

**EXPERTISE EN DIENSTVERLENING  
KWALITEIT VAN LABORATORIA**

***AD HOC* EXPERTENCOMITE**

**DEFINITIEF GLOBAAL RAPPORT  
Next Generation Sequencing (NGS)**

**Vaste tumoren**

**2021/1**

**Sciensano/NGS EKE/8-NL**

Expertise en dienstverlening  
Kwaliteit van laboratoria  
J. Wytsmanstraat, 14  
1050 Brussel | België

[www.sciensano.be](http://www.sciensano.be)

## AD HOC EXPERTENCOMITE

<b>Sciensano</b>					
Secretariaat		TEL:	02/642.55.22	FAX:	02/642.56.45
Aline Antoniou	Enquêtecöördinator	TEL:	02/642.55.27		
		e-mail:	<a href="mailto:Aline.Antoniou@sciensano.be">Aline.Antoniou@sciensano.be</a>		
Vanessa Ghislain	Vervanger enquêtecöördinator	TEL:	02/642.52.08		
		e-mail:	<a href="mailto:Vanessa.Ghislain@sciensano.be">Vanessa.Ghislain@sciensano.be</a>		
<b>Experten</b>	<b>Instelling</b>				
Anne-France Dekairelle	UCL				
Koen Jacobs	AZ-St-Lucas Hospital Ghent				
Suzan Lambin	UZ Antwerp				
Brigitte Maes	Jessa Hospital Hasselt				
Sara Vander Borght	UZ Leuven				
Suzanne Vanhauwaert	UZ Ghent				
Pascal Vannuffel	IPG				
Stefanie Vermeire	AZ Sint-Jan Brugge				
Thomas Delcourt	Sciensano				
Nicolas Loucheu	Sciensano				
Aline Hébrant	Sciensano				
Els Van Valckenborgh	Sciensano				
Mohamed Rida Soumali	Sciensano				
Marc Van Den Bulcke	Sciensano				

De voorlopige versies van dit rapport werden voorgelegd aan de experten op: 10/05/2021, 21/05/2021 en 26/05/2021.

Dit rapport werd besproken in de vergadering van het *ad hoc* expertencomité van: 28/05/2021.

**Verantwoordelijkheden:**

Het *ad hoc* expertencomité werd voor advies geraadpleegd over de inhoud van het globaal rapport, de interpretatie van de resultaten, de evaluatiecriteria en de organisatie van de volgende evaluaties. De verantwoordelijkheid voor de selectie van de gebruikte stalen en het definitieve ontwerp van de studie wordt door de dienst Kwaliteit van laboratoria van Sciensano genomen.

**Autorisatie verspreiding rapport:** Door Aline Antoniou, enquêtecoördinator van de NGS-EKE, op 14/06/2021.

Alle rapporten zijn tevens te raadplegen op onze website:  
[https://www.wiv-isp.be/QML/activities/NGS/nl/rapports\\_annee.htm](https://www.wiv-isp.be/QML/activities/NGS/nl/rapports_annee.htm)

# INHOUDSTAFEL

<b>1. INLEIDING.....</b>	<b>5</b>
1.1. Doel van de EKE– vaste tumoren .....	5
1.2. Uitbestede activiteit.....	5
1.3. Materiaal.....	5
1.4. Vraag .....	5
1.5. Evaluatiecriteria .....	7
<b>2. RESULTATEN .....</b>	<b>8</b>
2.1. Deelname .....	8
2.2. Overzicht van de methoden .....	8
2.3. Overzicht van de resultaten.....	12
2.3.1. NGS 2021-1.....	12
2.3.2. NGS-2021-2.....	14
2.3.3. NGS-2021-3.....	16
2.3.4. Slaagpercentage van de deelnemers .....	18
<b>3. BIJLAGE.....</b>	<b>19</b>
3.1. Overzicht van de klinische conclusies.....	19
3.1.1. NGS-2021-1.....	19
3.1.2. NGS-2021-2.....	22
3.1.3. NGS-2021-3.....	25
3.2. Interpretatie van het individueel rapport .....	28

## 1. **INLEIDING**

De organisatie van EKE maakt deel uit van het nationale proefproject voor de invoering van de NGS-technologie in onze gezondheidszorg, dat begon in januari 2016. Alle informatie over het NGS-proefproject is te vinden in het NGS Roadbook:

[https://www.compermed.be/docs/Roadbook%20PersMed%20NGS%20NL\\_0.pdf](https://www.compermed.be/docs/Roadbook%20PersMed%20NGS%20NL_0.pdf)

### 1.1. **Doel van de EKE – vaste tumoren**

Deze EKE heeft als doel de stand van zaken na te gaan betreffende de wijze waarop somatische varianten in de vaste tumoren worden gedetecteerd, geselecteerd en gerapporteerd in het patiënten rapport.

### 1.2. **Uitbestede activiteit**

De genomische DNA-stalen werden geproduceerd door de firma SeraCare en werden verdeeld door de firma Sopachem.

### 1.3. **Materiaal**

Het materiaal voor deze studie bestond uit:

- 3 tubes genomisch DNA (Volume: 10µl, Concentratie: ongeveer 50 ng/µl), afkomstig van 3 verschillende stalen met de volgende referentie: NGS-2021-1, NGS-2021-2 en NGS-2021-3.

De stalen werden voor de homogeniteit en de stabiliteit door de leverancier gevalideerd.

### 1.4. **Vraag**

De stalen moesten geanalyseerd worden volgens de in het laboratorium geldende procedures voor de volgende maligniteiten:

NGS-2021-1: Long adenocarcinoom

NGS-2021-2: Colorectaal adenocarcinoom

NGS-2021-3: Melanoom

Voor elk staal werd er gevraagd om alle varianten die volgens de geldende procedures van het laboratorium zouden worden gerapporteerd in het klinisch rapport van de patiënt, door te geven, maar enkel voor die regio's die zijn beschreven in de NGS overeenkomst en volgens de ComPerMed workflows (dus niet de andere eventueel geïdentificeerde varianten) :

<https://www.inami.fgov.be/nl/professionals/verzorgingsinstellingen/laboratoria/Paginas/oncologie-terugbetaling-moleculair-biologische-ngs.aspx>

<https://www.compermed.be/nl/workflows#/>

staal	Klinische context	genen
NGS-2021-1	Long adenocarcinoom	BRAF (exon 15 (codon 600)) EGFR (exon 18, exon 19, exon 20, exon 21) KRAS (exon 2 (codons 12,13), exon 3 (codons 59, 61), exon 4 (codons 117, 146)) MET exon 14 skipping HER2 (exon 20)
NGS-2021-2	Colorectaal adenocarcinoom	BRAF (exon 15 (codon 600)) KRAS (exon 2 (codons 12,13), exon 3 (codons 59, 61), exon 4 (codons 117, 146)) NRAS (exon 2 (codons 12,13), exon 3 (codons 59, 61), exon 4 (codons 117, 146))
NGS-2021-3	Melanoom	BRAF (exon 15 (codon 600)) KIT (exon 9, exon 11, exon 13, exon 17, exon 18) NRAS (exon 2 (codons 12,13), exon 3 (codons 59, 61), exon 4 (codons 117, 146))

Er werd ook gevraagd om de aanbevelingen van ComPerMed en van MolecularDiagnostics.be over de interpretatie van varianten en de inhoud van klinische rapporten van NGS te raadplegen die gepubliceerd werden op de website van BELAC:

<https://economie.fgov.be/sites/default/files/Files/Publications/files/Belac-NL/2-405NGS-NL.pdf>

Op de antwoordwebsite: <https://qml.wiv-isp.be/NGS/20211> werd er aan de deelnemers gevraagd:

- De vragenlijst met betrekking tot de analysemethode in te vullen.
- De gevraagde parameters in te voeren voor elke geïdentificeerde en in het klinisch rapport gerapporteerde variant:
  - Naam van het gen en het bijhorend NM nummer (multiple choice)
  - Referentie nomenclatuur van de coderende DNA sequentie volgens HGVSn: <http://varnomen.hgvs.org/>
  - Referentie nomenclatuur van de proteïne sequentie volgens HGVS<sub>p</sub>: <http://varnomen.hgvs.org/>
  - Allelfrequentie
  - Biologische classificatie (multiple choice)
  - Klinische classificatie (multiple choice)
- Een algemene conclusie te schrijven voor elke klinische casus in de vorm van een vrije tekst.
- Er werd aan de deelnemers gevraagd om via de hen toegestuurde belnet-link de ruwe data (fastq, bam, bai en vcf bestanden) door te sturen voor elk staal, de BED file(s) met de regio's die het gebruikte panel bevat en de bestanden met de posities en sequenties van de primers die gebruikt werden bij de verrijkingsmethode (MANIFEST, BED, ...).

## 1.5. Evaluatiecriteria

Dit rapport bevat de resultaten van de 20 deelnemende laboratoria. Voor de identificatie van de varianten, zijn de evaluatiecriteria gebaseerd op de consensus van de laboratoria met een drempelwaarde van 2/3 van de deelnemers.

In detail zijn de evaluatiecriteria:

1/ De identificatie van alle varianten gerapporteerd door ten minste 2/3 van de deelnemers, aanwezig in de 3 stalen: consensus voor de te-rapporteren varianten. De mediane waarden van de allerequenties die de laboratoria voor deze varianten rapporteerden, worden alleen ter informatie weergegeven, net zoals de SD-waarden.

2/ De afwezigheid van de varianten gerapporteerd door minder dan 1/3 van de deelnemers, voor de 3 stalen: consensus voor de niet-te-rapporteren varianten.

Opmerkingen: De varianten gerapporteerd door 1/3 tot 2/3 van de laboratoria worden ook gedetailleerd beschreven in de rapporten en worden enkel ter informatie weergegeven: geen consensus. Een variant met een consensus die door de laboratoria werd gevonden, kan niet worden geëvalueerd indien de groep van experts deze consensus niet valideert.

Wat betreft de biologische en klinische interpretaties, voor de consensus voor de te-rapporteren varianten, worden de antwoorden van de laboratoria gerangschikt als 'verwacht resultaat' (in groen), 'aanvaardbaar resultaat' (in geel), 'niet-aanbevolen maar aanvaardbaar' (in oranje), 'niet-aanvaardbaar resultaat' (in rood) of 'niet-geëvalueerd resultaat' (in grijs). Deze categorieën worden door een groep van experts gedefinieerd door de resultaten van de consensus van de laboratoria te vergelijken met de resultaten die werden verkregen met behulp van de Belgische richtlijnen.

De inhoud van de algemene conclusies die door de laboratoria werden gerapporteerd, wordt geclassificeerd op basis van standaardinformatie die door ten minste twee laboratoria werd opgenomen.

## 2. RESULTATEN

### 2.1. Deelname

20 Belgische laboratoria werden opgenomen in de analyse van de resultaten.

#### Overzicht van de deelnemers

Regio	N
Vlaams Gewest	13
Brussels Hoofdstedelijk Gewest	4
Waals Gewest	3
Totaal	20

Laboratorium	N
Pathologische anatomie	11
Klinische biologie	7
Humane genetica	2
Totaal	20

### 2.2. Overzicht van de methoden

#### Q1. Welke referentiegenoom gebruikt u voor de analyse?

Antwoorden	N
hg18	1
hg19/GRCh37	18
hg38/GRCh38	1

#### Q2. Welke sequencer gebruikt u voor NGS analyses voor vaste tumoren (firma en platform)?

Antwoorden	N
Illumina - MiSeq	10
Illumina - NextSeq 550	4
Illumina - NextSeq 550Dx	1
Illumina - NovaSeq 6000	1
Qiagen - GeneReader	1
ThermoFisher/Ion Torrent - Ion GeneStudio S5	1
ThermoFisher/Ion Torrent - Ion PGM	1
ThermoFisher/Ion Torrent - Ion S5	1

#### Q3. Welke genpanels worden gebruikt voor NGS analyses op DNA voor vaste tumoren (naam van commerciële en / of custom kits)?

Antwoorden	N
Custom panel, QIASeq, Qiagen	4
Custom panel, SeqCap EZ HyperCap, Roche	4
Custom panel, SeqCap, Roche	3
Custom panel, AmpliSeq, Illumina	3
Custom panel, Ion AmpliSeq, ThermoFisher	2
Custom panel, KAPA HyperCap, Roche	1
SureMASTR Tumor Hotspot, Agilent	2
Focus Ampliseq panel, Illumina	2
AmpliSeq Cancer Hotspot Panel V2, Illumina	1
GeneRead QIAact AIT DNA UMI panel, Qiagen	1
Oncomine focus assay, ThermoFisher	1

#### Q4. Welke verrijkingstrategie wordt gebruikt voor NGS analyses op DNA voor vaste tumoren?

Antwoorden	N
Amplicon-based	13
Probe-based	7



**Q5. Is/zijn uw methode(s) single of paired-end?**

Antwoorden	N
Paired-end	18
Single-end	2

**Q6. Wat is de lengte van de reads gegenereerd door uw methode?**

Antwoorden	N
100	1
120	2
141	1
150	11
151	3
251	1
360	1

**Q7. Welke bioinformatica softwares worden gebruikt voor de data analyse?**

Antwoorden	N
Open source/in house development	7
CLC Genomics Workbench, Qiagen	3
Ion Reporter Software, ThermoFisher/Ion Torrent	3
Variant Studio Software, Illumina	3
QCI Interpret-Somatic Cancer, Qiagen	2
SeqNext, JSI medical systems	2
Sophia DDM, Sophia Genetics	2
MASTR Reporter, Multiplicom	1
NextGENe Software, SoftGenetics	1

Opmerkingen: De bio-informatica tools in *open source* werden gebruikt met de volgende combinaties: 1/BWA, GATK Unified Genotyper, Annotvar, 2/bcbio, 3/ vardict, 4/Plugins ThermoFisher

**Q8. Welke categorieën van somatische varianten worden gedetecteerd door uw NGS methode gebruikt voor vaste tumoren op DNA? + detectielimiet voor de totale sequentiediepte (X) en detectielimiet voor de allelfrequentie van de variant (VAF %)**

SNV detectielimiet voor de allelfrequentie (%)	SNV detectielimiet voor de totale sequentiediepte (X)	N
2,5	1000	1
2,5	1250	1
3	300	1
3	400	1
4	500	1
4	1000	1
5	100	1
5	300	5
5	350	3
5	500	3
5	1000	1
Based on sequencing depth	100	1
indels detectielimiet voor de allelfrequentie (%)	indels detectielimiet voor de totale sequentiediepte (X)	N
2,5	1000	1
2,5	1250	1
3	150	1
3	300	1
3	400	1
4	500	1
4	1000	1
5	100	1
5	300	4
5	350	3
5	500	3
5	1000	1
Based on sequencing depth	100	1
CNV detectielimiet voor de allelfrequentie (%)	CNV detectielimiet voor de totale sequentiediepte (X)	N
/	300	3

**Q9. Welk type staal wordt in uw laboratorium gesequeneerd voor het opsporen van somatische varianten?**

Antwoorden	N
Paraffineweefsel	20
Cytologisch vocht	7
Vers weefsel	2
Circulerend tumor-DNA	2
Uitstrijkje	1

**Q10. Wanneer u, in de routine, somatische varianten in vaste tumoren opspoor op DNA, sequeneert u dan een normaal staal van dezelfde patiënt in parallel met het tumorstaal?**

Antwoorden	N
Nee	19
Ja	1

**Q11. Voor stalen in paraffine: schat een patholoog de tumorinhoud op een Hematoxyline-Eosine slide (HE) voordat u doorgaat met de NGS analyse?**

Antwoorden	N
Ja	20

**Q12. Concentreert uw laboratorium de tumorcelpopulatie voorafgaand aan een NGS analyse?**

Antwoorden	N
Ja, met handmatige dissectie m.b.v. een HE slide vooraf omcirkeld door een patholoog	16
In sommige gevallen	2
Nee, de volledige weefselcoupe wordt gebruikt voor analyse	2

**Q13. Wat is het minimum percentage neoplastische cellen dat in het staal moet aanwezig zijn om een NGS analyse uit te voeren?**

Antwoorden	N
>20%	1
>10%	16
>5%	3

Opmerkingen: Sommige laboratoria starten ook de NGS analyse onder het aangegeven percentage neoplastische cellen maar negatieve resultaten worden gerapporteerd onder voorbehoud.

**Q14. Wat is de minimum hoeveelheid genomisch DNA vereist in uw laboratorium voor het uitvoeren van een NGS analyse op vaste tumoren?**

Antwoorden	N
0-10ng	6
11-50ng	5
51-100ng	8
101-200ng	1

**Q15. Welke methode wordt gebruikt voor de kwantificatie van DNA?**

Antwoorden	N
Qubit	17
Quantus	2
NanoDrop	2
Quant-It Picogreen	1

**Q16. Welke richtlijnen worden gebruikt voor de interpretatie van de somatische varianten?**

Antwoorden	N
BELAC 2-405-NGS Rev 2-2019	20
Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists, Li et al., JMD, 2017, 19(1), (PMID: 27993330)	17
ACMG-AMP: Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology, Richard et al., Genet Med, 2015, 17(5), (PMID: 25741868)	8
BELAC 2-405-NGS Rev 0-2018	2
BELAC 2-405-NGS Rev 1-2019	2

## 2.3. Overzicht van de resultaten

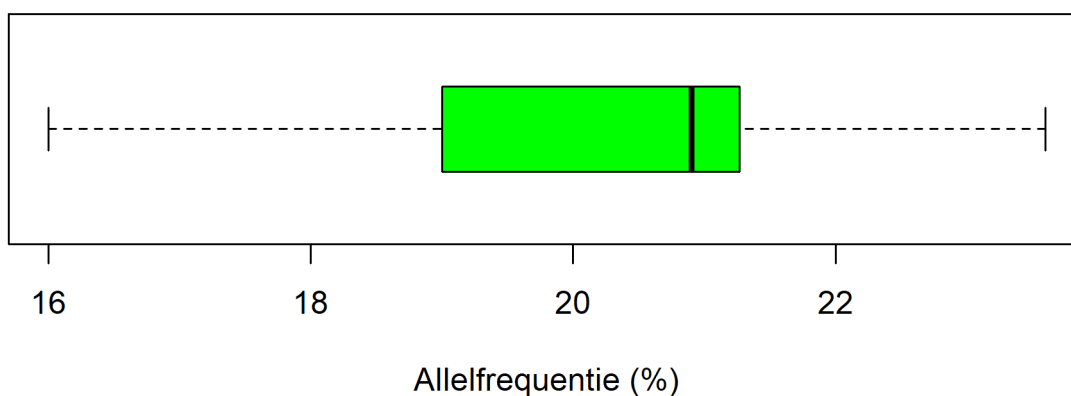
### 2.3.1. NGS-2021-1

type primaire tumor en histologie | long adenocarcinoom

#### Consensus voor te-rapporteren varianten

- [EGFR NM\\_005228.4: c.2573T>G; p.\(Leu858Arg\)](#)

### EGFR NM\_005228.4; c.2573T>G; p.(Leu858Arg)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
16	19	20.9	21.23	23.6	1.66

EGFR NM_005228.4 c.2573T>G p.(Leu858Arg) (Mediaan allelfrequentie: 20.9 %)	
<b>Identificatie van de variant</b>	<b>N</b>
Ja	20
Neen	0
<b>Biologische classificatie</b>	<b>N</b>
Pathofoon	20
Totaal	20
<b>Klinische classificatie</b>	<b>N</b>
Tier I: Significant klinisch belang	20
Totaal	20

**Opmerkingen:** Voor dit staal is de bereikte consensus de identificatie van de variant EGFR NM\_005228.4; c.2573T>G; p.(Leu858Arg). De nomenclatuur p.Leu858Arg, gerapporteerd door 3 laboratoria, wordt niet aanbevolen volgens de HGVS richtlijnen. Voor de biologische classificatie is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie pathofoon. Voor de klinische classificatie is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie Tier I.

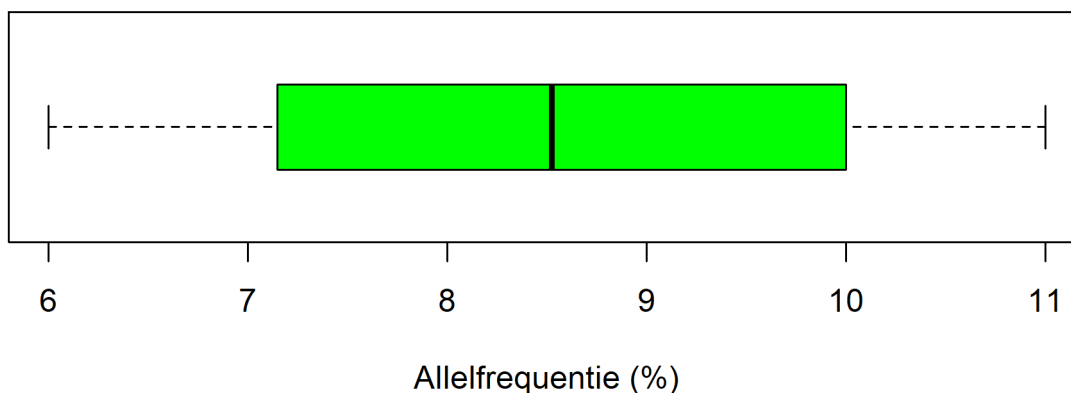
## Analyse van de conclusies

Standaardinformatie	Specifieke informatie van casus 1 opgenomen in de algemene conclusie door tenminste 2 laboratoria	Laboratoria
Therapie	Indicatie voor gevoeligheid aan therapie met anti-EGFR tyrosine kinase inhibitoren gerelateerd aan de aanwezigheid van de variant p.(Leu858Arg)	19
Informatie over de geteste genen	Variant in exon 21 van het EGFR gen gedetecteerd	8
	Activerende mutatie EGFR p.(Leu858Arg)	5
	Geen andere variant met klinisch belang gedetecteerd	8
	Geen variant EGFR p.(Thr790M) gedetecteerd	4

type primaire tumor en histologie colorectaal adenocarcinoom

## Consensus voor te-rapporteren varianten

- [BRAF NM\\_004333.5; c.1799\\_1800delinsAA; p.\(Val600Glu\)](#)

**BRAF NM\_004333.5; c.1799\_1800delinsAA; p.(Val600Glu)**

Min	P25	Median	P75	Max	SD
6	7.22	8.53	10	11	2.06

BRAF NM_004333.5 c.1799_1800delinsAA p.(Val600Glu) (Mediaan allelfrequentie: 8.525 %)	
<b>Identificatie van de variant</b>	<b>N</b>
Ja	20
Neen	0
<b>Biologische classificatie</b>	<b>N</b>
Pathogeen	20
Totaal	20
<b>Klinische classificatie</b>	<b>N</b>
Tier I: Significant klinisch belang	20
Totaal	20

**Opmerkingen:** Voor dit staal is de bereikte consensus de identificatie van de variant BRAF NM\_004333.5; c.1799\_1800delinsAA; p.(Val600Glu). Betreffende de DNA-referenties: één laboratorium rapporteerde de variant c.1799\_1800TG>AA in plaats van de variant c.1799\_1800delinsAA. Deze nomenclatuur is echter niet correct volgens de HGVS richtlijnen: veranderingen waarbij twee of meer opeenvolgende nucleotiden betrokken zijn, moeten worden beschreven als deleties-inserties (delins) en niet als dubbele substitutie. Een ander laboratorium rapporteerde de variant als een enkele substitutie met c.1799T>A als referentie in plaats van c.1799\_1800delinsAA. Na bio-informatica analyse is de tweede substitutie weliswaar aanwezig in de VCF van het betreffende laboratorium maar wordt onafhankelijk van de eerste substitutie beschreven terwijl het om dezelfde reads gaat. Deze nomenclatuur is ook niet correct. Tenslotte wordt de nomenclatuur c.1799\_1800delTGinsAA, gerapporteerd door 2 laboratoria, niet aanbevolen volgens de HGVS richtlijnen. Deze beschrijving is langer, bevat overbodige informatie en verhoogt de kans op fouten. Betreffende de eiwitreferenties: de nomenclatuur p.Val600Glu, gerapporteerd door 2 laboratoria, wordt niet aanbevolen volgens de HGVS richtlijnen. Voor de biologische classificatie is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie pathogeen. Voor de klinische classificatie is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie Tier I.

## Analyse van de conclusies

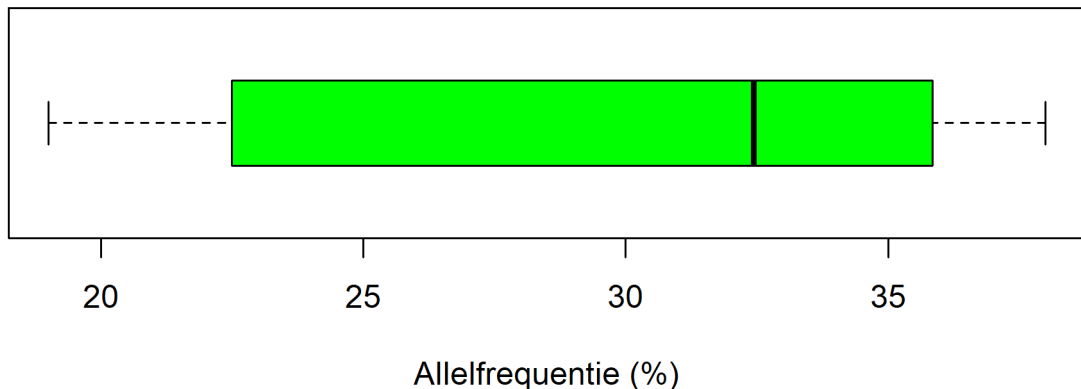
Standaardinformatie	Specifieke informatie van casus 2 opgenomen in de algemene conclusie door tenminste 2 laboratoria	Laboratoria
Therapie	Patiënt komt in aanmerking voor combinatietherapie met BRAF-MEK-EGFR inhibitoren gerelateerd aan de aanwezigheid van de BRAF variant - Indicatie voor gevoeligheid aan combinatietherapie met BRAF-MEK-EGFR inhibitoren gerelateerd aan de aanwezigheid van de BRAF variant	16
	Patiënt komt in aanmerking voor anti-EGFR monotherapie gerelateerd aan de afwezigheid van variant in de RAS genen - Indicatie voor gevoeligheid aan anti-EGFR monotherapie gerelateerd aan de afwezigheid van variant in de RAS genen	6
	Resistentie of verminderde respons tegen anti-EGFR monotherapie gerelateerd aan de aanwezigheid van de BRAF variant	5
	Resistentie of verminderde respons tegen anti-BRAF monotherapie gerelateerd aan de aanwezigheid van de BRAF variant	2
Prognose-diagnose	Variant met een ongunstige prognose indien een microsatelliet stabiele (MSS) mCRC	13
Informatie over de geteste genen	Variant in exon 15 van het BRAF gen gedetecteerd	4
	Geen variant gedetecteerd in de KRAS en NRAS genen	5
	Geen andere variant met klinisch belang gedetecteerd	4
Andere	Voorgestelde aanvullende analyses: MSI status	5

type de la tumeur primaire et histologie melanoom

## Consensus voor te-rapporteren varianten

- [KIT NM\\_000222.2: c.1669\\_1683del: p.\(Trp557\\_Glu561del\)](#)

## KIT NM\_000222.2; c.1669\_1683del; p.(Trp557\_Glu561del)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
19	22.75	32.44	35.82	38	9.69

KIT NM_000222.2 c.1669_1683del p.(Trp557_Glu561del) (Mediaan allelfrequentie: 32.44 %)	
<b>Identificatie van de variant</b>	<b>N</b>
Ja	20
Neen	0
<b>Biologische classificatie</b>	<b>N</b>
Pathogeen	16
Vermoedelijk pathogeen	4
Totaal	20
<b>Klinische classificatie</b>	<b>N</b>
Tier I: Significant klinisch belang	11
Tier II: Mogelijk klinisch belang	9
Totaal	20

**Opmerkingen:** Voor dit staal is de bereikte consensus de identificatie van de variant KIT NM\_000222.2; c.1669\_1683del; p.(Trp557\_Glu561del). Betreffende de DNA-referenties: één laboratorium rapporteerde de variant c.1667\_1681del15 in plaats van de variant c.1669\_1683del. Een identieke sequentie van 2 nucleotiden, aanwezig aan het begin en onmiddellijk na de 15 bp-deletie, maakt het mogelijk de deletie in de positie 1667 uit te lijnen. Deze nomenclatuur is echter niet correct volgens de HGVS richtlijnen, vanwege de 3' beschrijvingsregel van de referentie sequentie. Bovendien, zoals voor één ander laboratorium dat de variant met de nomenclatuur c.1669\_1683del15 rapporteerde, zijn deze nomenclaturen ook onjuist volgens de HGVS richtlijnen aangezien het aantal verwijderde nucleotiden niet in de annotatie moeten worden opgenomen. Een derde laboratorium rapporteerde de variant c.1671\_1685del in plaats van de variant c.1669\_1683del. In dit geval betreft dit waarschijnlijk een fout bij het ingeven van de variant via onze website, aangezien de mutatie correct werd geïdentificeerd in de ruwe data (VCF) van het betreffende laboratorium en dat hun eiwitreferentie correct is geannoteerd. Tenslotte wordt de nomenclatuur c.1669\_1683delTGAAGGTTGTTGAG, gerapporteerd door 2 laboratoria, niet aanbevolen volgens de HGVS richtlijnen. Deze beschrijving is langer, bevat overbodige informatie en verhoogt de kans op fouten. Betreffende de eiwitreferenties: de nomenclatuur p.Trp557\_Glu561del, gerapporteerd door één laboratorium, wordt niet aanbevolen volgens de HGVS richtlijnen. De nomenclatuur p.(Trp557\_Glu561delTrpLysValValGlu),



gerapporteerd door een laboratorium, zoals voor de DNA-referenties, wordt niet aanbevolen volgens de HGVS richtlijnen. Voor de biologische classificatie is het verwachte resultaat voor deze variant de classificatie pathogeen. De classificatie vermoedelijk pathogeen wordt als niet-aanvaardbaar beschouwd. In de Belgische richtlijnen staat deze variant in de tabel 'Consensus pathogenic variants (CPV) Solid / Myeloid list'. De Tier I en Tier II classificaties zijn niet geëvalueerd door de experts vanwege het ontbreken van een consensus van de laboratoria voor deze variant.

### Analyse van de conclusies

Standaardinformatie	Specifieke informatie van casus 3 opgenomen in de algemene conclusie door tenminste 2 laboratoria	Laboratoria
Therapie	Indicatie voor gevoeligheid aan tyrosine kinase inhibitoren gerelateerd aan de aanwezigheid van de KIT variant	13
	Onzekere indicatie voor gevoeligheid aan tyrosine kinase inhibitoren gerelateerd aan de aanwezigheid van de KIT variant wordt (in lopende studie)	3
	Indicatie voor gevoeligheid aan tyrosine kinase inhibitoren gerelateerd aan de aanwezigheid van de KIT variant maar alleen in tweede lijn therapie	2
	Geen indicatie voor therapie met anti-BRAF inhibitoren gerelateerd aan de afwezigheid van een BRAF variant	8
Prognose-diagnose	Aanwezigheid van KIT varianten frequenter bij acrale en mucosale melanomen - te correleren met histologie	5
Informatie over de geteste genen	Deletie in exon 11 van het KIT gen gedetecteerd	12
	Activerende mutatie KIT p.(Trp557_Glu561del)	4
	Geen variant gedetecteerd in het BRAF gen	10
	Geen andere variant met klinisch belang gedetecteerd	8

#### 2.3.4. Slaagpercentage van de deelnemers

##### Consensus voor de te-rapporteren varianten

Slaagpercentage gebaseerd op consensus voor de te-rapporteren varianten	N
3/3 (100%)	20
<b>Totaal slaagpercentage: 60/60 (100%)</b>	

##### Consensus voor de niet-te-rapporteren varianten

Geen enkele variant werd gerapporteerd door minder dan een derde van de deelnemers.

##### Biologische en klinische classificaties

Slaagpercentage van deelnemers voor de classificaties voor de consensus voor de te-rapporteren varianten	N
<b>Biologische classificaties</b>	
3/3 (100%)	16
2/3 (66,67%)	4
<b>Totaal slaagpercentage - biologische classificaties : 56/60 (93,33%)</b>	
<b>Klinische classificaties *</b>	
2/2 (100%)	20
<b>Totaal slaagpercentage - klinische classificaties : 40/40 (100%)</b>	

\* De klinische classificatie van de variant KIT NM\_000222.2 c.1669\_1683del p.(Trp557\_Glu561del) is niet geëvalueerd.

### 3. BIJLAGE

#### 3.1. Overzicht van de klinische conclusies

Deze gegevens zijn de antwoorden ingegeven op de website <https://qml.wiv-isp.be/NGS/20211/> en werden hieruit geëxtraheerd. Om geen vertaalfouten te introduceren, werden de conclusies in de taal van het laboratorium behouden.

##### 3.1.1. NGS-2021-1

<p>Bevindingen met een sterke klinische betekenis (Tier 1): In het onderzochte staal werd een activerende EGFR-mutatie in exon 21 teruggevonden met bewezen gevoeligheid aan bepaalde tyrosine kinase inhibitoren. De c.2369C&gt;T:p.(Thr790Met) (T790M) mutatie werd niet teruggevonden.</p> <p>Er werden mutaties gevonden in het BRAF, KRAS, MET en ERBB2 gen.</p> <p>Resultaten onder voorbehoud: tumorcelpercentage niet gekend, waardoor varianten met een lage VAF% mogelijk niet opgepikt worden.</p> <p>Coverage van het staal voldoet aan de vooropgestelde criteria.</p>
<p>Présence de cellules porteuses du variant p.(Leu858Arg) (p.(L858R)) dans le gène EGFR.</p> <p>Ce variant (rs121434568 - COSM6224) est classé biologiquement comme pathogénique selon le principe de classification recommandé par Sciensano et Belac et est de signification clinique avérée dans cette pathologie : sensibilité aux TKIs (FDA-approved) suivants : Afatinib, Dacomitinib, Erlotinib, Gefitinib, Osimertinib.</p> <p>REF : <a href="https://www.oncokb.org/gene/EGFR/L858R/Non-Small%20Cell%20Lung%20Cancer">https://www.oncokb.org/gene/EGFR/L858R/Non-Small%20Cell%20Lung%20Cancer</a></p>
<p>Er werd een activerende mutatie aangetoond in EGFR (zie microscopie). De aanwezigheid van dit type mutatie in NSCLC betekent in het algemeen een verhoogde sensitiviteit aan EGFR tyrosine kinase inhibitoren. Er werden geen andere varianten met klinische relevantie gevonden.</p>
<p>EGFR mutatie positief (L858R). De aanwezigheid van een activerende mutatie is predictief voor respons op anti-EGFR TKI behandeling (Rosell R et al. 2012 Lancet Oncology &amp; Siegelin MD et al. 2014 Lab Invest).</p>
<p>De mutatie c.2573T&gt;G (p.(Leu858Arg)) in EGFR is geassocieerd met gevoeligheid aan EGFR tyrosine kinase inhibitoren.</p> <p>Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.</p>
<p>Mutation activatrice détectée dans l'oncogène EGFR. Aucune autre mutation pathogénique n'a été détectée dans ce prélèvement.</p>
<p>De aanwezigheid van deze mutatie in exon 21 van het EGFR gen wordt in het algemeen geassocieerd met een goede respons op EGFR tyrosine kinase inhibitoren bij patiënten met een NSCLC.</p> <p>Bron: NCCN</p>
<p>De pathogene variant c.2573T&gt;G p.(Leu858Arg) werd gevonden in het EGFR gen exon 21 dat wordt geassocieerd met een gevoeligheid voor EGFR eerste-, tweede- en derdelijns EGFR TKI's. (PMID: 27987585; PMID: 25589191; PMID: 31682542; PMID: 30659024; ESMO 2020; PMID: 29864379)</p> <p>Er is geen mutatie gedetecteerd in het EGFR gen codon 790.</p>

De mutatie c.2573T>G (p.(Leu858Arg)) in EGFR is geassocieerd met gevoeligheid aan EGFR tyrosine kinase inhibitoren.

Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.

Aangezien er een driver mutatie werd aangetoond in dit staal, wordt GEEN bijkomend onderzoek met RNA sequencing uitgevoerd.

Conclusie:

De mutatie c.2573T>G, p.(Leu858Arg) in EGFR is geassocieerd met gevoeligheid aan EGFR tyrosine kinase inhibitoren. Een mutatie predictief voor gevoeligheid aan doelgerichte behandeling BRAF/MEK inhibitoren kan niet worden aangetoond.

Er werd een pathogene mutatie in het EGFR gen geïdentificeerd: EGFR c.2573T>G p.(Leu858Arg). Deze missense mutatie in exon 21 van het EGFR gen resulteert in ligand-onafhankelijke activatie van EGFR en is een gekende driver mutatie voor niet-kleincellig longcarcinoom. Deze mutatie heeft een significant klinisch belang (Tier I): de aanwezigheid van deze mutatie resulteert in gevoeligheid voor behandeling met EGFR tyrosine kinase inhibitoren (PMID 15118073 en 15118125).

Dans ce prélèvement d'adénocarcinome pulmonaire, présence d'un variant pathogénique de l'exon 21 du gène EGFR NM\_005228.5 c.2573T>G p.(Leu858Arg) d'impact clinique avéré (Tier Ia) et de fréquence allélique 19% avec la technique de séquençage NGS utilisée (Kit accrédité selon ISO15189 QIAAct AIT UMI Qiagen) sans mutation de résistance associée. Les variants p.L858R, sans variant de résistance associé (comme dans le cas présent), sont prédictifs de sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase de 1ère, deuxième et troisième génération ciblant la voie EGFR dans les adénocarcinomes pulmonaires de stades avancés. A noter l'absence de variant pathogénique ou probablement pathogénique détecté dans l'exon 15 du gène BRAF, exons (codons 12,13), exon 3 (codons 59,61) exon 4 (codon 117, 146) du gène KRAS, exon 20 du gène HER2 et pas de saut d'exon 14 dans le gène MET.

NB:

- Limite de détection:

Analyse réalisée à l'aide du kit GeneRead™ QIAAct AIT UMI Qiagen GmbH.

Détection des mutations sur les régions codantes ciblées des 30 gènes (AKT1, ALK, BRAF, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ESR1, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAQ, HRAS, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, NOTCH1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RAF1, SMAD4, STK11) en utilisant les méthodes d'enrichissement ciblé par PCR Multiplex suivi de séquençage sur GeneReader (Qiagen). Ce test (accrédité selon la norme ISO 15189) identifie avec une spécificité de 100% tous les variants présents au niveau des exons ciblés des 30 gènes (+ 20bp introniques).

Ces mutations ponctuelles sont détectées avec une limite de détection d'au moins 5% de fréquence allélique (équivalent à un contenu tumoral de 10%) pour une couverture UMI de 60X dans les conditions imposées par le fournisseur.

Dans le cadre de tests somatiques, le statut mutationnel des cellules tumorales étant parfois hétérogène, un test négatif ne peut exclure avec certitude la présence d'une mutation (si la couverture des régions d'intérêt est < 95% pour UMI 60x).

En effet, quand la quantité d'ADN à amplifier n'est pas suffisante et/ou la qualité suboptimale, certaines mutations peuvent ne pas être décelées. La couverture minimale acceptable UMI est de 30X pour certaines régions géniques difficiles. La présence ou l'absence d'une mutation est rapportée uniquement si l'analyse est contributive suivant les critères d'interprétation validés au laboratoire (>= 95% pour UMI 30x, contenu tumoral >=10%). A titre exceptionnel, des variants (délétions) de fréquence allélique >= à 3% peuvent être identifiés avec une couverture UMI de 30x avec le pipeline informatique validé.

En dehors d'une confirmation sur un échantillon sanguin ou sur du tissu sain avec signature d'un consentement éclairé par le patient dans le cadre d'un conseil génétique, ce test n'est pas utilisé pour la recherche de mutation d'origine constitutionnelle mais peut utilement la précéder (Vergote I., Eur J.Cancer ; 69 (2016), pp127-134).

- Pas d'information reçue sur le pourcentage d'infiltration tumorale.

- Q25: 95,95% et 99,99% séquences couvertes à > 60x.

La mutation L858R du gène EGFR est associée à une sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) anti-EGFR. Mok TS et al., N Engl J Med 2010, 361 :947-57

Er werd een mutatie gedetecteerd in EGFR, de p.Leu858Arg mutatie. Longtumoren met deze mutatie zijn gevoelig aan anti-EGFR receptor tyrosine kinase inhibitoren.

Nous avons recherché par séquençage à haut débit des mutations dans plusieurs régions d'intérêt selon les indications de la commission ComPerMed.

Le variant Leu858Arg a été détecté dans l'exon 21 d'EGFR.

**Impact clinique avéré\* :**

La mise en évidence d'une mutation somatique isolée de l'exon 21 du gène EGFR a été corrélée avec une réponse clinique (RR, PFS) au traitement par inhibiteurs des tyrosine kinases de première ou de seconde génération des patients atteints d'un cancer pulmonaire non à petites cellules (Hirsch et al., JCO 2006; Kim et al., The Lancet 2008; Mok et al., NEJM 2009, Rosell et al., Lancet Oncol 2012; Sequist et al., J Clin Oncol 2013).

Nous n'avons pas détecté d'autre mutation.

\*Selon les guidelines de l'ACMG et AMP, voir Li et al., JMD Vol 19 No.1, 2017

La liste complète des gènes couverts est consultable à l'adresse

[https://www.chuliege.be/jcms/c2\\_17345784/fr/genetique/informations-pratiques-relatives-aux-analyses](https://www.chuliege.be/jcms/c2_17345784/fr/genetique/informations-pratiques-relatives-aux-analyses)

De mutatie c.2573T>G (p.Leu858Arg) in EGFR is geassocieerd met gevoeligheid aan EGFR tyrosine kinase inhibitoren. De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.

(Technical remark: For MET ex14 skipping we always check this on RNA, which was not available here.)

Er werd een activerende EGFR mutatie type c.2573T>G; p.Leu858Arg (L858R) (NM\_005228.4) gedetecteerd. Dit resultaat is voor longcarcinomen predictief voor een goede respons op anti-EGFR TKI.

Présence d'une mutation au niveau de l'exon 21 du gène EGFR conférant une sensibilité aux inhibiteurs de l'EGFR

Er werd een EGFR (NM\_005228.4(EGFR):c.2573T>G (p.(Leu858Arg)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 21.

De aanwezigheid van deze variant in long adenocarcinoma heeft significant klinisch belang (tier I) en geeft in het algemeen een verhoogde respons op EGFR tyrosine kinase inhibitoren (1e, 2e en 3e generatie TKI) (NCCN guidelines NSCLC v3.2020).

Er werden geen andere (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in de genen EGFR (exon 18, 19, 20, 21), BRAF (exon 15), KRAS (exon 2, 3 en 4), MET en HER2 (exon 20).

The presence of an EGFR c.2573T>G p.(Leu858Arg) (L858R) variant is generally associated with a good response to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung adenocarcinoma (Lynch et al. NEJM 2004, Sequist et al. JCO 2008, Soria et al. NEJM 2018, NCCN guidelines non-small cell lung cancer version 4.2021).

### 3.1.2. NGS-2021-2

Bevindingen met sterke klinische betekenis (Tier 1):

In het onderzochte staal werden geen activerende RAS mutaties in exonen 2, 3 of 4 teruggevonden. Verschillende studies hebben aangetoond dat patiënten met wild type RAS tumoren baat kunnen hebben bij anti-EGFR therapie (Douillard et al., 2013).

Er werd een activerende BRAF mutatie in exon 15 teruggevonden (V600E). Patiënten met de BRAF V600E mutatie kunnen baat hebben bij een behandeling met een combinatie van encorafenib (RAF-targeted inhibitor) en cetuximab (anti-EGFR antibody).

Resultaten onder voorbehoud: tumorcelpercentage niet gekend, waardoor varianten met een lage VAF% mogelijk niet opgepikt worden.

Coverage van het staal voldoet aan de vooropgestelde criteria.

Présence de cellules porteuses du variant p.(Val600Glu) (p.(V600E)) dans le gène BRAF.

Ce variant (rs113488022 - COSM476) est classé biologiquement comme pathogénique selon le principe de classification recommandé par Sciensano et Belac et est de signification clinique avérée dans cette pathologie : sensibilité à la combinaison (FDA-approuvé) suivante : encorafenib + cetuximab.

REF : <https://www.oncokb.org/gene/BRAF/V600E/Colorectal%20Cancer>

Er werd geen KRAS of NRAS mutatie gedetecteerd. Er werd wel een mutatie aangetoond in BRAF (zie microscopie) In geval van gemetastaseerde ziekte is dit prognostisch een ongunstige factor. De afwezigheid van een mutatie in de RAS genen betekent dat de patiënt met mCRC in aanmerking komt voor therapie met anti-EGFR antistoffen. Sommige studies vermelden evenwel een verminderde respons van BRAF gemuteerde tumoren op anti-EGFR antistoffen.

Er werden geen andere varianten met klinische relevantie gevonden.

BRAF V600E mutatie positief. Het betreft een klasse 1 BRAF mutatie (cfr. Tabel 1 Dankner M. JCO Precision Oncology 2018).

De RAF-inhibitoren dabrafenib en vemurafenib hebben minimale activiteit als monotherapie in BRAF V600-mutante colorectale tumoren (CRC).

De combinatie van encorafenib + cetuximab + binimetinib, een RAF-inhibitor, een anti-EGFR antilichaam en een MEK-inhibitor respectievelijk,

tonen in klinische studies veelbelovende resultaten in patiënten met BRAF V600E-mutante, RAS wildtype CRC (Corcoran RB et al. Cancer Discovery 2018).

Verder is de aanwezigheid van de activerende BRAF (V600) mutatie in colorectale tumoren indicatief voor ongunstig klinisch verloop (Barras D Biomark et al., Cancer 2015).

De afwezigheid van klinisch relevante mutaties in KRAS en NRAS is geassocieerd met gevoeligheid aan anti-EGFR therapieën.

Aanwezigheid van een BRAF p.(V600E) mutatie. In geval van een microsatelliet stabiel (MSS) mCRC is de aanwezigheid van deze BRAF hotspotmutatie geassocieerd met een ongunstige prognose. Te correleren met MSI status. Indien klinisch geïndiceerd, kan de patiënt in aanmerking komen voor behandeling met een combinatie van RAF- en EGFR-inhibitoren.

Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.

/ No answer

De aanwezigheid van de mutatie c.1799\_1800delinsAA (p.(Val600Glu)) in exon 15 van het BRAF gen wordt in het algemeen geassocieerd met een ongunstige prognose. Er is ook evidentie voor een minder goede respons op anti-EGFR therapie in monotherapie. Ook BRAF inhibitie alleen heeft maar weinig effect door RAF-MEK-MA PK pathway gemedieerde en EGFR-gemedieerde resistentiemechanismen. Er is wel mogelijke respons op een combinatietherapie of triplet therapie bestaande uit BRAF inhibitie, anti-EGFR monoklonale antilichaam behandeling en therapieën die de volledige RAF-MEK-MA PK signaaltransductie onderdrukken.

Bron: Nakayama I, Hirota T, Shinozaki E. Review: BRAF Mutation in Colorectal Cancers: From Prognostic Marker to Targetable Mutation. Cancers 2020,12, 3236. doi:10.3390/cancers12113236

De pathogene variant c.1799\_1800delinsAA p.(Val600Glu) werd gevonden in het BRAF gen exon 15 dat wordt geassocieerd met respons op BRAF/EGFR gecombineerde inhibitoren (PMID 31566309; 29431699; NCCN 2.2021)

De afwezigheid van klinisch relevante mutaties in KRAS en NRAS is geassocieerd met gevoeligheid aan anti-EGFR therapieën.

Aanwezigheid van de hotspotmutatie c.1799\_1800delinsAA (p.(Val600Glu)) in BRAF. Bij microsatelliet stabiele (MSS) mCRC is de aanwezigheid van een BRAF hotspot mutatie p.(Val600Glu) geassocieerd met een ongunstige prognose. Te correleren met MSI status. Indien klinisch geïndiceerd, kan de patiënt in aanmerking komen voor behandeling met een combinatie van RAF- en EGFR-inhibitoren.

Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarssubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.

**Conclusie:**

De afwezigheid van klinisch relevante mutaties in KRAS en NRAS is geassocieerd met gevoeligheid aan anti-EGFR therapieën.

Aanwezigheid van een BRAF p.(V600E) mutatie. In geval van een microsatelliet stabiel (MSS) mCRC is de aanwezigheid van deze BRAF hotspotmutatie geassocieerd met een ongunstige prognose. Te correleren met MSI status. Indien klinisch geïndiceerd, kan de patiënt in aanmerking komen voor behandeling met een combinatie van RAF- en EGFR-inhibitoren (Kopetz S et al. N Engl J Med. 2019)

Er werd een pathogene mutatie in het BRAF gen geïdentificeerd, BRAF c.1799\_1800delinsAA p.(Val600Glu). Deze missense mutatie in het tyrosine kinase domein resulteert in een constitutief actief BRAF kinase dat als monomeer tot oncogene signalisatie leidt (klasse 1 BRAF mutatie) (PMID 33260892). Deze mutatie heeft een significant klinisch belang (Tier I): de aanwezigheid van deze mutatie is geassocieerd met een slechte prognose (PMID 24594804 en 27993800) en maakt een goede respons op behandeling met anti-EGFR monoklonale antilichamen, als monotherapie of in combinatie met chemotherapie, sterk onwaarschijnlijk, behalve wanneer de anti-EGFR monoklonale antilichamen toegediend worden in combinatie met een BRAF inhibitor zoals encorafenib (PMID 31566309; National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: colon cancer, version 2.2021).

Dans ce prélèvement d'adénocarcinome colorectal, présence d'un variant pathogénique BRAF NM\_004333.6 c.1799\_1800delinsAA (p.Val600Glu) d'impact clinique avéré (Tier Ia) détecté avec une fréquence allélique de 7%.

Le variant BRAF V600E est prédictif dans les cancers rectocoliques métastasés d'une susceptibilité supérieure de l'association anti-BRAF (type encorafenib) et anti-EGFR (type cetuximab ou panitumumab) par rapport à un anti-EGFR seul (non recommandé). Une recherche d'instabilité des microsatellites et de méthylation du promoteur MLH1 sont recommandées. En cas de statut de microsatellites instable (MSI-High), une consultation en Génétique Humaine est recommandée afin d'identifier un syndrome de Lynch éventuel. En cas d'histoire familiale positive, une recherche de mutations dans le gène POLE est également à conseiller.

Les mutations BRAF sont considérées comme étant de pronostic défavorable (OS et Disease free survival) en l'absence d'instabilité microsatellitaire et fréquemment observées dans les adénomes festonnés. Pas de variant pathogénique ou probablement pathogénique détecté dans les exon 3 (codons 59,61), exon 4 (codon 117, 146) des gènes KRAS et NRAS. En cas de statut de microsatellites instable, des immunothérapies (anti-PD1/PDL1) sont à l'étude y compris en présence de variant BRAF V600E. Ce cas est à discuter en consultation multidisciplinaire oncologie (COM).

**NB:**

- Limite de détection:

Analyse réalisée à l'aide du kit GeneRead™ QIAAct AIT UMI Qiagen GmbH. Détection des mutations sur les régions codantes ciblées des 30 gènes (AKT1, ALK, BRAF, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ESR1, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAQ, HRAS, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, NOTCH1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RAF1, SMAD4, STK11) en utilisant les méthodes d'enrichissement ciblé par PCR Multiplex suivi de séquençage sur GeneReader (Qiagen). Ce test (accrédité selon la norme ISO 15189) identifie avec une spécificité de 100% tous les variants présents au niveau des exons ciblés des 30 gènes (+ 20bp introniques).

Ces mutations ponctuelles sont détectées avec une limite de détection d'au moins 5% de fréquence allélique (équivalent à un contenu tumoral de 10%) pour une couverture UMI de 60X dans les conditions imposées par le fournisseur. Dans le cadre de tests somatiques, le statut mutationnel des cellules tumorales étant parfois hétérogène, un test négatif ne peut exclure avec certitude la présence d'une mutation (si la couverture des régions d'intérêt est < 95% pour UMI 60x). En effet, quand la quantité d'ADN à amplifier n'est pas suffisante et/ou la qualité suboptimale, certaines mutations peuvent ne pas être décelées. La couverture minimale acceptable UMI est de 30X pour certaines régions géniques difficiles. La présence ou l'absence d'une mutation est rapportée uniquement si l'analyse est contributive suivant les critères d'interprétation validés au laboratoire (>= 95% pour UMI 30x, contenu tumoral >=10%). A titre exceptionnel, des variants (délétions) de fréquence allélique >= à 3% peuvent être identifiés avec une couverture UMI de 30x avec le pipeline informatique validé. En dehors d'une confirmation sur un échantillon sanguin ou sur du tissu sain avec signature d'un consentement éclairé par le patient dans le cadre d'un conseil génétique, ce test n'est pas utilisé pour la recherche de mutation d'origine constitutionnelle mais peut utilement la précéder (Vergote I, Eur J.Cancer ; 69 (2016), pp127-134).

- Pas d'information reçue sur le pourcentage d'infiltration tumorale.  
- Q25: 95,30% et 99,89% séquences couvertes à > 60x.



La mutation BRAF V600E est décrite dans environ 10% des cancers colorectaux. La présence de cette mutation est associée à un moins bon pronostic.  
La FDA a récemment approuvé la combinaison d'encorafenib avec du cetuximab pour les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique avec mutation BRAF V600E.  
Van Cutsem E et al., J Clin Oncol 2011, 29:2011-19

Er werd een mutatie gedetecteerd in BRAF, de p.Val600delinsGlu mutatie.  
Recente studies tonen voor colorectale tumoren met een mutatie in BRAF codon 600 een langere overall survival en een hogere response rate bij gebruik van gecombineerde (triple) therapie van BRAF-, MEK-, en EGFR-kinase inhibitoren. (PMID 29431699 en PMID 31566309)

Nous avons recherché par séquençage à haut débit des mutations dans plusieurs régions d'intérêt selon les indications de la commission ComPerMed.

Une mutation de type V600E a été détectée dans BRAF.

Impact clinique avéré\* :

Plusieurs études indiquent que la mutation V600E de BRAF a un impact négatif sur le traitement à base d'anticorps ciblant EGFR chez les patients atteints d'un cancer colorectal non muté pour KRAS ou NRAS (De Roock et al., Lancet Oncol 2011; Mao et al., Mol Biol Rep 2011; Tol et al., Eur J Cancer 2010).

La présence d'une mutation de BRAF est un argument en faveur d'une origine sporadique de cancer colorectal.

Nous n'avons pas détecté d'autre mutation.

\*Selon les guidelines de l'ACMG et AMP, voir Li et al., JMD Vol 19 No.1, 2017

La liste complète des gènes couverts est consultable à l'adresse [https://www.chuliege.be/jcms/c2\\_17345784/fr/genetique/informations-pratiques-relatives-aux-analyses](https://www.chuliege.be/jcms/c2_17345784/fr/genetique/informations-pratiques-relatives-aux-analyses)

Aanwezigheid van een BRAF p.(V600E) mutatie (c.1799\_1800delinsAA (p.(Val600Glu))). In geval van een microsatelliet stabiel (MSS) mCRC is de aanwezigheid van deze BRAF hotspotmutatie geassocieerd met een ongunstige prognose. Te correleren met MSI status. Indien klinisch geïndiceerd, kan de patiënt in aanmerking komen voor behandeling met een combinatie van RAF- en EGFR-inhibitoren.  
De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.

Er werd GEEN RAS mutatie gedetecteerd. De patiënt zou dus in aanmerking kunnen komen voor therapie met anti-EGFR moAb therapie.

Er werd wel een BRAF mutatie type c.1799T>A; p.Val600Glu (V600E) (NM\_004333.5) gedetecteerd. BRAF mutaties komen voor in +/- 10 % van de colorectale carcinomen (CRC). Het voorkomen van een BRAF mutatie in mCRC heeft een negatieve impact op de prognose. De combinatie van encorafenib (BRAF-inhibitor) + cetuximab (anti-EGFR moAb) +/- binimetinib (MEK-inhibitor) zou goede klinische responsen geven in BRAF V600E positieve CRC.

Présence de la mutation V600E au niveau du gène BRAF conférant une pronostique défavorable chez les patient présentant un adénocarcinome colorectal.

Er werd een BRAF (NM\_004333.6(BRAF):c.1799\_1800delinsAA (p.(Val600Glu)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 15.

De aanwezigheid van deze variant in colorectaal carcinoma heeft significant klinisch belang (tier I) en is geassocieerd met een verhoogde gevoeligheid aan de combinatie therapie bestaande uit encorafenib, cetuximab en binimetinib. (PMID: 31566309).

Er werden geen andere (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in de genen BRAF (exon 15), KRAS (exon 2, 3 en 4) en NRAS (exon 2, 3 en 4).

The presence of a BRAF c.1799\_1800delinsAA p.(Val600Glu) (V600E) variant is generally associated with an unfavorable prognosis, and possible response to a combination therapy of BRAF inhibition, anti-EGFR monoclonal antibody therapy and/or MEK inhibition in colorectal carcinoma. EMA recently approved the combination therapy of encorafenib with cetuximab for the treatment of metastatic colorectal cancers harbouring the BRAF V600E variant (Trullas et al. ESMO Open 2021, Chu et al. CCR 2020, NCCN guidelines colon cancer version 2.2021).



### 3.1.3. NGS-2021-3

Bevindingen met een sterke klinische betekenis (Tier 1):

In het onderzochte staal werd geen activerende BRAF-mutatie in codon 600 teruggevonden. Studies hebben aangetoond dat patiënten met wild-type BRAF p.Val600 tumoren geen baat zullen hebben bij een behandeling met een BRAF kinase inhibitor (BRIM studies: Chapman et al., 2011; Sosman et al., 2012).

Er werd een vermoedelijk pathogene mutatie teruggevonden in exon 11 van het KIT gen. Patiënten met een gemetastaseerd melanoom met dit type mutatie kunnen baat hebben bij een behandeling met imatinib.

Resultaten onder voorbehoud: tumorcelpercentage niet gekend, waardoor varianten met een lage VAF% mogelijk niet opgepikt worden.

Coverage van het staal voldoet aan de vooropgestelde criteria, met uitzondering van exon 9, 11, 13, 17 en 18 van het KIT gen.

Présence de cellules porteuses du variant p.(Trp557\_Glu561del) (p.(W557\_E561del) : délétion de 5 acides aminés dans l'exon 11) dans le gène KIT.

Ce variant (COSM1330) est classé biologiquement comme pathogénique selon le principe de classification recommandé par Sciensano et Belac et est de signification clinique potentielle dans cette pathologie.

REF : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3986039/>  
<https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2006.06.2984>

Er werd geen pathogene mutatie aangetoond in BRAF. Dit betekent in het algemeen dat de patiënt niet gevoelig is aan BRAF V600 inhibitoren.

Er werd een mutatie gedetecteerd in het KIT gen (zie resultaten). De aanwezigheid van dit type mutatie betekent in het algemeen een verhoogde sensitiviteit aan KIT tyrosine kinase inhibitoren.

Er werden geen andere varianten met klinische relevantie gevonden.

KIT mutatie positief.

KIT mutatie in maligne melanoom is onderwerp van klinische studies ikv behandeling met multikinase inhibitoren (Hodi FS et al. Imatinib for Melanomas Harboring Mutationally Activated or Amplified KIT Arising on Mucosal, Acral, and Chronically Sun-Damaged Skin. JCO 2013).

Imatinib is de enige gepersonaliseerde behandeling voor KIT-gemuteerd melanoom vermeld in de NCCN richtlijnen. Doch, de effectiviteit van KIT-targeted therapie is sterk afhankelijk van de genomische positie van de mutatie (exon) en bovendien blijkt progressie snel op te treden en de effectiviteit van alternatieve inhibitoren (e.g. sunitinib, dasatinib, nilotinib) laag.

(Carvaja RD et al. Another option in our KIT of effective therapies for advanced melanoma. JCO 2013) (Guo J et al. Efficacy and safety of nilotinib in patients with KIT-mutated metastatic or inoperable melanoma: final results from the global, single-arm, phase II TEAM trial. Ann Oncol. 2017)

Een mutatie predictief voor gevoeligheid aan BRAF-inhibitoren kan NIET worden aangetoond.

Aanwezigheid van een pathogene mutatie in exon 11 van het KIT gen, c.1669\_1683del (p.(Trp557\_Glu561del)) (in-frame deletie). KIT mutaties zijn zeldzaam in melanomen, maar worden vaker gezien bij acrale of mucosale melanomen. Te correleren met histologie.

De predictieve betekenis van KIT mutaties bij melanomen, onder meer voor behandeling met de tyrosine kinase inhibitor imatinib, wordt uitvoerig bestudeerd (Michelin et al. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2019;30(12):1884-1901).

Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.

Mutation activatrice détectée dans l'oncogène KIT

Aucune autre mutation pathogénique n'a été détectée dans ce prélèvement.

Door de aanwezigheid van een mutatie in KIT exon 11 heeft de patiënt hoogstwaarschijnlijk baat bij imatinib behandeling.

Door de afwezigheid van een BRAF V600 mutatie, zal deze patiënt waarschijnlijk niet reageren op BRAF-targeted therapie.

Bron: <https://www.mycancergenome.org/content/alteration/kit-exon-11-mutation/>

Binnen de grenzen van de methode, is er geen mutatie gevonden in exon 15 van het BRAF gen. Voor melanoma zonder BRAF mutatie is er een slechte respons voor BRAF-inhibitor therapie. De pathogene variant c.1669\_1683del p.(Trp557\_Glu561del) werd gevonden in het KIT gen exon 11. Kit mutaties komen vooral voor bij acrale melanomen, mucosale melanomen en melanomen bij chronische zon expositie. Respons op behandeling met imatinib of nilotinib is beschreven en kan worden overwogen in 2de lijn (PMID: 31566661; 28327988; 23775962; 21642685).

De mutatie c.1669\_1683del (p.(Trp557\_Glu561del)) in KIT is geassocieerd met gevoeligheid aan de tyrosine kinase inhibitor imatinib.

Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.

**Conclusie:**

De klinische betekenis van de mutatie c.1669\_1683del, p.(Trp557\_Glu561del) in het KIT gen is onvoldoende gekend, maar wordt uitvoerig bestudeerd, in tegenstelling tot GIST tumoren waar deze mutatie geassocieerd is met gekende gevoeligheid aan de tyrosine kinase inhibitor imatinib (Dumaz et al, 2015 Feb;25(1):88-90).

Er werd een pathogene mutatie in het KIT gen geïdentificeerd: KIT c.1669\_1683del p.(Trp557\_Glu561del). Deze in-frame deletie in exon 11 tast het juxtamembraan domein van het KIT eiwit aan en resulteert in constitutieve activatie van deze tyrosine kinase receptor. Deze mutatie heeft een significant klinisch belang (Tier I): de aanwezigheid van deze mutatie kan resulteren in gevoeligheid voor behandeling met imatinib of andere KIT inhibitoren. Hierbij moet wel opgemerkt worden dat een respons op KIT inhibitor therapie slechts in minder dan de helft van de gevallen van melanoom met een activerende KIT mutatie optreedt, zodat KIT inhibitoren niet de voorkeursbehandeling zijn maar voorbehouden blijven voor melanomen met een activerende KIT mutatie die niet in aanmerking komen voor of niet responsief zijn op andere therapieën (National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: cutaneous melanoma, version 2.2021).

De afwezigheid van een BRAF Val600 mutatie impliceert dat bij deze patiënt een behandeling met een BRAF inhibitor niet zinvol is (National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: cutaneous melanoma, version 2.2021).

Dans ce prélèvement de mélanome, présence d'un variant pathogénique KIT NM\_000222.3 c.1669\_1683delTGGGAAGGTTGTTGAG p.(Trp557\_Glu561del) d'impact clinique avéré (Tier IA) et de fréquence allélique 28,42%. Le variant de l'exon 11 du gène KIT p.(W557\_E561del) est prédictif d'une sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase tels que l'imatinib en l'absence de mutation de résistance associée dans les mélanomes avancés non résecables. Des études cliniques de phase II faisant usage d'associations d'anti-MEK et d'imatinib sont en cours pour les stades III et IV de mélanome. Les mutations KIT sont décrites comme étant présentes dans 10-15% des mélanomes muqueux et acraux et considérés de pronostic plus favorable sous traitement par imatinib. Pas de variant pathogénique ou probablement pathogénique détecté dans les exon 3 (codons 59,61), exon 4 (codon 117, 146) du gène NRAS et de l'exon 15 (codon 600) du gène BRAF.

**NB:**

- Limite de détection:

Analyse réalisée à l'aide du kit GeneRead TM QIAAct AIT UMI Qiagen GmbH. Détection des mutations sur les régions codantes ciblées des 30 gènes (AKT1, ALK, BRAF, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ESR1, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAQ, HRAS, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, NOTCH1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RAF1, SMAD4, STK11) en utilisant les méthodes d'enrichissement ciblé par PCR Multiplex suivi de séquençage sur GeneReader (Qiagen). Ce test (accrédité selon la norme ISO 15189) identifie avec une spécificité de 100% tous les variants présents au niveau des exons ciblés des 30 gènes (+ 20bp introniques). Ces mutations ponctuelles sont détectées avec une limite de détection d'au moins 5% de fréquence allélique (équivalent à un contenu tumoral de 10%) pour une couverture UMI de 60X dans les conditions imposées par le fournisseur. Dans le cadre de tests somatiques, le statut mutationnel des cellules tumorales étant parfois hétérogène, un test négatif ne peut exclure avec certitude la présence d'une mutation (si la couverture des régions d'intérêt est < 95% pour UMI 60x). En effet, quand la quantité d'ADN à amplifier n'est pas suffisante et/ou la qualité suboptimale, certaines mutations peuvent ne pas être décelées. La couverture minimale acceptable UMI est de 30X pour certaines régions géniques difficiles. La présence ou l'absence d'une mutation est rapportée uniquement si l'analyse est contributive suivant les critères d'interprétation validés au laboratoire (>= 95% pour UMI 30x, contenu tumoral >=10%). A titre exceptionnel, des variants (délétions) de fréquence allélique >= à 3% peuvent être identifiés avec une couverture UMI de 30x avec le pipeline informatique validé. En dehors d'une confirmation sur un échantillon sanguin ou sur du tissu sain avec signature d'un consentement éclairé par le patient dans le cadre d'un conseil génétique, ce test n'est pas utilisé pour la recherche de mutation d'origine constitutionnelle mais peut utilement la précéder (Vergote I, Eur J.Cancer ; 69 (2016), pp127-134).

- Pas d'information reçue sur le pourcentage d'infiltration tumorale.

- Q25: 95,41% et 100% séquences couvertes à > 60x.

Les mutations du gène KIT sont décrites dans 2 à 8% des mélanomes, le plus fréquemment dans le mélanome acral et muqueux (10-20%). Ces mutations sont rapportées comme mutuellement exclusives avec les mutations des gènes BRAF et NRAS. De nombreuses études et essais cliniques ont montré que les mutations du gène KIT confèrent une sensibilité à l'imatinib, au sunitinib, au sorafenib et au nilotinib.  
Beadling C et al., Clin Cancer Res 2008, 14:6821-6828  
Hodi FS et al., J Clin Oncol 2013, 31:3182-3190  
Lebbe C et al. J Clin Oncol 2014, 15 :suppl 9032  
Minor DR et al. Clin Cancer Res 2012,18 :1457-1463

Er werd een vermoedelijk pathogene mutatie gedetecteerd in exon 11 van het KIT gen, de p.Trp557\_Glu561del mutatie.

Klinische studies wijzen op een gevoeligheid aan KIT tyrosine kinase inhibitoren voor de behandeling van melanomen met activerende KIT mutaties (inclusief deze in codon 557). Zie PMID 23775962 en PMID 28843487.

Nous avons recherché par séquençage à haut débit des mutations dans plusieurs régions d'intérêt selon les indications de la commission ComPerMed.

Une mutation a été détectée dans KIT

Impact diagnostic :

2 à 8% des mélanomes sont porteurs d'une mutation de KIT, tous sous-types confondus. Les mélanomes acrolentigineux et muqueux sont mutés pour KIT dans 15 à 20% des cas. Les mutations de KIT sont plus rares dans les mélanomes de la peau exposée aux UV (2% environ), et non décrites dans les mélanomes de la peau non-exposée.

Impact clinique potentiel\* :

Plusieurs études cliniques et case 'reports' rapportent une réponse de patients porteurs d'une mutation de l'exon 11 ou 13 de KIT à un traitement à base d'imatinib (Carvajal et al. JAMA 2011; Terheyden et al. J Invest Dermatol 2010), de sunitinib (Minor et al., Clin Cancer Res 2012) ou de sorafenib (Quintas-Cardama et al., Nar Clin Pract Oncol 2008).

Nous n'avons pas détecté d'autre mutation.

\*Selon les guidelines de l'ACMG et AMP, voir Li et al., JMD Vol 19 No.1, 2017

La liste complète des gènes couverts est consultable à l'adresse

[https://www.chuliege.be/jcms/c2\\_17345784/fr/genetique/informations-pratiques-relatives-aux-analyses](https://www.chuliege.be/jcms/c2_17345784/fr/genetique/informations-pratiques-relatives-aux-analyses)

Een mutatie predictief voor gevoeligheid aan BRAF-inhibitoren kan NIET worden aangetoond.

De mutatie in KIT c.1669\_1683del, p.(Trp557\_Glu561del) is geassocieerd met gevoeligheid aan tyrosine kinase inhibitoren. Momenteel zijn er trials lopende met imatinib, dasatinib, nilotinib, en sunitinib. Voor Dasatinib werd recent een auto-resistentie mechanisme aangetoond.

Er worden geen andere varianten gedetecteerd in de gevraagde genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.

Er werd GEEN BRAF mutatie gedetecteerd. Dit resultaat is voor melanomen predictief voor een gebrek aan respons op BRAF-inhibitoren.

Er werd wel een KIT mutatie type c.1671\_1685del; p.(Trp557\_Glu561del) (NM\_000222.2) gedetecteerd. Dit resultaat is in maligne melanoom predictief voor een goede respons op imatinib.

Une catégorie de patients atteints de mélanome et présentant une altération/activation du gène KIT (exon 11) répondent favorablement à l'Imatinib mesylate ou à d'autres inhibiteurs de KIT

Er werd een KIT (NM\_000222.2(KIT):c.1669\_1683del (p.(Trp557\_Glu561del)) pathogene in-frame deletie variant geïdentificeerd in exon 11.

De aanwezigheid van dit type variant in melanoma heeft significant klinisch belang (tier I) en geeft in het algemeen een verhoogde sensitiviteit voor KIT inhibitoren zoals imatinib, nilotinib en sunitinib (PMID: 23775962, 21642685, 28327988, NCCN guidelines v1.2021 Melanoma: Cutaneous).

Er werden geen andere (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in de genen BRAF (exon 15), NRAS (exon 2, 3 en 4) en KIT (exon 9, 11, 13, 17 en 18).

The presence of a KIT indel variant in exon 11 is in general associated with a good response to tyrosine kinase inhibitor therapy including imatinib and nilotinib in melanoma (Carvajal et al. JAMA 2011, Hodi et al. JCO 2013, Guo et al. JCO 2011, Guo et al. Ann Oncol 2017, NCCN guidelines cutaneous melanoma version 2.2021).

### 3.2. Interpretatie van het individueel rapport

Naast dit algemene rapport kreeg u ook een individueel rapport. Hieronder vindt u informatie die kan helpen bij de interpretatie van dit rapport. De positie van uw kwantitatieve resultaten wordt gegeven in vergelijking met alle resultaten van alle deelnemers en alle methoden samen.

De volgende gegevens worden vermeld:

- Uw resultaat (R)
- De mediaan (MAF):  
de middenwaarde van de resultaten van alle laboratoria en alle methoden samen.
- De algemene standaarddeviatie (SD):  
de maatstaf van de spreiding van de resultaten van alle laboratoria, alle methoden samen.
- De Z-score:  
het verschil tussen uw resultaat en de mediaan (uitgedrukt in standaarddeviatie-eenheden):  
 $Z = (R - \text{MAF}) / \text{SD}$ .  
Uw resultaat wordt genoemd als **IZI > 3**.
- De grafische interpretatie van de positie van uw resultaat (R) in vergelijking met alle resultaten van alle deelnemers, gebaseerd op de methode van Tukey, voor elke parameter en voor elk geanalyseerd staal.

Deze parameters geven u een ruwe indicatie van de positie van uw resultaat (R) ten opzichte van de mediaan (MAF).

U kan meer details vinden in de 3 brochures die beschikbaar zijn op onze website op het volgende adres:

[https://www.wiv-isp.be/QML/index\\_nl.htm](https://www.wiv-isp.be/QML/index_nl.htm)

(kies "BROCHURES" in het voorgestelde menu)

of rechtstreeks op het volgende adres:

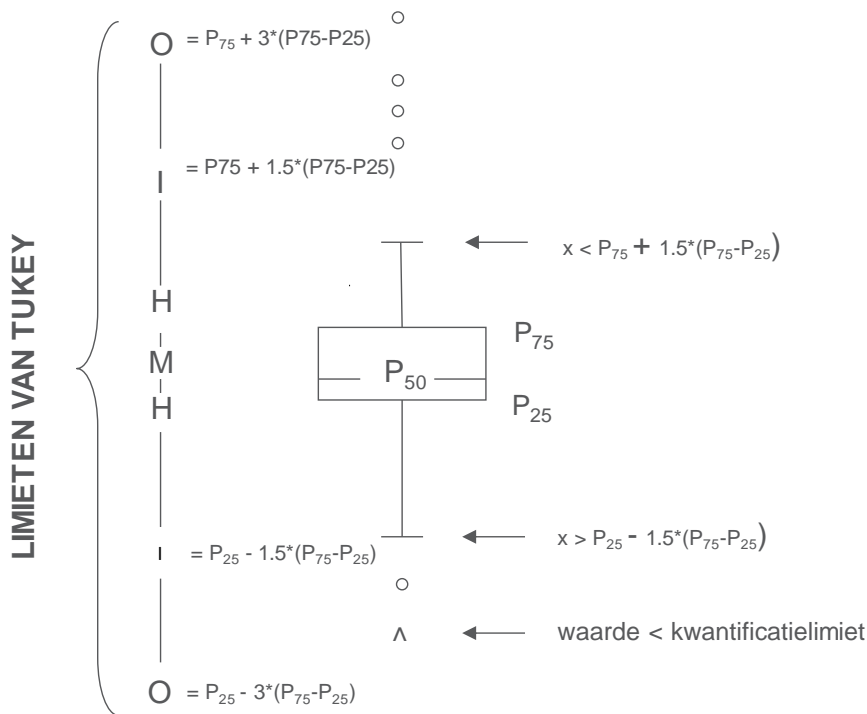
[https://www.wiv-isp.be/QML/activities/external\\_quality/brochures/nl/brochures.htm](https://www.wiv-isp.be/QML/activities/external_quality/brochures/nl/brochures.htm)

- 1) Informatiebrochure over de externe kwaliteitsevaluatieprogramma's voor klinische laboratoria (Algemene informatiebrochure over de externe evaluatie).
- 2) Statistische brochure (Algemene statistische berekeningsprocedure opgesteld door Professor Albert).
- 3) Verwerking van gecensureerde waarden (Statistische berekeningsprocedure toegepast op de gecensureerde waarden opgesteld door Professor Albert).

## Grafische voorstelling

Naast de tabellen met de resultaten, wordt er soms een grafische voorstelling van de resultaten als “box en whisker plot” toegevoegd. Zij bevat de volgende elementen:

- een rechthoek die gaat van percentiel 25 ( $P_{25}$ ) tot percentiel 75 ( $P_{75}$ )
- een centrale lijn die de mediaan van de resultaten voorstelt ( $P_{50}$ )
- een ondergrens die de kleinste waarde voorstelt  $x > P_{25} - 1.5 * (P_{75} - P_{25})$
- een bovengrens die de grootste waarde voorstelt  $x < P_{75} + 1.5 * (P_{75} - P_{25})$
- alle punten buiten dit interval worden voorgesteld door een cirkel.



**Overeenkomstige limieten in geval van een normale verdeling**

**EINDE**

© Sciensano, Brussel 2021.

Dit rapport mag niet gereproduceerd, gepubliceerd of verdeeld worden zonder akkoord van Sciensano. De individuele resultaten van de laboratoria zijn vertrouwelijk. Zij worden door Sciensano niet doorgegeven aan derden, noch aan de leden van de Commissie, de expertencomités of de werkgroep EKE.