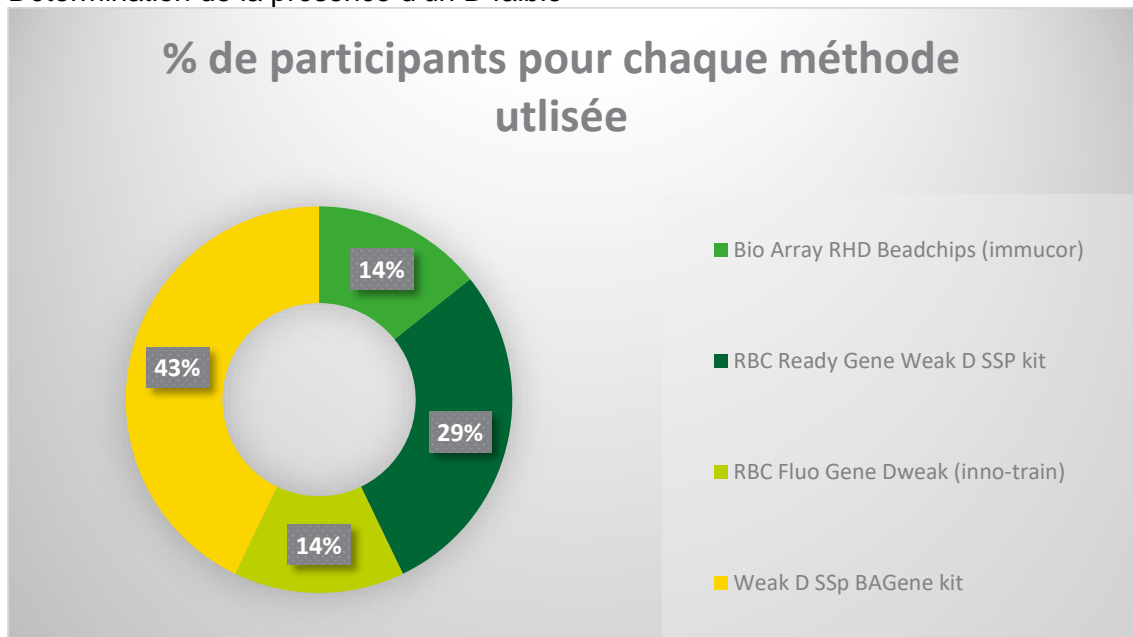


Chart 3 : Distribution des laboratoires par méthode pour la détermination d'un D faible

NB : un laboratoire n'a pas indiqué de méthode car l'analyse n'a pas été réalisée compte tenu du statut négatif du Rhésus D.

Les méthodes les plus utilisées pour la détermination d'antigènes autre que ABO et Rh sont les méthodes RBC Fluo-Gene vERYfy et RBC Ready Gene vERYfy de chez inno-train.

Les kits les plus utilisés pour la détermination de D faible sont RBC Ready Gene WEAK D de chez inno-train ainsi que le kit WEAK D BAGene SSp de chez BAG Diagnostics.

Pour la recherche d'un D variant, ce sont les kit RBC Fluo Gene CDE, RBC Ready Gene CDE de chez inno-train ainsi que le kit partial D type de chez BAG Diagnostics

Conclusions sur les performances des laboratoires

9 laboratoires sur 10 ont participé à l'enquête. Nous n'avons pas observé de discordance entre les résultats rendus par les laboratoires. Pour les prochaines enquêtes, il sera clairement demandé aux laboratoires participants de répondre selon la nomenclature usuelle et de rapporter les génotypes.

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.

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

Les échantillons sont des coupes FFPE de 5 µm d'épaisseur provenant de biopsies de cancers colorectaux. 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) et le statut mutationnel KRAS et NRAS.

Cas clinique F00050516 :

Colon ascendant : tumeur primaire ileon terminal et colon droit :

Adénocarcinome invasif modérément différencié du colon ascendant avec infiltration de la musculature et aucune évidence d'extension au niveau de la séreuse

Marge chirurgicale, saines.

8 ganglions lymphatiques mésentériques sans présence de tumeur

Appendice, aucun diagnostic pathologique

Cas clinique F00050423 :

Masse tumorale au niveau du colon sigmoïde

Adénocarcinome invasif bien différencié du colon sigmoïde survenant à la suite d'un adénome tubulovilleux avec pénétration de la musculature et atteinte microscopique de la séreuse

Métastases sur 1 ganglion lymphatique parmi 14 avec extension perilymphatique

Lipome muqueux pédiculé.

Diverticuloses.

Aucune anomalie détectée au niveau des marges proximale et distale de la résection

Cas clinique C00018871.2 :

Adénocarcinome formé dans une large tumeur villositaire du colon à 30cm.

La tumeur a infiltré la tige mais les marges de l'excision ne présentent pas de tumeur.

Participation

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

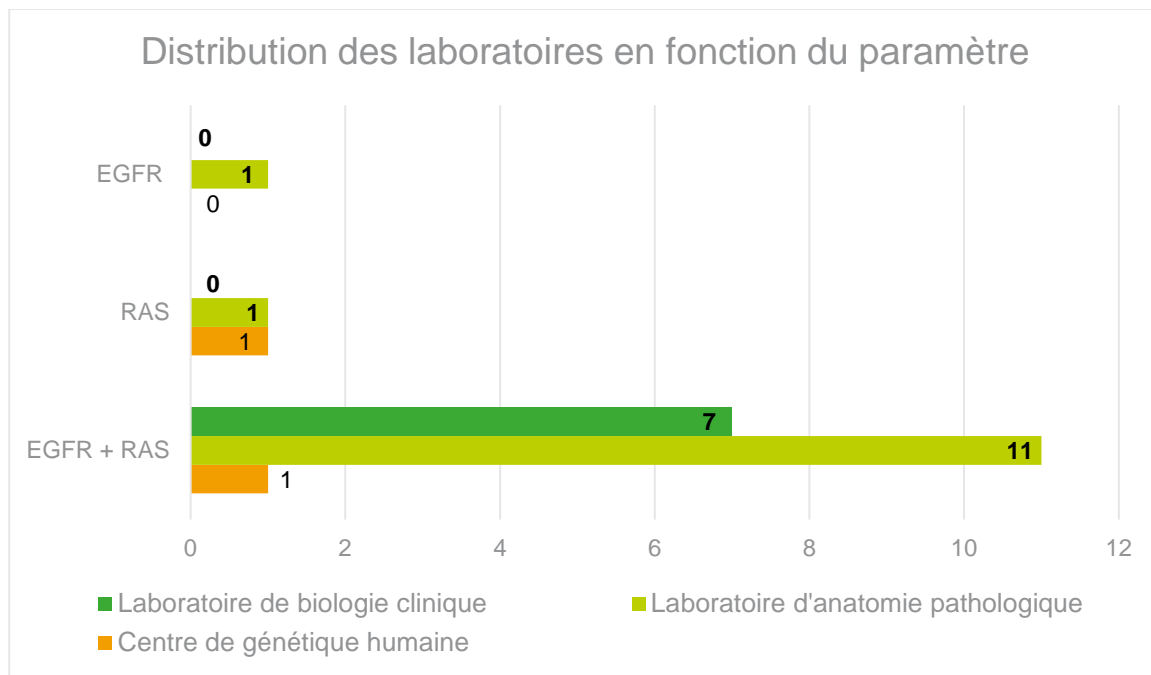


Chart 4 : Distribution des laboratoires inscrits par spécialité en fonction du paramètre (EGFR et/ou RAS)

Tous les laboratoires inscrits ont participé à l'enquête.

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 (%)
<u>ET2021-1</u>	EGFR c.2369C>T p.(Thr790Met) (AF :20%)	EGFR c.2369C>T p.(Thr790Met)	20 (100)
<u>ET2021-2</u>	WT	WT	20 (100)

Contrairement à ce qui a été indiqué dans le rapport préliminaire, l'ensemble des laboratoires ont détecté la mutation attendue. Après contact, le laboratoire qui avait indiqué avoir détecté la mutation EGFR c.2360C>T p.(T790M) nous a indiqué avoir fait une erreur d'écriture lors de l'encodage des résultats sur le formulaire papier. Ce laboratoire nous a envoyé ses données brutes et a bien détecté la mutation EGFR c.2369C>T p.(Thr790Met).

2. Résultats par laboratoire

Lab	Méthodes utilisées	Autres mutations détectées					
		ET2021-1	EGFR c.2369C>T p.(T790M) (AF :20%)	EGFR ex20INS	BRAF c.1799T>A (P.V600E)	BRCA2 c.5351del (p.N1784fs)	PIK3CA c.1340A>G (p.H1047R)
1	Biocartis Idylla EGFR mutation assay	X					
2	NGS Illumina Ampliseq for Illumina focus Panel	X (20%)					
3	NGS Illumina Ampliseq custom	X (24.9%)		X (68%)		X (50%)	
4	NGS Agilent THS SureMASTR tumor Hotspot	X (19%)		X (66%)		X (50%)	X (50%)
5*	Biocartis Idylla EGFR mutation assay+ NGS Qiagen QIAact AIT UMI FFPE	X (19%)		X (64%)		X (48%)	
6	NGS Illumina Ampliseq for Illumina focus Panel	X (23%)					
7	Biocartis Idylla EGFR mutation assay	X					
8	Roche Cobas EGFR mutation test V2	X					
9	NGS ThermoFischer Oncomine focus assay	X (24%)		X (67%)		X (50%)	
10	NGS Illumina Custom kit	X (21%)					
11	Amp Anchored Multiplex PCR Archer FusionPlex CTL (Invitae Archer)	X (16.5%)		X (62.2%)		X (65.9%)	
12	ddPCR BioRAD ddPCR mutation Assay EGFR + EGFR del19	X (20.4%)					
13	NGS Qiagen Qiaseq Targeted DNA custom panel	X (29.1%)		X (69%)		X (50.5%)	
14	NGS Ion torrent Colon and Lung Panel V2 + oncomine Solid tumor	X (17%)		X (66%)		X (48%)	
15	Biocartis Idylla EGFR Mutation Assay	X					

16	NGS Qiagen Qiaseq custom panel	X (21%)		X (66%)	X (43%)	X (49%)	
17	Biocartis Idylla EGFR mutation assay	X					
18	NGS Ampliseq Ion torrent custom panel + ddPCR bio rad custom primers-probe set	X (21%)		X (66%)		X (48%)	
19	Biocartis Idylla EGFR mutation assay	X					
20	NGS Home-made	X (29%)					

*Ce laboratoire nous avait initialement indiqué avoir détecté la mutation EGFR c.2360C>T p.(T790M). Après contact et envoi des données brutes, il apparaît que celui-ci a fait une erreur d'écriture et a bien détecté la mutation attendue EGFR c.2369C>T p.(T790M).

Distribution des fréquences alléliques rapportées pour la détection de la mutation EGFR T790M

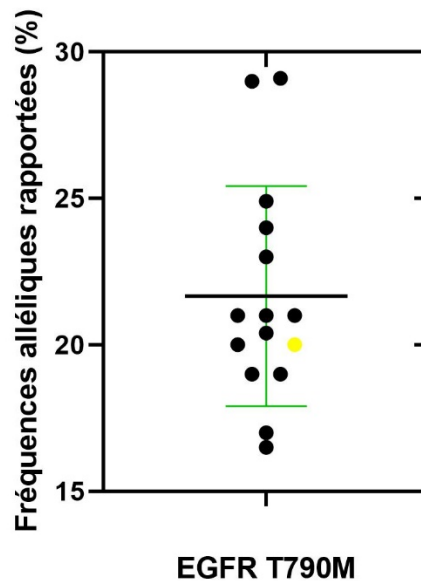


Chart 5: Distribution des fréquences alléliques rapportées lors de la détection de la mutation EGFR T790M pour l'échantillon ET2021-1. Le point jaune représente la fréquence allélique donnée par le fournisseur.

2 laboratoires ayant utilisé la technique NGS ont rapporté une fréquence allélique largement supérieure à la fréquence allélique attendue ainsi qu'à la moyenne des fréquences alléliques rapportées.

		ET2021-2	Autres mutations détectées				
Lab	Méthodes utilisées	WT	EGFR ex20INS	BRAF c.1799T>A (P.V600E)	BRCA2 c.5351del (p.N1784fs)	PIK3CA c.1340A>G (p.H1047R)	ALK c.3981T>G (p.Y1327C)
1	Biocartis Idylla EGFR mutation assay	X					
2	NGS Illumina Ampliseq for Illumina focus Panel	X					
3	NGS Illumina Ampliseq custom	X		X (68.3%)		X (46.5%)	
4	NGS Agilent THS SureMASTR tumor Hotspot	X		X (67%)		X (51%)	X (49%)
5	Biocartis Idylla EGFR mutation assay+ NGS Qiagen QIAact AIT UMI FFPE	X		X (71%)		X (53%)	
6	NGS Illumina Ampliseq for Illumina focus Panel	X					
7	Biocartis Idylla EGFR mutation assay	X					
8	Roche Cobas EGFR mutation test V2	X	(X)*				
9	NGS Thermofischer Oncomine focus assay	X		X(69%)		X (52%)	
10	NGS Illumina Custom kit	X					
11	Amp Anchored Multiplex PCR Archer FusionPlex CTL (Invitae Archer)	X		X (60.1%)		X (54.6%)	
12	ddPCR BioRAD ddPCR mutation Assay EGFR + EGFR del19	X					
13	NGS Qiagen QiaSeq Targeted DNA custom panel	X		X (70%)		X (40%)	
14	NGS Ion torrent Colon and Lung Panel V2 + oncomine Solid tumor	X		X (64%)		X (53%)	
15	Biocartis Idylla EGFR Mutation Assay	X					
16	NGS Qiagen QiaSeq custom panel	X		X (68%)	X (45%)	X (46%)	

17	Biocartis Idylla EGFR mutation assay	X					
18	NGS Ampliseq Ion torrent custom panel + ddPCR bio rad custom primers-probe set	X		X (67%)		X (47%)	
19	Biocartis Idylla EGFR mutation assay	X					
20	NGS Home-made	X					

*Après vérification avec une autre méthode, il apparaît que la détection de cette mutation par ce laboratoire avec le kit Cobas est un faux positif. De plus amples informations sont disponibles au point 4. Commentaires ainsi qu'en annexe 1 de ce rapport.

3. Réponses à la question supplémentaire

A la question, « Dans le cadre de la réception d'échantillon de type coupe FFPE, quelle est l'épaisseur utilisée par votre laboratoire en routine pour la détection de mutations EGFR » les laboratoires participants ont déclaré :

μm	Nombre de participants
4 μm	1
5 μm	10
7 μm	1
5 μm pour les résections et 10 μm pour les biopsies et les blocs	1
5 μm si en tube et 10 μm si sur lame en verre	1
10 μm si coupe réalisée au sein du laboratoire ; si coupes extérieure : 5 μm	1
10 μm	2
$\geq 15 \mu\text{m}$	1

4. Commentaires

- Un laboratoire a indiqué les échantillons comme étant de mauvaise qualité. Celui-ci a néanmoins correctement répondu à cette enquête.
- Un laboratoire a indiqué que son séquençage était de qualité sub-optimale. Celui-ci a néanmoins correctement répondu à cette enquête.
- Concernant la détection (faux-positif) de la mutation EGFR Ex20Ins dans l'échantillon ET2021-2, le laboratoire a été informé par la firme Roche via un communiqué que le kit utilisé à savoir le kit « Roche Cobas EGFR mutation test V2 » donnait des résultats faussement positifs pour cette mutation. Etant donné que seul ce laboratoire a « détecté » cette mutation et que l'analyse de l'échantillon par ce laboratoire avec une autre méthode (Pcr AmyoDX Lung cancer panel) n'a pas donné de résultat positif pour cette mutation, nous pouvons donc conclure que cette détection était bien un faux-positif.

5. Méthodes utilisées

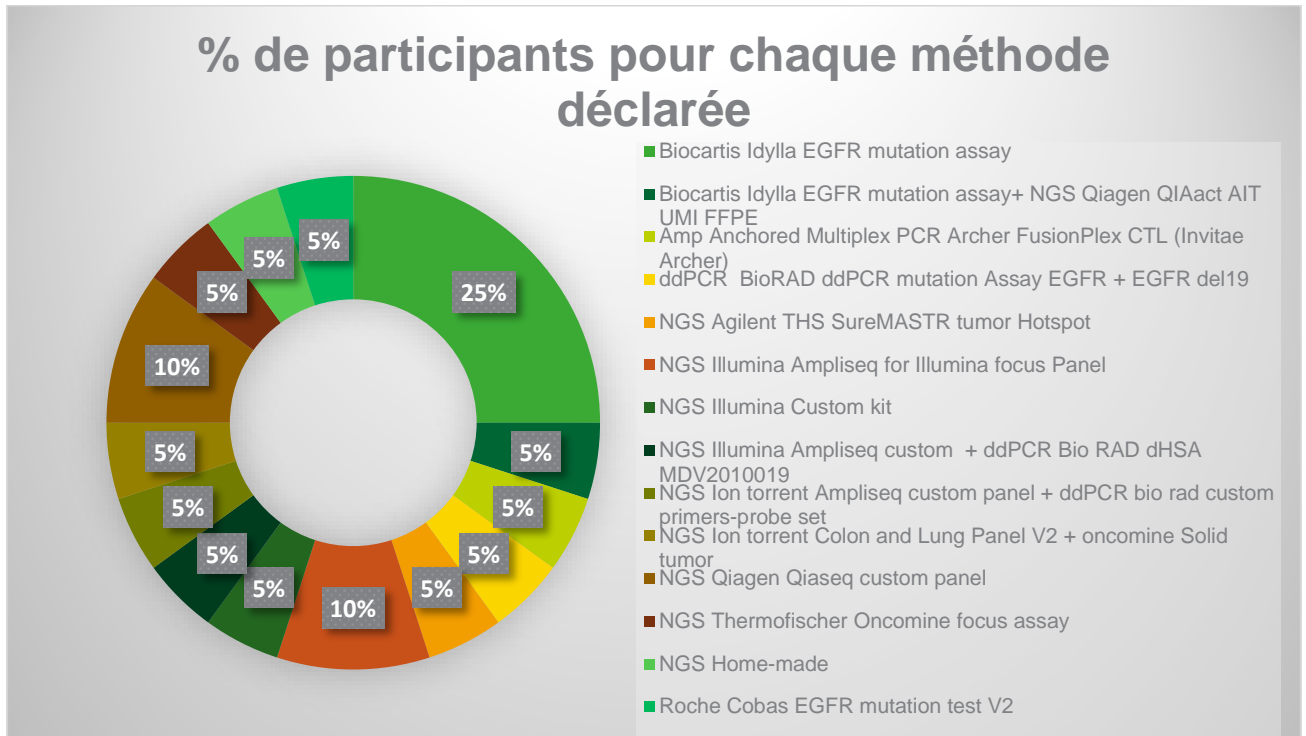


Chart 6 : Distribution des laboratoires par méthode pour la détection de mutations du gène EGFR

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

Veillez noter que suite à l'arrêt de la fabrication des kits suivants : Agilent SurMASTR hotspot et Roche SeqCAP EZ, 3 laboratoires ont changé de kits entre 2020 et 2021. Deux d'entre eux ont opté pour un kit Illumina, l'autre a opté pour un kit de la firme Roche.

Un laboratoire a quant à lui changé de méthode, il est passé de la méthode NGS Illumina Nextseq à une méthode « target enrichment » l'anchored Mutlplex PCR (AMP), permettant le targeted NGS.

b. RAS

Les laboratoires participants ont reçu 2 lames FFPE pour chaque cas clinique. Ceux-ci ont dû rechercher la présence de mutations des gènes KRAS et NRAS 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 (AF)	Résultats encodés	Nombre de laboratoires (%)
F00050516	NRAS WT	NRAS WT	21 (100)
F00050423	KRAS c.35G>A p.(Gly12Asp)	KRAS c.35G>A p.(Gly12Asp)	18 (85.7)
		KRAS c.38G>A p.(Gly13Asp)	1 (4.7)
		KRAS G12X	1 (4.7)
		Non déterminé	1 (4.7)
C00018871.2	NRAS c.181C>A p.(Gln61Lys)	NRAS c.181C>A p.(Gln61Lys)	17 (80.9)
		WT	1 (4.7)
		Non déterminé	3 (14.3)

- Pour l'échantillon **F00050423**, le laboratoire n'a pu déterminer la présence de mutation dans le gène KRAS suite à un problème technique lié à une indisponibilité de cartouche KRAS chez la firme Biocartis.
- Pour l'échantillon **C00018871.2**, le laboratoire n'ayant pas détecté de mutation NRAS a indiqué l'échantillon comme étant de qualité sub-optimale.
- Pour l'échantillon **C00018871.2**, parmi les 3 laboratoires n'ayant pu déterminer la présence de mutation, 2 laboratoires ont indiqué une qualité sub-optimale de l'ADN extrait et 1 laboratoire a obtenu un résultat invalide.

Contrairement à ce qui a été indiqué dans le rapport préliminaire, 17 laboratoires et non 16 ont bien détecté la mutation NRAS c.181C>A p.(Gln61Lys). Le laboratoire qui avait indiqué avoir détecté la mutation NRAS c.181C>A p.(Glu61Lys) nous a indiqué avoir fait une erreur d'écriture lors de l'encodage des résultats sur le formulaire et nous a envoyé ses données brutes. Ce laboratoire est différent du laboratoire ayant fait une erreur d'écriture pour le paramètre EGFR.

2. Résultats par laboratoire

Labo.	Méthodes utilisées	F00050516	F00050423	C00018871.2
		NRAS WT	KRAS c.35G>A p.(Gly12Asp)	NRAS c.181C>A p.(Gln61Lys)
1	Idylla NRAS-BRAF mutation test + Idylla KRAS mutation test	X	X	X
2	NGS Illumina Ampliseq for Illumina focus panel	X	X (16.7%)	X (30%)
3	NGS Illumina Custom Ampliseq	X	X (13.10%)	X (28.30%)
4	NGS Agilent THS SureMASTR tumor Hotspot	X	X (14%)	X (20%)
5	Idylla NRAS-BRAF mutation test + Idylla KRAS mutation test +	X	X (14%)	X (42%)

	NGS Qiagen QIAact AIT UMI FFPE			
6	NGS Illumina Ampliseq for Illumina focus Panel	X	X (20%)	X (35%)
7	Idylla NRAS-BRAF mutation test + Idylla KRAS mutation test	X	X	X
8	Cobas BRAF/NRAS Mutation Test + Cobas KRAS mutation Kit	X	G12X	Non déterminé
9	Idylla NRAS-BRAF mutation test + Idylla KRAS mutation test	X	X	X
10	NGS Illumina Custom Kit	X	X (14%)	WT
11	NGS illumina NextSeq Custom Panel	X	X (12%)	Non déterminé
12	NGS Illumina Ampliseq Hotspot cancer Panel V2	X	X (17.1%)	X (44.4%)
13*	NGS Qiagen qiaseq Targeted DNA Custom panel	X	KRAS c.38G>A (p.G13D) (9.5%) NRAS c34G>A(p.Gly12Ser) (15.7%) [Nouvelle analyse après clôture : KRAS c35G>A(p.G12D) (7.1%)]	X (4.6%)
14	NGS Ion torrent Colon and Lung Panel V2 + Idylla NRAS-BRAF mutation test	X	X (21%)	X
15	Idylla NRAS-BRAF mutation test + Idylla KRAS mutation test	X	X	X
16**	NGS Qiagen Custom panel qiaseq	NRAS WT KRAS c34G>T (p.Gly12Cys) (6.1 %)	KRAS c35G>A(p. G12D) (14%) KRAS c322G>A(p.Asp108Asn) (6.8%) (VUS) NRAS c111+3G>A (5.1%) (VUS)	KRAS c34G>T (p.Gly12Cys) (59%) NRAS c181C>A p.(Gln61Lys) (10%)
17	Idylla NRAS-BRAF mutation test + Idylla KRAS mutation test	X	X	X
18	NGS Ampliseq Ion torrent custom panel	X	X (19%)	X (32%)
19	Idylla NRAS-BRAF mutation test + Idylla KRAS mutation test	X	Non déterminé	X
20	NGS Roche + home-made KAPPA HyperCap custom solid panel	X	X (15%)	Non déterminé
21	NGS Home-made	X	X (13%)	X (41%)

*Ce laboratoire a analysé de nouvelles coupes après clôture de l'enquête. Celui-ci nous a fait part de la qualité suboptimale des séquences obtenues. Lors de l'analyse de ces nouvelles coupes, le laboratoire a détecté la mutation KRAS c35G>A (p. G12D) avec une fréquence allélique de 7.1% mais n'a plus détecté la mutation KRAS c.38G>A (p. G13D). En routine, le laboratoire aurait répondu « non contributif » pour un échantillon patient.

******Ce laboratoire nous avait initialement indiqué avoir détecté la mutation NRAS c181C>A p.(Glu61Lys). Après contact et envoi de ses données brutes, il apparaît que celui-ci a fait une erreur d'écriture et a bien détecté la mutation attendue NRAS c181C>A p.(Gln61Lys).

Distribution des fréquences alléliques rapportées pour la détection de la mutation KRAS G12D

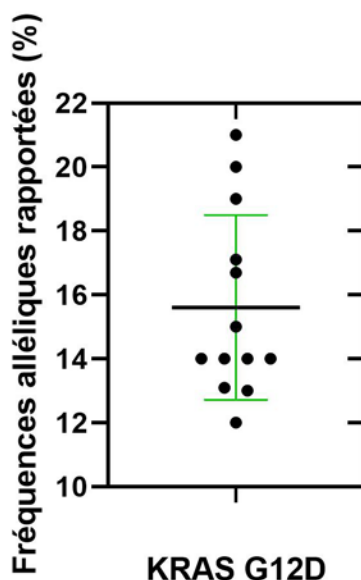


Chart 7: Distribution des fréquences alléliques pour la détection de la mutation KRAS G12D dans l'échantillon F00050423

2 laboratoires utilisant la technologie NGS ont rapporté une fréquence allélique largement supérieur à la moyenne des fréquences allélique rapportées. Un laboratoire utilisant également le NGS a rapporté une fréquence allélique assez inférieure à cette moyenne. Ces résultats doivent néanmoins être mis en perspective avec les retours reçus concernant la qualité et la quantité d'ADN extrait et sont sous réserve d'une possible hétérogénéité de la tumeur.

Distribution des fréquences alléliques rapportées pour la détection de la mutation NRAS Q61K

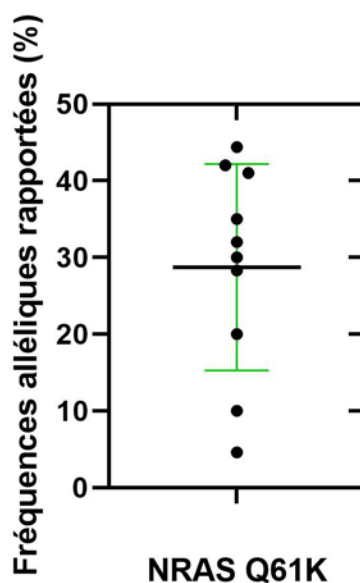


Chart 8 : Distribution des fréquences alléliques rapportées pour la détection de la mutation NRAS Q61K dans l'échantillon C00018871.2

2 Laboratoires utilisant la technologie NGS ont rapporté une fréquence allélique largement inférieure à la moyenne des fréquences allélique rapportées. Ces résultats doivent néanmoins être mis en perspective avec les retours reçus concernant la qualité et la quantité d'ADN extrait et sont sous réserve d'une possible hétérogénéité de la tumeur.

3. Commentaires

- Un laboratoire nous a indiqué que l'échantillon **F00050516** était de mauvaise qualité. Celui-ci a néanmoins correctement répondu à l'enquête.
- Seul un laboratoire nous a rapporté avoir détecté la mutation KRAS KRAS c34G>T (p.Gly12Cys) avec une fréquence allélique de 6.1 % dans l'échantillon **F00050516**.
- Pour les échantillons **F00050423** et **C00018871.2**, un laboratoire a dû augmenter sa limite de rapportage à 10%.
- Le laboratoire n'ayant pas détecté la mutation KRAS G12D dans l'échantillon **F00050423** nous a indiqué que l'échantillon était de mauvaise qualité.
- Le laboratoire n'ayant pu déterminer la présence de mutation dans l'échantillon **F00050423** nous a indiqué une indisponibilité de cartouche Idylla chez le fournisseur Biocartis. Celui-ci n'a donc pu obtenir la cartouche requise à temps pour effectuer l'analyse.
- Seul un laboratoire nous a rapporté avoir détecté les mutations KRAS c322G>A(p.Asp108Asn) et NRAS c111+3G>A avec une fréquence allélique de 6.8 % et 5.1 % respectivement dans l'échantillon **F00050423**. Il les a indiqués comme VUS (variant of unknown significance).
- Le laboratoire n'ayant pas détecté de mutation NRAS dans l'échantillon **C00018871.2** nous a indiqué une mauvaise qualité de l'échantillon. Ayant pris contact avec lui, celui-ci nous a informé qu'en routine il aurait demandé un nouvel échantillon afin de refaire l'analyse.
- Sur les 3 laboratoires qui n'ont pu déterminer la présence de mutation dans l'échantillon **C00018871.2**, 2 ont indiqué une qualité sub-optimale de l'ADN extrait et l'autre a indiqué un résultat invalide. Un laboratoire a également fait part d'une quantité d'ADN extrait sub-optimale.
- Pour l'échantillon **C00018871.2**, seul un laboratoire nous a indiqué avoir détecté la mutation KRAS c34G>T (p.Gly12Cys) avec une fréquence allélique de 59%.

Une analyse de la littérature scientifique concernant une corrélation possible entre le temps de stockage et la qualité/quantité d'ADN extrait a été effectuée suite aux problèmes rapportés lors de cette enquête. Selon plusieurs articles récents, la quantité ainsi que la qualité de l'ADN extrait diminue avec l'augmentation du temps de stockage des coupes :

"Storage of the FFPE tissue block for ≥ 3 years was a negative factor related to DNA quality"; *Fuji S, Biomedical Reports, 2019*

"DNA fragmentation in FFPE tissues is age-dependent, suggesting that storage time may limit the amount of available DNA in FFPE tissue"; *Watanabe M, Experimental and Therapeutic medicine, 2017*

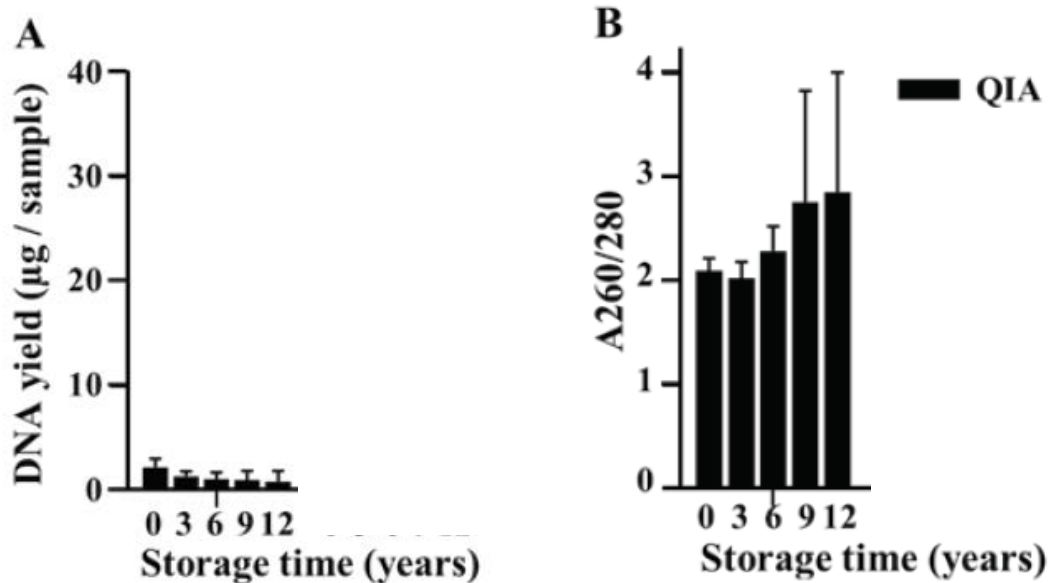


Figure 1 : A) Quantité d'ADN moyen extrait à partir de coupes FFPE stockées pendant moins d'un an, 3, 6, 9 ou 12 ans et quantifié par méthode UV. B) Qualité de l'ADN extrait à partir de coupes FFPE stockées pendant moins d'un an, 3, 6, 9 ou 12 ans et quantifié par le ratio de l'absorbance à une longueur d'onde de 260 et 280. **Source** : Watanabe M, *Experimental and Therapeutic medicine*, 2017

4. Méthodes utilisées

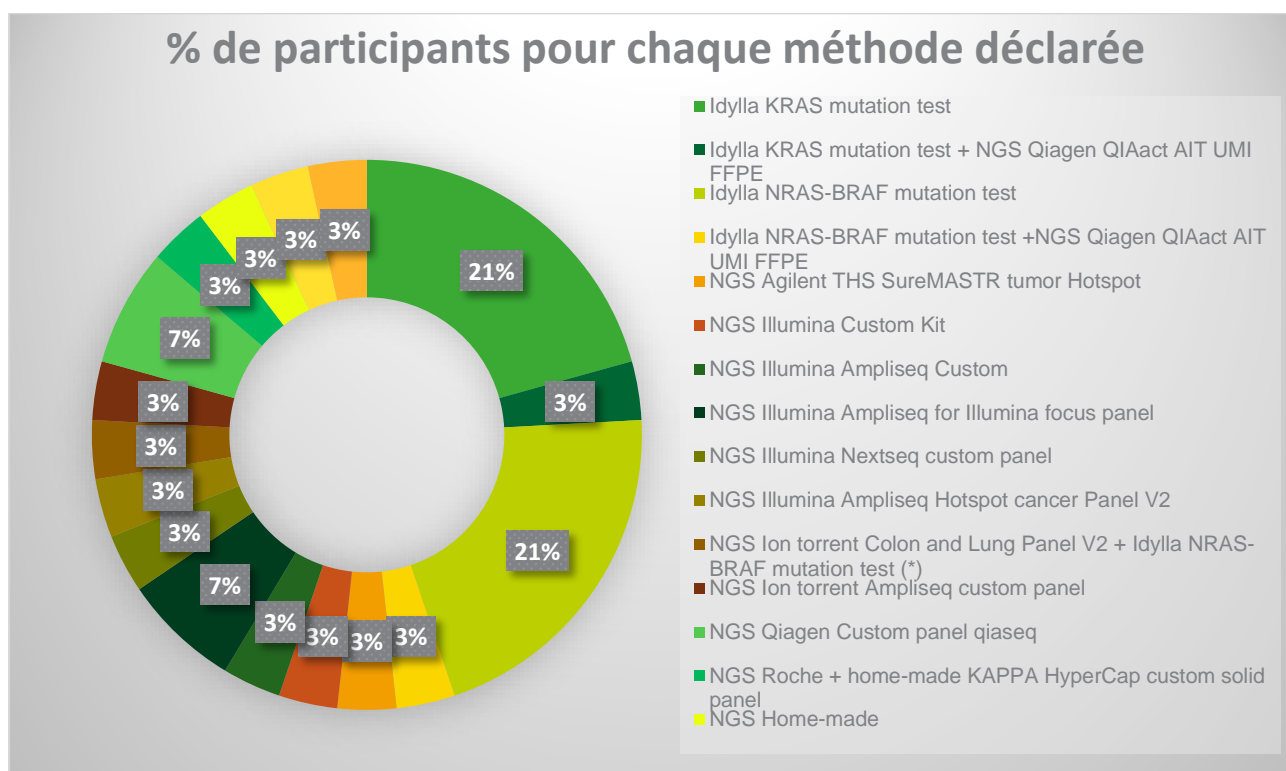


Chart 9 : Distribution des laboratoires par méthode pour la détection de mutations des gènes KRAS et NRAS.

Les méthodes les plus utilisées sont l'Idylla et le NGS.

Veillez noter que suite à l'arrêt de la fabrication des kits suivants : Agilent SurMASTR hotspot et Roche SeqCAP EZ, 3 laboratoires ont changé de kits entre 2020 et 2021. Deux d'entre eux ont opté pour un kit Illumina, l'autre a opté pour un kit de la firme Roche.

Conclusions sur les performances des laboratoires

Concernant la détection de la mutation EGFR T790M, l'ensemble des laboratoires a détecté la mutation attendue dans l'échantillon correspondant. L'analyse de cette mutation ne sera pas reproposée en 2022. Pour 2023, l'accent sera mis, si possible, sur l'envoi d'échantillons « de routine » et donc de coupes FFPE à partir desquelles l'ADN devra être extrait et analysé.

Concernant les gènes KRAS et NRAS, les performances des laboratoires sont globalement satisfaisantes. Seul 1 laboratoire n'a pas détecté la mutation attendue pour le gène KRAS. Pour le gène NRAS, 1 seul laboratoire n'a pas détecté la mutation attendue mais nous a indiqué que l'échantillon était de qualité sub-optimale. Ces résultats doivent donc être mis en perspective avec les retours reçus concernant la qualité et la quantité d'ADN extrait à partir des coupes FFPE qui, pour 7 laboratoires utilisant le NGS, se sont avérées sub-optimales. Ces deux paramètres sont en effet critiques lors d'analyse en NGS.

Pour les laboratoires ayant fait des erreurs d'écriture lors du remplissage du formulaire papier, il leur est conseillé de documenter cet évènement dans leur système qualité.

La détection de mutation dans les gènes KRAS et NRAS feront encore l'objet d'une enquête en 2022. Celle-ci se déroulera encore avec des coupes FFPE provenant d'échantillons de patients. Lors du choix des échantillons, l'accent sera mis sur des échantillons ayant été prélevé au maximum dans les deux années précédentes.

BRAF V600E

Echantillon

Les échantillons sont des coupes FFPE de 5 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 : âge, 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 c.1799T>A (V600E). Le pourcentage de cellules tumorales a également été communiqué aux laboratoires.

Suite aux problèmes rencontrés avec les échantillons RAS lors de l'enquête 2021/3 concernant la corrélation entre la durée de stockage des coupes et la qualité/quantité d'ADN extrait, les échantillons prévus pour l'enquête 2021/4 ont été testés dans le laboratoire d'un expert du comité d'experts de biologie moléculaire, le prof. Jacques Van Huysse. Les résultats de l'analyse ont conclu qu'un des deux échantillons prévus initialement n'était pas utilisable pour un contrôle de qualité dû à la faible quantité d'ADN extrait et à sa mauvaise qualité.

Cas clinique C00046336.K :

Homme 50 ans

Lésion au niveau de la poitrine : mélanome malin ulcère de type nodulaire avec une phase de croissance verticale. La tumeur est classée de stade pT4b avec une nécrose focale et une extension angiolymphatique. La lésion atteint focalement les marges latérales du spécimen et s'approche de sa marge profonde. Présence légère voire minimale de lymphocytes infiltrant. Présence de plusieurs points éparpillés d'extension angiolymphatique. L'activité mitotique est élevée (31/mm²).

Participation

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

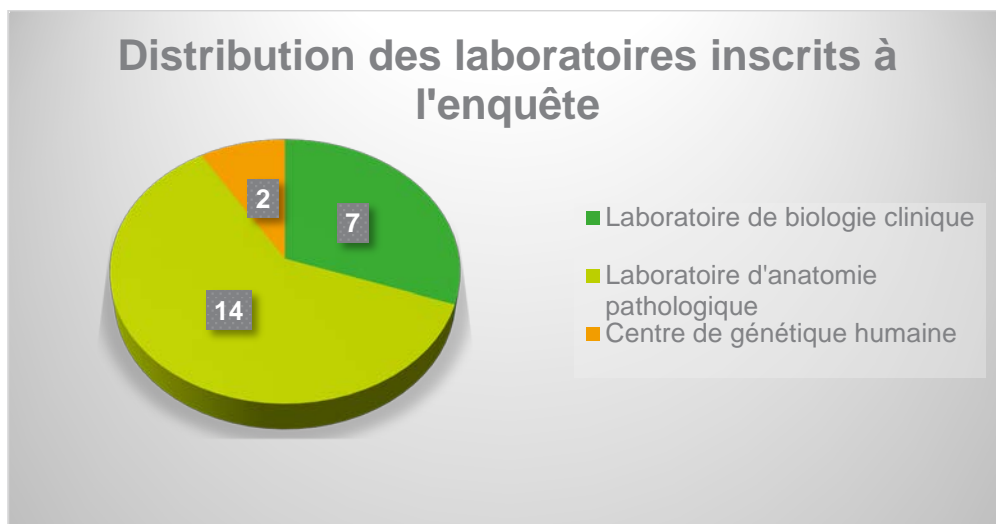


Chart 10 : Distribution des laboratoires inscrits par spécialités

Tous les laboratoires participants ont répondu.

Résultats

Les laboratoires participants ont reçu 2 lames FFPE pour le 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 (%)
C00046336.K	BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)	BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)	14 (60.9)
		BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)/ BRAF c.1799-1800delinsAA p.(Val600Glu)/c.1799_1800delins AT;c.1799_1800delinsAC p.(Val600Asp)*	7 (30.4)
		BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)/ c.1799_1800delinsAT;c.1799_180 0delinsAC p.(Val600Asp)*	2 (8.7)

*La méthode utilisée ne permet pas d'identifier individuellement ces variants.

2. Résultats par laboratoire

		C00046336.K	
Labo	Méthodes utilisées		AF
1	Biocartis Idylla BRAF mutation test	BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)	NA
2	NGS Illumina Ampliseq Illumina focus panel	BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)/ c.1799_1800delinsAT; c.1799_1800delinsAC p.(Val600Asp)/ c.1799_1800delinsAA p.(Val600Glu)	NA
3	NGS Illumina Ampliseq custom panel	c.1799T>A p.(Val600Glu)	40.8%
4	ddPCR home made	c.1799T>A p.(Val600Glu)	31%
5*	Biocartis Idylla BRAF mutation test + NGS Qiagen Qiaseq AIT pour illumina	c.1799T>A p.(Val600Glu)	32%
	Biocartis Idylla BRAF mutation test + NGS Qiagen Qiaseq AIT pour illumina	c.1799T>A p.(Val600Glu)	31%
6	NGS illumina Ampliseq Illumina Focus panel	c.1799T>A p.(Val600Glu) c.1406 G>A p.(Gly469Glu)	31% 1%
7	Biocartis Idylla BRAF mutation test	V600E	NA
8	Roche Cobas 4800 BRAF V600 mutation test (rtPCR)	Val600Glu	NA
9	Biocartis Idylla BRAF mutation test	BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)/ c.1799_1800delinsAT; c.1799_1800delinsAC p.(Val600Asp)/ c.1799_1800delinsAA p.(Val600Glu)	NA
10	NGS capture Based Kapa Hyperplus library prep/Hypercap target enrichment kit (roche)	c.1799T>A p.(Val600Glu)	32%
11	Biocartis Idylla BRAF mutation test	BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)/ c.1799_1800delinsAT;	NA

		c.1799_1800delinsAC p.(Val600Asp)/ c.1799_1800delinsAA p.(Val600Glu)	
12	NGS capture Based Kapa Hyperplus library prep/Hypercap target enrichment kit (roche)	c.1799T>A p.(Val600Glu)	30%
13	NGS Illumina ampliseq V2	c.1799T>A p.(Val600Glu)	34%
14	Biocartis Idylla BRAF mutation test	BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)/ c.1799_1800delinsAT; c.1799_1800delinsAC p.(Val600Asp)/ c.1799_1800delinsAA p.(Val600Glu)	NA
15	Biocartis Idylla BRAF mutation test	BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)/ c.1799_1800delinsAT; c.1799_1800delinsAC p.(Val600Asp)	NA
16	Biocartis Idylla BRAF mutation test	BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)/ c.1799_1800delinsAT; c.1799_1800delinsAC p.(Val600Asp)/ c.1799_1800delinsAA p.(Val600Glu)	NA
17	NGS qiaseq	c.1799T>A p.(Val600Glu)	45%
18	Biocartis Idylla BRAF mutation test	BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)/ c.1799_1800delinsAT; c.1799_1800delinsAC p.(Val600Asp)/ c.1799_1800delinsAA p.(Val600Glu)	NA
19	Biocartis Idylla BRAF mutation test	BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)/ c.1799_1800delinsAT; c.1799_1800delinsAC p.(Val600Asp)	NA
20	NGS Ion Torrent custom panel ampliseq	c.1799T>A p.(Val600Glu)	34%
21	Biocartis Idylla NRAS-BRAF mutation test	c.1799T>A p.(Val600Glu)	NA
22	NGS Roche home-made Kapa Hypercap custom solid panel (73 genes)	c.1799T>A p.(Val600Glu)	30%
23	NGS home-made	c.1799T>A p.(Val600Glu)	28%

*Le laboratoire a analysé séparément les deux lames.

Distribution des fréquences alléliques rapportées pour la détection de la mutation BRAF V600E

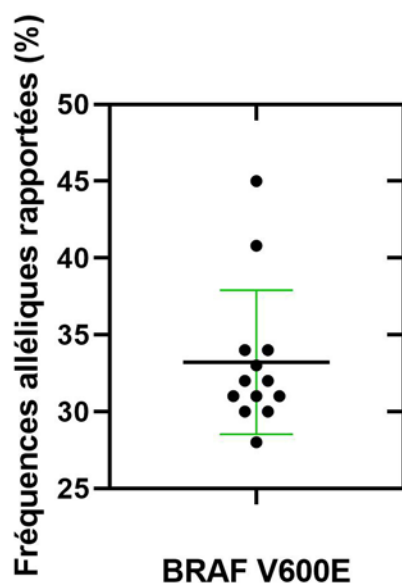


Chart 11 : Distribution des fréquences alléliques rapportées pour la détection de la mutation BRAF V600E dans l'échantillon C00046336.K.

2 laboratoires utilisant la technique NGS ont rapporté une fréquence allélique supérieure à la moyenne des fréquences allélique rapportées. Ces résultats sont sous réserve d'une possible hétérogénéité de la tumeur.

3. Commentaires

- 4 laboratoires nous ont indiqué que la présence d'une mutation BRAF était corrélée avec une réponse à une thérapie ciblée aux inhibiteurs BRAF.
- Comme décrit dans la littérature, le kit Idylla BRAF mutation test ne permet pas de distinguer individuellement les variants suivants : BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)/ c.1799_1800delinsAT p.(Val600Asp); c.1799_1800delinsAC p.(Val600Asp)/ c.1799_1800delinsAA p.(Val600Glu). En effet, ceux-ci se trouve sur le même codon.

4. Méthodes utilisées

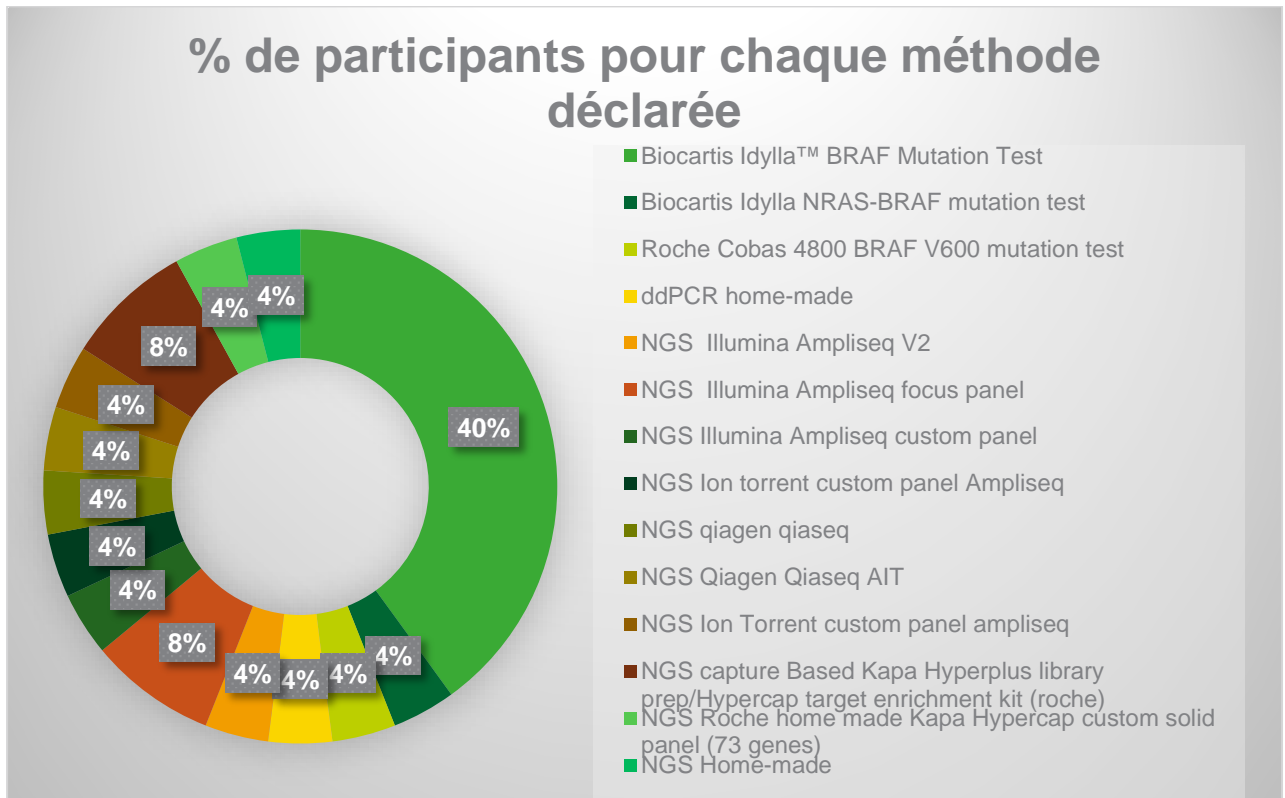


Chart 12 : Distribution des laboratoires par méthode pour la détection de mutation du gène BRAF

Les méthodes les plus utilisées par les laboratoires pour la détection de la mutation BRAFV600E sont la méthode real-time PCR (Idylla BRAF mutation test et Roche Cobas BRAF V600 Mutation test) ainsi que le NGS.

Veillez noter que suite à l'arrêt de la fabrication du kit suivant : Roche SeqCAP EZ, 2 laboratoires ont changé de kits entre 2020 et 2021. L'un a opté pour un kit Illumina, l'autre a opté pour un kit de la firme Roche.

1 autre laboratoire a changé de kits entre 2020 et 2021. Il est passé de la méthode Truseq Amplicon Illumina à l'Illumina Ampliseq V2.

Conclusions sur la performance des laboratoires

Les performances des laboratoires participants sont globalement satisfaisantes. L'ensemble des laboratoires a pu détecter la présence de la mutation BRAFV600E. Toutefois, 9 laboratoires sur les 23 n'ont pu distinguer la mutation exacte présente parmi les variants V600E V600E2 et V600D dû à la méthode utilisée. En effet, celles-ci se trouvent sur le même codon. Cela n'impacte pas la thérapie aux inhibiteurs BRAF qui découle de la présence du variant BRAFV600E.

HER 2 (2021-5)

Echantillon

Les échantillons sont des coupes FFPE de 4 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+.

Cas clinique F00105488 :

Femme de 51 ans présentant une tumeur de 2.5 cm au niveau d'un sein. Aucune particularité au niveau des ganglions lymphatiques. Description microscopique : carcinome canalaire invasif pas autrement spécifié de grade G2. 3 ganglions sur les 10 examinés présentent des métastases. Le résultat de l'immunohistochimie pratiquée en amont est IHC3+ (ER-positif et PR-négatif).

Cas clinique F00111263 :

Femme de 68 ans présentant un carcinome invasif modérément différencié de type non spécial ; de grade G2 et de stade III-C située au niveau du sein gauche. NPI=6 ; UICC TNM : T2N3aMO. 14 ganglions lymphatiques sur 14 présentent des métastases. Aucune autres métastases localisées. Le résultat de l'immunohistochimie pratiquée en amont est IHC2+ (ER-positif et PR-positif).

Participation

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

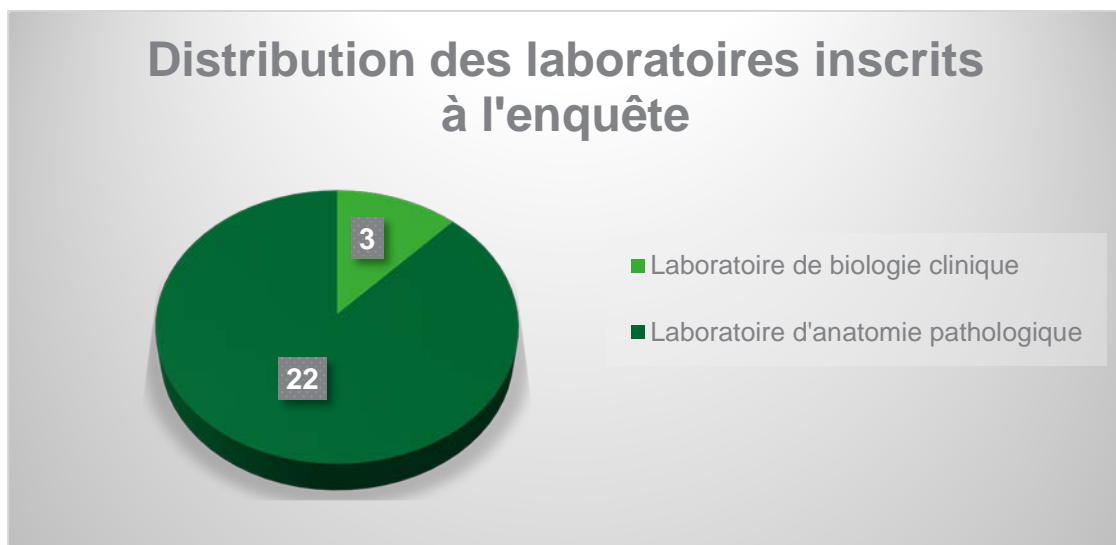


Chart 13 : Distribution des laboratoires inscrits par spécialités

Tous les laboratoires inscrits ont participé à l'enquête.

Résultats

Les laboratoires ont reçu 2 lames FFPE pour 2 cas cliniques différents soit 4 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. Il était également demandé aux laboratoires la méthode utilisée pour la détection de la mutation ainsi que les guidelines suivies.

1. Résultats par échantillon

Echantillon	Résultats attendus	Résultats encodés	Nombre de laboratoires (%)
F00105488	HER2 amplifié	HER2 amplifié	25 (100)
F00111263	HER2 équivoque (non amplifié*)	HER2 non amplifié	25 (100)

*Déterminé par consensus des réponses des laboratoires participants

Au contraire de ce qui a été indiqué sur le rapport préliminaire 25 laboratoires (et non 24) ont détecté l'amplification du gène HER2 dans le cas F00105488. Après contact avec le laboratoire ayant initialement répondu « non amplifié », celui-ci nous a confirmé une erreur lors du rapportage des résultats et nous a envoyé ses données brutes.

2. Résultats par laboratoire

Labo	Méthodes utilisées	F00105488	F00111263
		Amplifié	Non Amplifié
1	Abbott/Vysis Path Vision HER2 DNA probe kit	X	X
2	Ventana Dual ISH DNA probe cocktail assay (new-2020)	X	X
3	Abbott/Vysis Path Vision HER2 DNA probe kit	X	X
4	Ventana Dual ISH DNA probe cocktail assay (new-2020)	X	X
5*	Ventana Dual ISH DNA probe cocktail assay (new-2020)	X	X
6	Abbott/Vysis Path Vision HER2 DNA probe kit	X	X
7	Ventana Dual ISH DNA probe cocktail assay (new-2020)	X	X
8	Ventana Dual ISH DNA probe cocktail assay (new-2020)	X	X
9	DAKO HER2 FISH PharmDX	X	X
10	Ventana Dual ISH DNA probe cocktail assay (new-2020)	X	X
11	DAKO HER2 FISH PharmDX	X	X
12	Ventana Dual ISH DNA probe cocktail assay (new-2020)	X	X
13	Ventana Dual ISH DNA probe cocktail assay (new-2020)	X	X
14	Ventana Dual ISH DNA probe cocktail assay (new-2020)	X	X
15	DAKO HER2 FISH PharmDX	X	X
16	Ventana Dual ISH DNA probe cocktail assay (new-2020)	X	X

17	Ventana Dual ISH DNA probe cocktail assay (new-2020)	X	X
18	DAKO HER2 FISH PharmDX	X	X
19	Ventana Dual ISH DNA probe cocktail assay (new-2020)	X	X
20	Ventana Dual ISH DNA probe cocktail assay (new-2020)	X	X
21	Ventana Dual ISH DNA probe cocktail assay (new-2020)	X	X
22	Abbott/Vysis Path Vision HER2 DNA probe kit	X	X
23	DAKO HER2 FISH PharmDX	X	X
24	Ventana Dual ISH DNA probe cocktail assay (new-2020)	X	X
25	Ventana Dual ISH DNA probe cocktail assay (new-2020)	X	X

*Ce laboratoire nous avait initialement indiqué que l'échantillon F00105488 était non amplifié. Nous avons contacté ce laboratoire après publication du rapport préliminaire et celui-ci nous a envoyé ses données brutes (Ratio Her2/CEP17=14.33) affirmant bien que l'échantillon était amplifié. Il s'agit d'une erreur lors du remplissage du formulaire papier.

3. Commentaires

- 6 laboratoires nous ont indiqué un décollement d'une partie du tissu. L'analyse ayant été néanmoins réalisable.
- 1 laboratoire nous a indiqué avoir obtenu un signal rouge trop faible. Cela est peut-être dû à la phase préanalytique réalisée par la firme ou du type de lames utilisées.
- 3 laboratoires nous ont fait part des ratio HER2/CEP17 qu'ils avaient eu pour chaque cas :
 - F00105488 : 12.4 (méthode Ventana) ; 7,91 (méthode Ventana) ; 5.29 (méthode Abbott Vysis)
 - F00111263 : 1.3 (méthode Ventana) ; 1.4 (méthode Ventana) ; 1.05 (méthode Abbott Vysis)

4. Méthodes utilisées

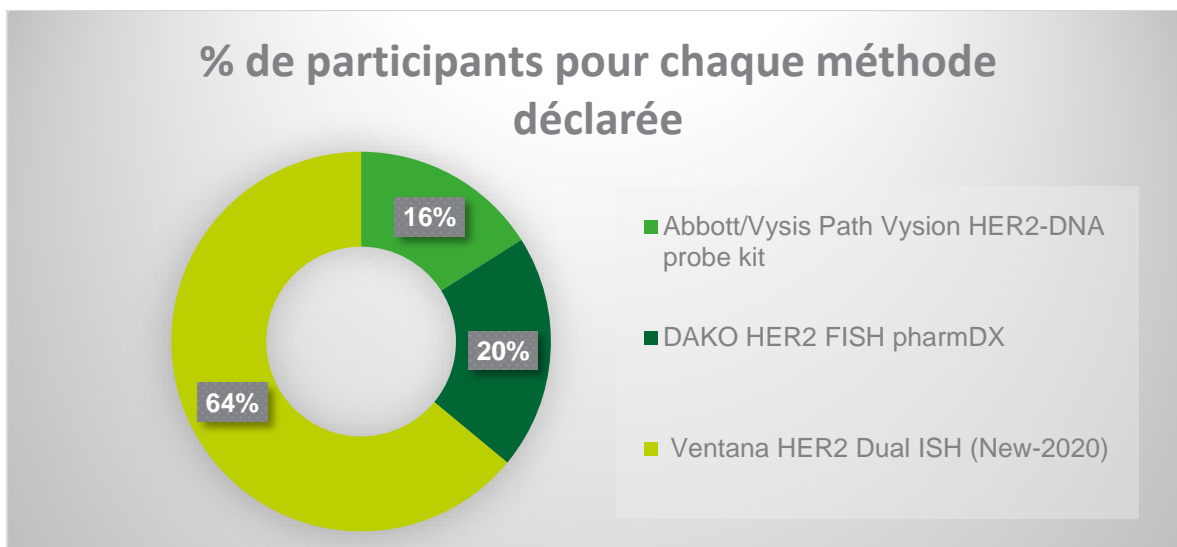


Chart 14 : Distribution des laboratoires par méthode pour la détection de l'amplification du gène HER2

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

5. Guidelines utilisées

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

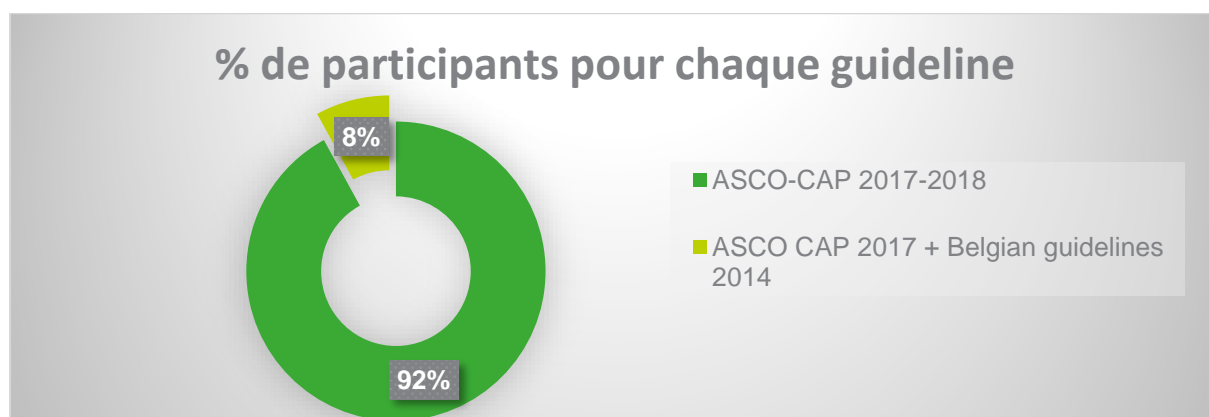


Chart 15 : Distribution des laboratoires en fonction des guidelines utilisées pour l'interprétation de l'analyse HER2

Conclusions sur les performances des laboratoires

Les performances des laboratoires sont globalement satisfaisantes pour cette enquête. De manière générale, 100% des laboratoires ont détecté l'amplification de HER2 dans l'échantillon « amplifié. ». Pour l'échantillon équivoque, l'ensemble des participants a indiqué un échantillon « non amplifié ».

Le laboratoire ayant fait une erreur lors du remplissage du formulaire a notifié cela dans son système qualité afin de documenter cet événement.

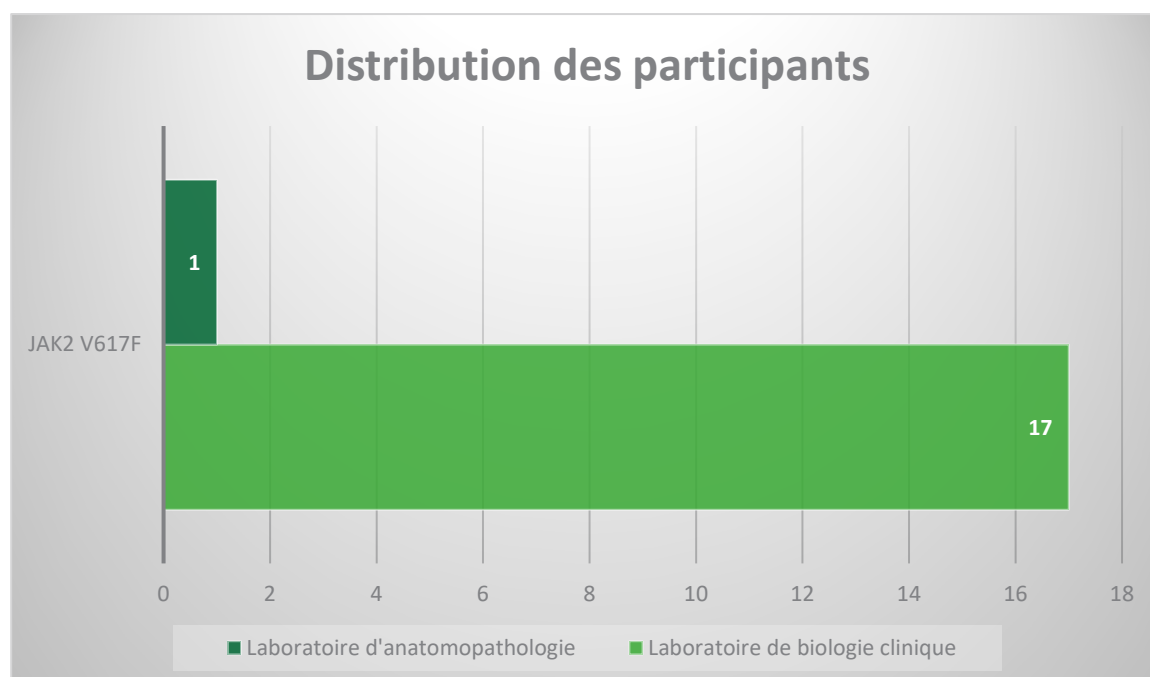
Myéloïde : JAK2

Echantillons

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.

Participation

18 laboratoires se sont inscrits pour l'enquête JAK2. La distribution des participants s'effectue comme suit :



Résultats

Les laboratoires ont reçu deux tubes contenant respectivement 100µl et 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 et de fournir leur réponse selon la nomenclature HGVS. Les laboratoires avaient également la possibilité d'indiquer la présence d'autres mutations que JAK2 V617F.

1. Résultats par échantillon

Echantillon	Résultats attendus (AF)	Résultats encodés	Nombre de laboratoires (%)
<u>JK2021-1</u>	JAK2:c.1849G>T (p.Val617Phe) NON DETECTEE	DETECTEE	0
		NON DETECTEE	18 (100)
		NON DETERMINE	0
<u>JK2021-2</u>	JAK2:c.1849G>T (p.Val617Phe) (50%) DETECTEE	DETECTEE	18 (100)
		NON DETECTEE	0
		NON DETERMINE	0

Contrairement à ce qui a été indiqué dans le rapport préliminaire, l'ensemble des laboratoires ont détecté la mutation attendue. Après contact, le laboratoire qui avait indiqué avoir détecté la mutation dans l'échantillon JK2021/1 nous a indiqué avoir fait une erreur lors de l'encodage des résultats sur le formulaire papier. Ce laboratoire a bien détecté la mutation dans l'échantillon JK2021-2.

2. Résultats par laboratoire

Lab	Méthodes utilisées	JK2021-1	JK2021-2 (AF)
		JAK2 WT	JAK2:c.1849G>T (p.Val617Phe) (50%)
1	NGS illumina Truesight Myeloid kit	X	X (51.1%)
2	ddPCR Mutation Assay JAK2V617F biorad	X	X (51%)
3	qPCR LDT	X	x
4*	qPCR Ipsogen JAK2 Mutaquant Kit + illumina Truesight Myeloid kit	X	X (41%)
5	qPCR Ipsogen JAK2 Mutaquant Kit	X	X (41,2%)
6	LNA-qPCR home made (Sidon et al. Clin chem 2006)	X	X
7	LNA-qPCR home made	X	X (28%)
8	LNA-qPCR in house	X	X (49%)
9	qPCR home made	X	X (22.98%)
10	Illumina Truesight Myeloid kit	JAK2 WT BRAF c.1039C> T:p.(Arg347*) (35%) EZH2 c.1184delG:p.(Gly395Glufs*29) (33%) IKZF1 c.42G>A:p.(Trp15*) (33%) TET2c.3985C>A:p.(Leu1329Met) (57%)	JAK2 c.1849G>T (p.Val617Phe) (53.19%) BRAF c.1039C> T:p.(Arg347*) (34%) EZH2 c.1184delG:p.(Gly395Glufs*29) (34%) IKZF1 c.42G>A:p.(Trp15*) (31%) TET2c.3985C>A:p.(Leu1329Met) (52%)
11	qPCR home made	X	X (23.3%)
12	ddPCR Mutation Assay JAK2V617F biorad	X	X (51%)
13	qPCR home Made (Denys et al. JMD diagnostics)	X	X (44.4%)
14	LNA-PCR home made (Denys et al. 2010)	X	X (44.2%)
15	qPCR Ipsogen Jak2 Mutascreen Kit	X	X
16	NGS Illumina Ampliseq Myeloid Panel	X	X (51%)
17**	qPCR Home Made Melting Curve	X	X
18	ddPCR Mutation Assay JAK2V617F biorad	X	X (50.5%)

*Le laboratoire nous a indiqué une livraison tardive de l'échantillon sur son formulaire de réponse. L'échantillon est donc resté à température ambiante durant un laps de temps inconnu.

******Ce laboratoire nous avait initialement indiqué avoir détecté la mutation JAK2:c.1849G>T (p.Val617Phe) dans l'échantillon JK2021-1 (échantillon WT). Après contact et envoi de ses données brutes, il apparaît que celui-ci a fait une erreur lors de l'encodage et a bien détecté la mutation dans l'échantillon JK2021-2.

Distribution des fréquences alléliques rapportées pour la détection de la mutation JAK2 V617F

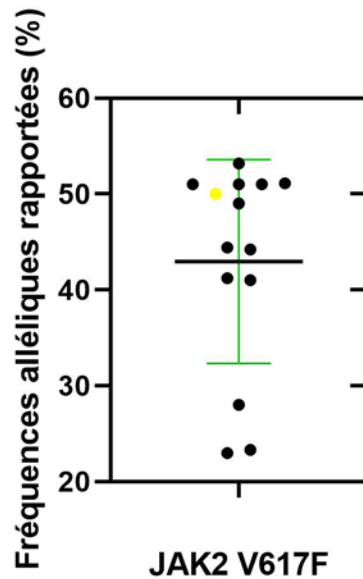


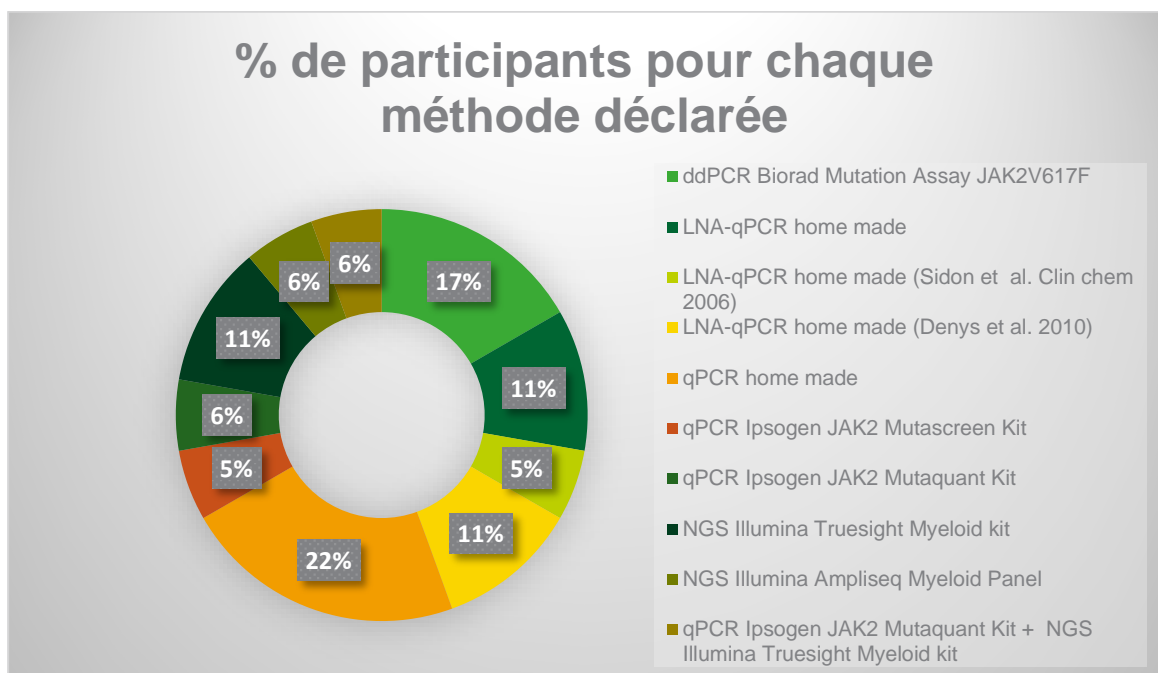
Chart 16 : Distribution des fréquences alléliques rapportées pour la détection de la mutation JAK2 V617F dans l'échantillon JK2021-2. Le point jaune représente la fréquence allélique donnée par le fournisseur.

3 laboratoires ayant utilisé une méthode (LNA) qPCR home made ont obtenu une fréquence allélique largement inférieure à la fréquence allélique attendue ainsi qu'à la moyenne des fréquences alléliques rapportées. Nous conseillons à ces laboratoires d'effectuer une vérification au niveau de la validation de leur technique. En effet, des éléments tels que la spécificité des primers ou encore la température peuvent jouer sur la fréquence allélique obtenue. Au besoin, ces laboratoires peuvent contacter le coordinateur d'enquête afin d'obtenir un nouvel échantillon pour vérification/validation.

3. Commentaires

- Les résultats fournis par le laboratoire ayant reçu l'échantillon tardivement sont sous réserve d'une possible altération de l'échantillon par les conditions de température non conforme.

4. Méthodes utilisées



Les méthodes les plus utilisées pour la détection de la mutation JAK2 V617F sont la technique qPCR (33%) et la technique Locked Nucleic Acid (LNA)-qPCR (27%).

1 laboratoire a semble-t-il changé de méthode entre 2020 et 2021. Il avait indiqué en 2020 avoir utilisé une électrophorèse sur gel. En 2021, celui-ci a indiqué avoir utilisé les méthodes qPCR Ipsogen JAK2 Mutaquant Kit et illumina Truesight Myeloid kit.

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 ont détecté la mutation JAK2 V617F dans l'échantillon correspondant. Pour Le laboratoire ayant fait une erreur d'écriture lors du remplissage du formulaire papier, il lui a été conseillé de documenter cet évènement dans son système qualité.

Evaluation externalisée : Détection de mutations dans le gène du facteur II et le gène du facteur V (ECAT)

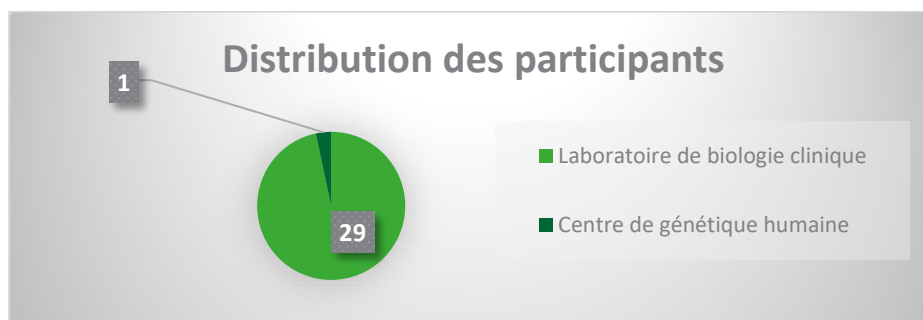
L'enquête a été externalisée auprès de notre fournisseur européen partenaire, *ECAT-External quality Control of diagnostic Assays and Tests* (<https://www.ecat.nl/>). Les participants belges ont été inscrits par Sciensano chez notre partenaire. Celui-ci a ensuite contacté *RfB-Reference institut for Bioanalytic* (<https://www.rfb.bio/cgi/surveys>) qui est l'organisateur des enquêtes de génétique moléculaire que l'ECAT propose.

Echantillons

Les participants belges ont été inscrits à l'enquête « Molecular genetics 1-SET A » comprenant l'analyse d'un échantillon d'ADN lyophilisé pour la détection de la mutation du gène de la prothrombine et la détection de la mutation du gène du facteur V-Leiden.

Participation

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



- 2 laboratoires se sont désinscrits après l'envoi des échantillons suite à une incompatibilité entre leur méthode et l'échantillon d'ADN lyophilisé envoyé.
- 3 laboratoires se sont désinscrits suite à une double inscription. Ces laboratoires s'étaient eux-mêmes inscrits chez RfB et n'avaient pas averti Sciensano de cette inscription.

Résultats

Les résultats ont été fournis pour RfB. Le fournisseur n'a pu nous fournir qu'une vue globale des résultats bien que nous ayons l'accord des laboratoires pour avoir accès à leurs résultats.

Nous n'avons donc pas de données sur les méthodes utilisées par les laboratoires.

1. Résultats par échantillon

Mutation à détecter pour le gène de la prothrombine : **NM_000506.5(F2):c.*97G>A (Gly20210A1a)**

Facteur II (prothrombine)	Résultats attendus (AF)	Résultats encodés	Nombre de laboratoires (%)
Echantillon 1	G/G (homozygote WT)	G/G	23 (100)
		G/A	0
		A/A	0
Echantillon 2	G/A (heterozygote: G20210A)	G/G	2 (8.7)
		G/A	20 (86.9)
		A/A	1 (4.3)

Mutation à détecter dans le gène du facteur V : **NM_000130.4(F5):c.1601G>A (p.Arg534Gln)**

Facteur V-Leiden	Résultats attendus (AF)	Résultats encodés	Nombre de laboratoires (%)
<u>Echantillon 1</u>	Q/Q (homozygote WT)	R/R	0
		R/Q	0
		Q/Q	23 (100)
<u>Echantillon 2</u>	R/Q (hétérozygote: R506Q)	R/R	1 (4.3)
		R/Q	21 (91.3)
		Q/Q	1 (4.3)

2. Commentaires

- Les résultats de 23 laboratoires sur les 25 participants nous ont été communiqués par RfB.
- Pour la détection de la mutation dans le gène du facteur II, 2 laboratoires ont répondu homozygote WT et un laboratoire a répondu homozygote muté pour l'échantillon 2 alors que celui-ci présente la mutation sous forme hétérozygote.
- Pour la détection de la mutation dans le gène du facteur V, 1 laboratoire a répondu homozygote WT et un laboratoire a répondu homozygote muté pour l'échantillon 2 alors que celui-ci présente la mutation sous forme hétérozygote.

Conclusions sur les performances des laboratoires

Les résultats que nous avons obtenus de la part de l'organisateur pour les laboratoires belges sont satisfaisants.

Pour l'année 2022, 23 laboratoires ont déjà été inscrits auprès de notre partenaire ECAT. Les laboratoires ont été prévenus de leur inscription auprès de la firme fin novembre.

Annexes

1. Communiqué de la firme Roche concernant le kit Cobas EGFR Mutation Test V2



Product Care

Vigilance information

Molecular Diagnostics

31 August 2021

cobas® EGFR Mutation Test v2: Potential for False Mutation Detected results for exon20 Insertion.

ACTION | Roche received complaints reporting the generation of false Mutation Detected results for the exon20 insertion (Ex20Ins) mutation when using the cobas EGFR Mutation Test v2.

cobas® EGFR Mutation Test v2

07248563190 cobas® EGFR Mutation Test v2

Description of the situation

Roche received complaints reporting the generation of false Mutation Detected results for the exon20 insertion (Ex20Ins) mutation when using the **cobas®** EGFR Mutation Test v2.

In a majority of the escalated cases, it was noted that end users were extracting DNA from more than one 5-micron (μm) FFPET section or from sections with varying thicknesses.

The **cobas®** DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) Instructions for Use, which provide the specific instructions for the isolation of DNA from tissue specimens for the **cobas®** EGFR Mutation Test v2, specify to use one 5- μm FFPET section for sample preparation.

The **cobas®** EGFR Mutation Test v2 Instructions for Use indicate,

- Each DNA stock must have a minimum concentration of 2 ng/ μL to perform the test. If the concentration of a DNA Stock is < 2 ng/ μL , repeat the deparaffinization, DNA isolation, and DNA quantitation procedures for that sample using two 5- μm FFPET sections.
- If the DNA stock is still < 2 ng/ μL , request another FFPET sample section from the referring clinical site.

The root cause investigation is currently ongoing. During in-house testing, using customer-provided FFPET samples, an Ex20Ins false Mutation Detected result was reproduced for one FFPET sample, which was processed following the validated sample preparation method from the Instructions for Use. Based on the observed data, the false Mutation Detected Ex20Ins results presented as low-positive samples.

The generation of Ex20Ins false Mutation Detected results with plasma specimens has not been excluded.

Frequency of Occurrence

As of 18-Aug-2021, sixteen (16) escalated cases have been confirmed to be related to this issue. In a subset of these escalated cases, end users reported an increase in their Ex20Ins Mutation Detected positivity rates.

EGFR Ex20Ins mutations occur in ~2-3% of all non-small cell lung cancer (NSCLC) cases, representing ~10-12% of all cancers with documented EGFR mutation (<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102105>).

Detectability

False Mutation Detected Ex20Ins results can be detected if sequencing or other PCR-based tests are performed.

Severity

A false Mutation Detected Ex20Ins result could lead to harm depending on several scenarios described below, some of them being unlikely or extremely unlikely to occur:

- A standalone False Mutation Detected Ex20Ins result may lead to:
 - Inappropriate administration of amivantamab (US FDA approved in May-2021), delaying Standard of Care (SOC) therapy (chemotherapy or Immunotherapy) by 2-3 months. The amivantamab impacts are not applicable in countries where the drug is not available.
 - Delay of SOC immunotherapy in select ex-US countries, where there is disapproval of immunotherapy administration in the presence of any EGFR mutation based on local guidelines and regulations.
- A False Mutation Detected Ex20Ins result in combination with a sensitizing EGFR mutation (e.g., Exon 19 deletion, L858R) at the time of diagnosis, in rare cases, might lead to ineffective treatment (amivantamab) rather than appropriate therapy with an EGFR TKI. However, it is likely the physician would prescribe the appropriate EGFR TKI, rather than amivantamab.
- Although extremely unlikely, a False Mutation Detected Ex20Ins result in combination with a sensitizing mutation in patients who have progressed on an EGFR TKI (including osimertinib) could lead to delay of SOC by 2-3 months.
- While extremely unlikely, theoretically, a False Mutation Detected Ex20Ins result in combination with a resistance EGFR T790M mutation at progression on an EGFR TKI could lead to an ineffective therapy (amivantamab), delaying treatment with osimertinib by 2-3 months.

Actions taken by Roche Diagnostics

Roche continues the root cause investigation.

Actions to be taken by the customer/user

Customers must follow the **cobas**[®] DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) IFU for sample input. If an Ex20Ins Mutation Detected result is generated with the **cobas**[®] EGFR Mutation Test v2, customers must confirm the result with another method (e.g., sequencing or other PCR-based tests).

Clinical laboratories should consider the availability and approval status of amivantamab in their country as well as eligibility for immunotherapy as part of SOC in the presence of any EGFR mutation when determining the date range of test result reports (TRR) of the **cobas**[®] EGFR Mutation Test v2 that must be reviewed retrospectively, and should follow local guidelines and procedures.

Please share this information with the appropriate person in your laboratory.


May we ask you to respond to the following address (vilvoorde.safety@roche.com): I have received the vigilance information on cobas EGFR Mutation Test v2.

We sincerely apologise for any inconvenience that is caused by this issue.

For any additional support, do not hesitate to contact our Regional Support by phone [02 247 45 86](tel:022474586) (NL) / [02 247 45 88](tel:022474588) (FR). You can also create a case via Online support. To do so, go to dialog.roche.com or scan the following QR code:



This information can also be found on www.e-labdoc.be.



Katrien Royackers
Head of marketing



Marijke Mertens
Safety and Regulatory Affairs Officer

© Sciensano, Bruxelles 2022.

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.