

**BIOLOGISCHE GEZONDHEIDSRISICO'S  
KWALITEIT VAN LABORATORIA**

**COMMISSIES VOOR KLINISCHE BIOLOGIE/PATHOLOGISCHE ANATOMIE  
EXPERTENCOMITE**

**EXTERNE KWALITEITSEVALUATIE VOOR  
ANALYSES KLINISCHE BIOLOGIE/PATHOLOGISCHE ANATOMIE**

**DEFINITIEF GLOBAAL JAARRAPPORT  
MOLECULAIRE BIOLOGIE  
HEMATO-ONCOLOGIE EN GENETISCHE  
ONDERZOEKEN  
Art 33 bis en 33 ter  
2021**

**Sciensano/Moleculaire Biologie/14-NL**

Biologische gezondheidsrisico's  
Kwaliteit van laboratoria  
J. Wytsmanstraat, 14  
1050 Brussel | België

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

## EXPERTENCOMITE

Sciensano				
Secretariaat		TEL:	02/642 55 22	FAX: 02/642 56 45
Naam enquêtecoördinator	Joséphine Lantoine	TEL:	02/642 53 94	
		e-mail:	<a href="mailto:Josephine.lantoine@sciensano.be">Josephine.lantoine@sciensano.be</a>	
Naam vervanger enquêtecoördinator	Bernard China Vanessa Ghislain	TEL:	02/642 53 85 en 02/642 52 08	
		e-mail:	<a href="mailto:Vanessa.ghislain@sciensano.be">Vanessa.ghislain@sciensano.be</a> <a href="mailto:bernard.china@sciensano.be">bernard.china@sciensano.be</a>	
Experten	Instelling			
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			

Een voorlopige versie van dit rapport werd voorgelegd aan de experten op:  
03/01/2022.

Dit rapport werd besproken in de vergadering van het experten van:  
NVT-discussie per email

**Autorisatie van het rapport:** Joséphine Lantoine, enquêtecoördinator

Handtekening van de enquêtecoördinator

**Publicatiedatum : 24/02/2022**

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

# INHOUDSTAFEL

## INHOUDSTAFEL

<b>INLEIDING</b> .....	<b>4</b>
<b>HER 2 (2021/1)</b> .....	<b>5</b>
STALEN.....	5
DEELNAME .....	5
<b>BEPALING VAN ANDERE ANTIGENEN DAN ABO EN RH + BEPALING VAN ZWAKKE/VARIANT D</b>	<b>6</b>
STALEN.....	6
DEELNEMERS .....	6
RESULTATEN.....	6
CONCLUSIES OVER DE RESULTATEN VAN DE LABORATORIA .....	11
<b>EGFR-RAS</b> .....	<b>12</b>
STALEN.....	12
DEELNEMERS .....	12
RESULTATEN.....	13
CONCLUSIES OVER DE RESULTATEN VAN DE LABORATORIA .....	25
<b>BRAF V600E</b> .....	<b>26</b>
STALEN.....	26
DEELNEMERS .....	26
RESULTATEN.....	26
CONCLUSIES OVER DE RESULTATEN VAN DE LABORATORIA .....	30
<b>HER 2 (2021/5)</b> .....	<b>31</b>
STALEN.....	31
DEELNEMERS .....	31
RESULTATEN.....	31
CONCLUSIES OVER DE RESULTATEN VAN DE LABORATORIA .....	34
<b>MYÉLOÏDE: JAK2</b> .....	<b>35</b>
STALEN.....	35
DEELNEMERS .....	35
RESULTATEN.....	35
CONCLUSIES OVER DE RESULTATEN VAN DE LABORATORIA .....	38
<b>UITBESTEDE EVALUATIE: DETECTIE VAN DE MUTATIES VAN DE FACTOR V EN PROTROMBINE GENEN</b> .....	<b>39</b>
STALEN.....	39
DEELNEMERS .....	39
RESULTATEN.....	39
CONCLUSIES OVER DE RESULTATEN VAN DE LABORATORIA .....	40

## INLEIDING

In 2021, hebben we 5 enquêtes betreffende de art.33 bis en 33 ter van de RIZIV-nomenclatuur georganiseerd.

De enquête 2021/1 ging over de detectie van de amplificatie van het gen HER2 bij (niet) gemetastaseerde borstkanker (geannuleerd).

De enquête 2021/2 ging over de bepaling van andere erythrocyten antigenen dan ABO en Rh en de bepaling van zwakke of variant D.

De enquête 2021/3 ging over de detectie van de mutatie EGFR T790M in een longcarcinoom en over de detectie van RAS-mutaties in een colorectaal carcinoom

De enquête 2021/4 ging over de detectie van de mutatie BRAFV600 in het melanoom.

De enquête 2021/5 ging over de detectie van de amplificatie van het gen HER2 bij (niet) gemetastaseerde borstkanker wegens het afzeggen van de 2021/1 enquête.

De enquête 2021/6 ging over de detectie van de mutatie JAK2V61F.

Voor de detectie van de mutaties in de genen factor II en factor V, hebben we gevraagd aan de laboratoria om bij ECAT in te schrijven. De performanties van de laboratoria in deze EKE worden besproken op pagina 39.

Voor andere parameters, zoals NIPT, de detectie van de mutatie van het gen TP53 in het kader van een leukemie of de detectie van de mutatie PDGFRA D842V in het kader van een GIST, hebben we hen gevraagd om bij GenQA in te schrijven. Een terugbetaling is gepland voor de laboratoria die ons hun resultaten voor deze enquêtes zullen sturen

## HER 2 (2021/1)

### Stalen

Volgens de aanbestedingsprocedure uitgevoerd volgens het opstellen van een lastenboek, werden de artificiële stalen bij de firma Elitech Benelux, Sint-Martens-Latem, België gekocht. Deze firma heeft een beroep gedaan op de firma ThermoFischer Scientific, Fremont-USA voor de productie van de stalen.

De stalen zijn 3 µm FFPE-coupes van twee verschillende cellijnen die de amplificatie van het HER2 gen tot expressie brengen of niet.

De laboratoria ontvingen 2 coupes voor elke casus. Er werd hen gevraagd de analyse op minstens 1 van beide coupes uit te voeren.

### Deelname

Gezien de verschillende feedback van de deelnemers, wordt de kwaliteit in twijfel getrokken (niet-homogene stalen: bellen en/of gaten en loskomen van het weefsel). Na onderzoek, blijkt het dat het niet mogelijk is om een correcte analyse met een interpreteerbaar resultaat uit te voeren door de kwaliteit van de coupes.

In deze omstandigheden, hebben we beslist om de enquête te annuleren. In overeenstemming met ons kwaliteitssysteem en volgens de ISO-norm 17043, hebben we een officiële klacht naar de firma gestuurd en hebben we een interne NC opgesteld.

Een nieuwe enquête werd de 13/09/2021 georganiseerd. De resultaten van deze enquête zijn beschikbaar op p.31 van dit rapport.

## BEPALING VAN ANDERE ANTIGENEN DAN ABO EN RH + BEPALING VAN ZWAKKE/VARIANT D

### Stalen

Het DNA was afkomstig van een gezonde donor en werd met een commerciële kit *QIAamp DNA blood Mini kit* door het laboratorium van de dienst “Kwaliteit van laboratoria” geëxtraheerd. De concentratie en de zuiverheid werden met de spectrofotometrie Nanodrop methode gemeten. De DNA-concentratie van het staal was 45 ng/µl en de zuiverheid (A260/ A280) was 1,85.

### Deelnemers

10 klinische biologie laboratoria waren voor deze enquête ingeschreven. 7 laboratoria voor alle parameters, 1 voor de bepaling van andere antigenen dan ABO en Rh + en de bepaling van een variant D en 2 laboratoria alleen voor de bepaling van andere antigenen dan ABO en Rh.

1 laboratorium heeft zich uitschreven na het verzenden van de stalen. De 9 andere laboratoria hebben aan de enquête deelgenomen.

### Resultaten

De laboratoria hebben 1 tube van 150 µl humaan genomisch DNA geëxtraheerd met een commerciële kit uit het bloed ontvangen. We hebben de concentratie en de zuiverheid van het staal aan de laboratoria meegedeeld. We hebben aan de laboratoria gevraagd om de bepaling van andere erythrocyten antigenen dan ABO en Rh en de bepaling van zwakke of variant D met een moleculaire biologische methode uit te voeren.

#### 1. Resultaten per antigeen

Staal	Antigenen	Ingegeven resultaten*	Aantal laboratoria (N)
<b><u>ABO2021</u></b>	MNS	MNS: NN ss	8/9
		MNS : NN ss Uvar P2-, Uvar NY-	1/9
	Lutheran	LU: Lu <sup>b</sup> Lu <sup>b</sup>	4/9
		NA	5/9
	Kell	KEL: kk	5/9
		KEL: kk Kp <sup>b</sup> Kp <sup>b</sup> Js <sup>b</sup> Js <sup>b</sup>	4/9
	Duffy	FY: Fy <sup>a</sup> Fy <sup>a</sup> Fy <sup>b</sup> Fy <sup>b</sup>	3/9
		FY: Fy <sup>a</sup> Fy <sup>a</sup> Fy <sup>b</sup> Fy <sup>b</sup> , Fy <sup>x</sup> - Fynull-	4/9
		FY: Fy <sup>a</sup> Fy <sup>a</sup> Fy <sup>b</sup> Fy <sup>b</sup> FyGATA - Fy <sup>x</sup> -	1/9
		FY: Fy <sup>a</sup> Fy <sup>a</sup> Fy <sup>b</sup> Fy <sup>b</sup> , Fy <sup>x</sup> - Fynull- FyGATA -	1/9
	Kidd	JK:Jk <sup>a</sup> Jk <sup>a</sup> Jk <sup>b</sup> Jk <sup>b</sup>	8/9
		NA	1/9
	Diégo	DI: Di <sup>b</sup> Di <sup>b</sup>	3/9
		DI: Di <sup>b</sup> Di <sup>b</sup> Wr <sup>b</sup> Wr <sup>b</sup>	1/9
		NA	5/9
	Scianna	SC: Sc1Sc1	1/9
		NA	8/9
	Dombrock	DO: Do <sup>a</sup> Do <sup>a</sup> Do <sup>b</sup> Do <sup>b</sup>	8/9
DO: Do <sup>a</sup> Do <sup>a</sup> Do <sup>b</sup> Do <sup>b</sup> HyHy Jo <sup>a</sup> Jo <sup>a</sup>		1/9	
Colton	CO: Co <sup>a</sup> Co <sup>a</sup>	4/9	

	NA	5/9
Landsteiner-Weiner	LW: Lw <sup>a</sup> Lw <sup>a</sup>	2/9
	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 <sup>a</sup> Yt <sup>a</sup>	3/9
	NA	6/9
Knops	KN: Kn <sup>a</sup> Kn <sup>a</sup>	1/9
	NA	8/9

\*Volgens de gebruikelijke nomenclatuur

Staal	Ingegeven resultaten	Aantal laboratoria (N)
<b><u>ABO2021</u></b>	Geen zwakke D of D variant gedetecteerd// RHD negatief	5/8
	Niet van toepassing gezien RHD negatief	1/8
	Normale D	1/8
	RHD*01N.01	1/8

NB: Eén laboratorium heeft resultaten voor zwakke D ingegeven hoewel hij niet was ingeschreven.

## 2. Resultaten per laboratorium

Lab	Gebruikte methodes ABO/Rh	ABO2021											
		MNS	Lutheran	Kell	Duffy	Kidd	Diégo	Scianna	Dombrock	Colton	Landsteiner-Wiener	VEL	Andere
1	RBC fluo gene Verify (inno-train)	NN ss	Lu <sup>b</sup> Lu <sup>b</sup>	kk Kp <sup>b</sup> Kp <sup>b</sup> Js <sup>b</sup> Js <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup> Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup> Jk <sup>b</sup>	Dj <sup>b</sup> Dj <sup>b</sup> Wr <sup>b</sup> Wr <sup>b</sup>		Do <sup>a</sup> Do <sup>b</sup>	Co <sup>a</sup> Co <sup>a</sup>	Lw <sup>a</sup> Lw <sup>a</sup>		RHCE: cc ee Cartwright: Yt <sup>a</sup> Yt <sup>a</sup> Knops: Kn <sup>a</sup> Kn <sup>a</sup>
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 <sup>a</sup> - Lu <sup>b</sup> +	K- k+ kp <sup>a</sup> - kp <sup>b</sup> + Js <sup>a</sup> - Js <sup>b</sup> +	Fy <sup>a</sup> + Fy <sup>b</sup> + Fyx- Fynull-	Jk <sup>a</sup> + Jk <sup>b</sup> +	Dj <sup>a</sup> - Dj <sup>b</sup> +		Do <sup>a</sup> + Do <sup>b</sup> +	Co <sup>a</sup> + Co <sup>b</sup> -		Vel+	RhCE: C- c+ E e+ Cartwright: Yt a+ b-
4	RBC Ready Gene vERIfy (inno-train)	M- N+ S- s+,		K- k+	Fy <sup>a</sup> + Fy <sup>b</sup> + Fyx- Fynull-	Jk <sup>a</sup> + Jk <sup>b</sup> +			Do <sup>a</sup> + Do <sup>b</sup> +			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 <sup>a</sup> + Fy <sup>b</sup> + FyGATA- Fy <sup>x</sup> -	Jk <sup>a</sup> + Jk <sup>b</sup> +			Do <sup>a</sup> + Do <sup>b</sup> +			Vel+	
8	RBC Ready Gene vERIfy (inno-train)	M- N+ S- s+,		K- k+	Fy <sup>a</sup> + Fy <sup>b</sup> + Fy <sup>x</sup> - Fynull- mutatie (-67 T>c) Gatabox allèle Fy*02 niet gedetecteerd	Jk <sup>a</sup> + Jk <sup>b</sup> +			Do <sup>a</sup> + Do <sup>b</sup> +			Vel+	
9	RBC Fluo Gene vERYfy (inno-train)	M- N+ S- s+, Uvar P2-, Uvar NY-		K- k+	Fy <sup>a</sup> + Fy <sup>b</sup> + Fyx- Fynull-	Jk <sup>a</sup> + Jk <sup>b</sup> +			Do <sup>a</sup> + Do <sup>b</sup> +				



Labo	Gebruikte methodes Zwakke D	Gebruikte methodes D variant	ABO2021	
			Zwakke D	D variant
1	Weak D SSp BAGene Kit	Partial D type SSp BAGene kit	Geen zwakke D	RHD negatief
2	RHD Beadchip BioArray Solution (immucor)	RHD Beadchip BioArray Solution (immucor)	Afwezigheid van zwakke D// RhD-	Afwezigheid van D variant// RhD-
3	Weak D SSp BAGene Kit	Combinatie van Partial D type SSp BAGene kit + RH-type kit	Geen zwakke D	Geen D variant RHD*01N.01 (homozygoot)
4	Ready Gene SSP Inno-train kit weak D	Ready Gene SSP inno-train kit CDE	negatief	Geen variant//RhD-
5	Weak D SSp BAGene Kit	Partial D type SSp BAGene kit	Normale D	Normale D
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	negatief RHD negatief	negatief RHD negatief
9	/	RBC Fluo Gene CDE (inno-train)	Niet van toepassing gezien de RhD -	RhD -

### 3. Commentaren

- We hebben een verschil gemerkt in de gebruikte nomenclatuur (gebruikelijke vs ISBT-nomenclatuur; *Peyrard and Rouger, Tracli, 2009*) en in de rapportering van de genotypen en/of fenotypes. We hebben dus een opiniepeiling naar de deelnemers gestuurd in oktober. Volgens de resultaten van deze opiniepeiling, heeft het experten comité beslist om aan de laboratoria te vragen om te antwoorden met de gebruikelijke nomenclatuur en om de genotypen te rapporteren.

### 4. Gebruikte methodes

#### A. Bepaling van andere genen dan ABO en Rh

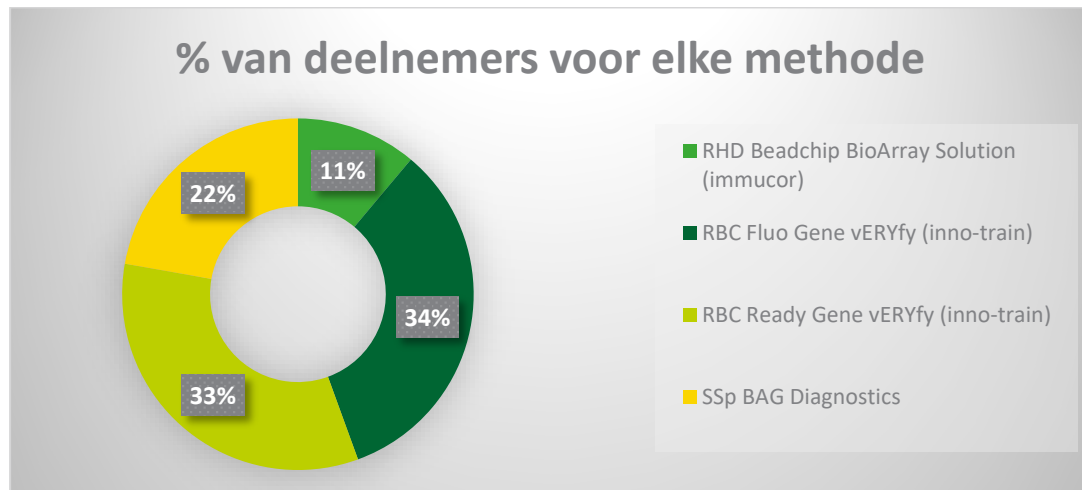


Chart 1 : Verdeling van laboratoria per gebruikte methode voor de bepaling van andere genen dan ABO en Rh

#### B. Bepaling van variant D

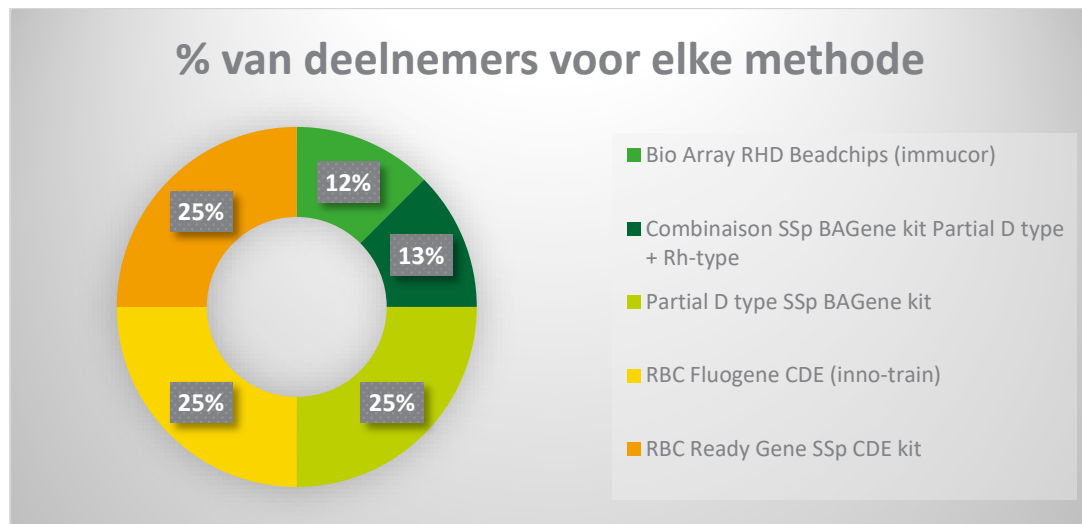


Chart 2 : Verdeling van laboratoria per gebruikte methode voor de bepaling van variant D

### C. Bepaling van zwakke D

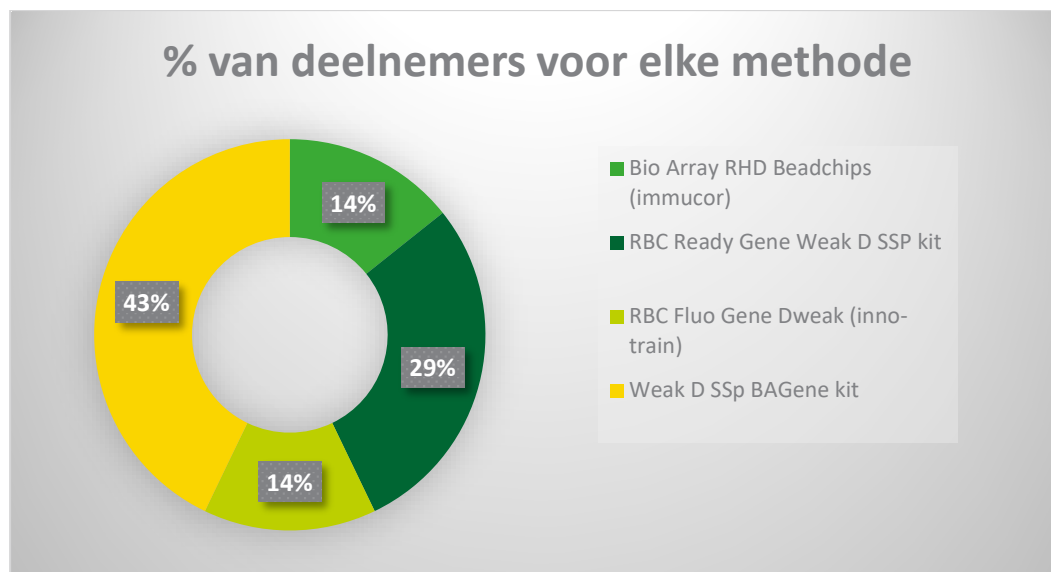


Chart 3 : Verdeling van laboratoria per gebruikte methode voor de bepaling van zwakke D

NB: Eén laboratorium heeft geen methode aangegeven aangezien het de analyse niet heeft uitgevoerd wegens de negatieve Rhesus D status.

De meest gebruikte methodes voor de bepaling van andere antigenen dan ABO en Rh zijn de methodes RBC Fluo-Gene vERYfy en RBC Ready Gene vERYfy van Inno-train.

De meest gebruikte kits voor de bepaling van zwakke D zijn RBC Ready Gene WEAK D van Inno-train en de WEAK D BAGene SSp kit van BAG Diagnostics.

De meest gebruikte kits voor de bepaling van variant D zijn de RBC Fluo Gene CDE kit, RBC Ready Gene CDE kit van Inno-train en de partial D type kit van BAG Diagnostics.

#### Conclusies over de resultaten van de laboratoria

9 laboratoria hebben aan de enquête deelgenomen. We hebben geen tegenstrijdigheid waargenomen tussen de resultaten aangegeven door de laboratoria. Voor de volgende enquêtes, zullen we vragen aan de deelnemers om te antwoorden met de gebruikelijke nomenclatuur en om de genotypen te rapporteren.

## EGFR-RAS

### Stalen

#### a. EGFR

Volgens de aanbestedingsprocedure uitgevoerd volgens het opstellen van een lastenboek, werden de artificiële stalen bij de firma Elitech Benelux, Sint-Martens-Latem, België gekocht. Deze firma heeft een beroep gedaan op de firma Horizon Discovery Ltd-Waterbeach, United Kingdom voor de productie van de stalen.

Alle stalen worden geleverd samen met een certificaat dat de aanwezigheid of afwezigheid van de mutatie en de allelfrequentie garandeert.

#### b. RAS

De stalen zijn 5 µm FFPE-coupees van colorectale kanker biopsieën. Het zijn patiënten stalen van de biobank Discovery Life Science, Ohio USA.

De stalen waren vergezeld van klinische gegevens van de patiënten: leeftijd, geslacht, ras, lokalisatie van de tumor, type van de tumor, pathologische data, gegevens over welke behandeling de patiënt vooraf heeft gekregen (als beschikbaar) en ook de mutationale status van KRAS en NRAS mutaties.

#### Klinische casus F00050516:

Colon ascendens: primaire tumor

Terminaal ileum en rechter colon:

Invasief matig gedifferentieerd adenocarcinoom van het colon ascendens met infiltratie van de muscularis propria en geen aanwijzingen voor uitbreiding buiten de serosa.

De chirurgische snijrand is tumorvrij.

8 mesenterische lymfeklieren zijn tumorvrij.

Appendix: geen pathologische diagnose.

#### Klinische casus F00050423:

Massa in het sigmoïd colon:

Invasief goed gedifferentieerd adenocarcinoom van het sigmoïd ontstaan in de achtergrond van een tubulovilleus adenoom met penetratie van de muscularis propria en microscopische aantasting van het serosale oppervlak.

Metastases in 1/14 regionale lymfeklieren met perilymfatische extensie.

Gesteeld mucosaal lipoom.

Diverticulose.

Geen afwijkingen ter hoogte van de proximale en distale resectiemarges.

#### Klinische casus C00018871.2:

Adenocarcinoom ontstaan in een grote villeuze tumor van het colon op 30 cm. De tumor infiltreert de steel maar de excisiemarge is tumorvrij.

### Deelnemers

22 laboratoria waren voor deze enquête ingeschreven. De verdeling van de ingeschreven laboratoria per parameter is als volgt:

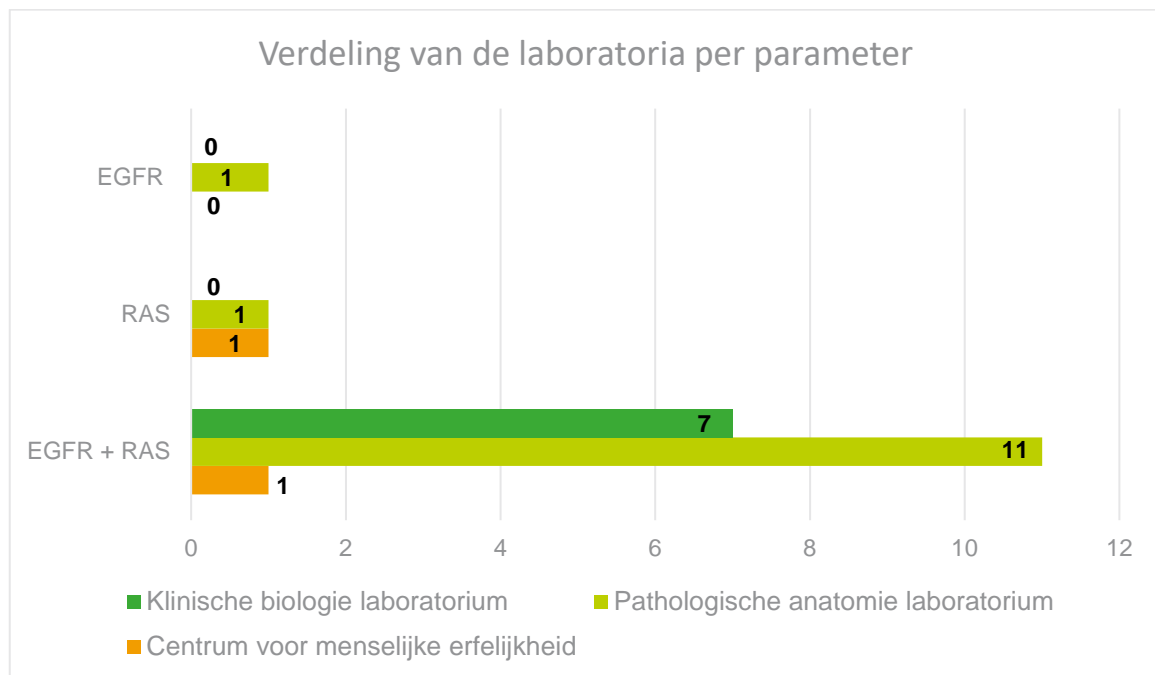


Chart 4 : Verdeling van ingeschreven laboratoria per specialiteit voor elke parameters (EGFR en/of RAS)

Alle ingeschreven laboratoria hebben geantwoord.

## Resultaten

### a. EGFR

De laboratoria hebben twee tubes met telkens één 15 µm FFPE-coupe gekregen. We hebben aan de laboratoria gevraagd om de aanwezigheid van de EGFR T790M mutatie voor elk staal met moleculaire methodes op te sporen. We hebben ook de allelfrequentie gevraagd indien deze bepaald werd, en de hiervoor gebruikte methode. Er werd ook gevraagd om aan te geven of er andere mutaties dan EGFR T790M werden gedetecteerd.

#### 1. Resultaten per staal

Staal	Verwachte resultaten	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
<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)

In tegenstelling tot wat vermeld was op het voorlopig rapport, hebben alle laboratoria de verwachte mutatie in het overeenkomstig staal gedetecteerd. Na contact, heeft het laboratorium dat in eerste instantie de mutatie c.2360C>T p.(T790M) geantwoord heeft ons aangegeven dat hij een schrijffout op het formulier gemaakt heeft. Het laboratorium heeft ons zijn ruwe gegevens gestuurd en het heeft wel de mutatie EGFR c.2369C>T p.(Thr790Met) gedetecteerd.

## 2. Resultaten per laboratorium

Lab	Gebruikte methodes	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)	ALK c.3981T>G (p.Y1327C )
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	X (17%)		X (66%)		X (48%)	



		ET2021-2	Andere gedetecteerde mutaties				
Lab	Gebruikte methodes	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					

\*Na een re-test met een andere methode, blijkt het dat de detectie van deze mutatie door het laboratorium met de kit Cobas vals positief was. Voor meer informatie zie punt 4. Commentaren en ook de annex 1 van dit rapport.

### 3. Antwoorden op de bijkomende vraag

Op de vraag "In het kader van de staalontvangst van FFPE-coupees, welke is de coupedikte die in routine wordt gebruikt in uw laboratorium voor de bepaling van EGFR-mutaties", hebben de laboratoria de volgende antwoorden gegeven:

$\mu\text{m}$	Aantal deelnemers
4 $\mu\text{m}$	1
5 $\mu\text{m}$	10
7 $\mu\text{m}$	1
5 $\mu\text{m}$ voor resecties en 10 $\mu\text{m}$ voor biopsieën in blok	1
5 $\mu\text{m}$ voor FFPE in tubes en 10 $\mu\text{m}$ voor FFPE op glaasje	1
10 $\mu\text{m}$ als uitgevoerd in het laboratorium ; als uitgevoerd bij een ander laboratorium: 5 $\mu\text{m}$	1
10 $\mu\text{m}$	2
$\geq 15 \mu\text{m}$	1

### 4. Commentaren

- Één laboratorium heeft ons aangegeven dat de stalen van slechte kwaliteit waren. Niettemin, heeft het laboratorium goed op de enquête geantwoord.
- Één laboratorium heeft ons aangegeven dat de DNA-sequencing van een suboptimale kwaliteit was. Niettemin, heeft het laboratorium goed op de enquête geantwoord.
- Betreffende de detectie (vals positief) van de mutatie EGFR Ex20Ins in het staal ET2021-2, heeft het laboratorium een bericht van de firma Roche ontvangen over de mogelijkheid van valse detectie van de mutatie EGFR Ex20Ins met de gebruikte kit: "Cobas EGFR mutation test V2". Gezien dat het laboratorium het enige was dat deze mutatie gedetecteerd heeft en dat de analyse van het staal met een andere methode een negatief resultaat gegeven heeft voor deze mutatie, heeft het experten comité (vergadering van de 27/10/2021) geconcludeerd dat deze detectie van de mutatie EGFR Ex20Ins wel degelijk vals positief was.

## 5. Gebruikte methodes

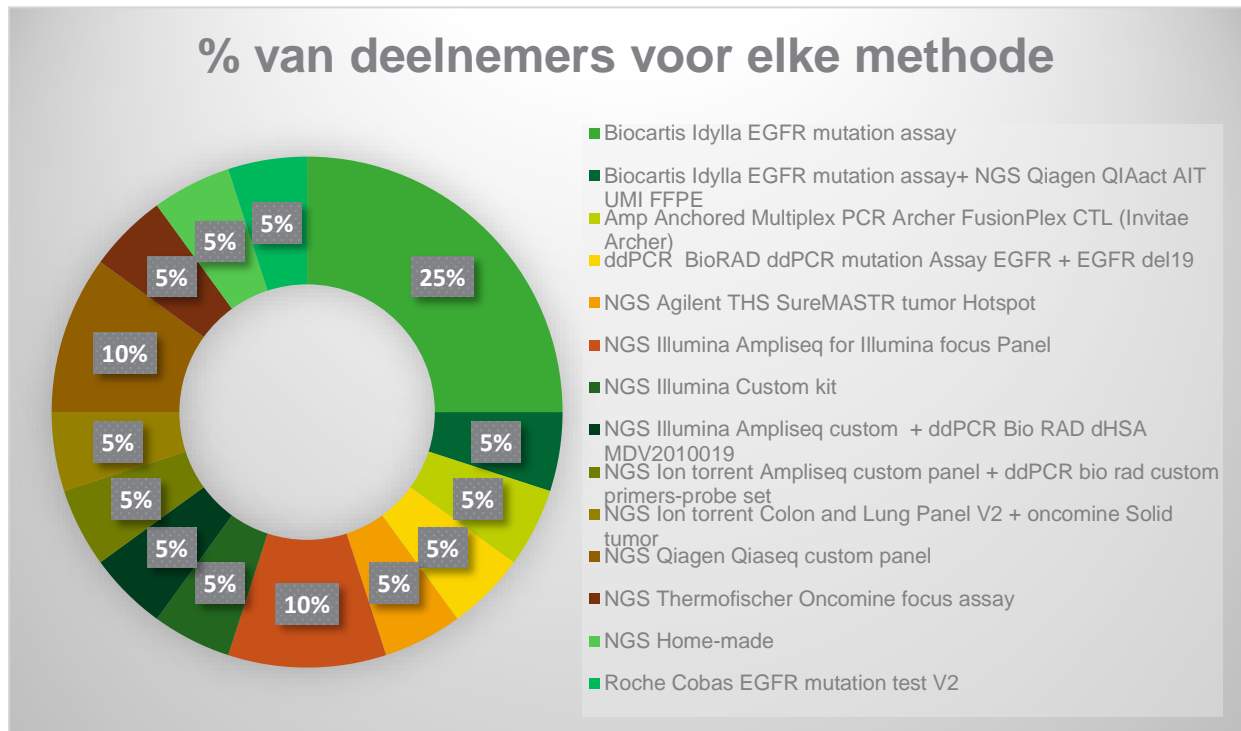


Chart 6 : Verdeling van laboratoria per gebruikte methode voor de detectie van mutatie in het gen EGFR

De meest gebruikte methodes voor de detectie van mutatie van het gen EGFR zijn de NGS en de Idylla EGFR mutation assay.

Houd er rekening mee dat wegens de gestopte fabricatie van de volgende kits: Agilent SurMASTR hotspot en Roche SeqCAP EZ, hebben 3 laboratoria hebben veranderd van kits tussen 2020 en 2021. Twee laboratoria hebben een kit van de firma Illumina gebruikt en de andere een kit van de firma Roche.

Een laboratorium heeft veranderd van methode. In 2020, heeft het een NGS Illumina NextSeq methode gebruikt en nu gebruikt het een "target enrichment" methode met de anchored Multiplex PCR (AMP) voor een targeted NGS.

### b. RAS

De laboratoria hebben 2 FFPE-coupees van 5 µm per klinische casus ontvangen. We hebben aan de laboratoria gevraagd om de aanwezigheid van de KRAS-mutaties met moleculaire methodes op te sporen. We hebben ook de gebruikte methode en de allelfrequentie indien deze bepaald werd gevraagd.

## 1. Resultaten per staal

Staal	Verwachte resultaten	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
<b>F00050516</b>	NRAS WT	NRAS WT	21 (100)
<b>F00050423</b>	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)
		Niet bepaald	1 (4.7)
<b>C00018871.2</b>	NRAS c.181C>A p.(Gln61Lys)	NRAS c.181C>A p.(Gln61Lys)	17 (80.9)
		WT	1 (4.7)
		Niet bepaald	3 (14.3)

- Voor het staal **F00050423**, heeft het laboratorium dat de detectie van mutaties niet kon uitvoeren een technisch probleem gehad door de onbeschikbaarheid van de KRAS cartridge bij de firma Biocartis.
- Voor het staal **C00018871.2**, heeft het laboratorium dat geen mutaties in het staal gedetecteerd heeft ons aangegeven dat het staal van suboptimale kwaliteit was.
- Voor het staal **C00018871.2**, hebben 2 laboratoria die de detectie van mutaties niet konden uitvoeren ons aangegeven dat de kwaliteit van het geëxtraheerde DNA van een suboptimale kwaliteit was. Het andere laboratorium heeft ons aangegeven dat het resultaat van de analyse "invalide" was.

In tegenstelling tot wat vermeld was op het voorlopig rapport, hebben 17 laboratoria en niet 16 de verwachte mutatie NRAS c.181C>A p.(Gln61Lys) gedetecteerd. Na contact, heeft het laboratorium dat in eerste instantie de mutatie NRAS c.181C>A p.(Glu61Lys) geantwoord heeft ons aangegeven dat hij een schrijffout op het formulier gemaakt heeft. Het laboratorium heeft wel de mutatie NRAS c.181C>A p.(Gln61Lys) gedetecteerd. Het laboratorium heeft ons zijn ruwe gegevens gestuurd. Dit laboratorium is verschillend van het laboratorium dat een schrijffout gemaakt heeft voor de parameter EGFR.

## 2. Resultaten per laboratorium

Labo.	Gebruikte methodes	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 + NGS Qiagen QIAact AIT UMI FFPE	X	X (14%)	X (42%)
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	Niet bepaald*
9	Idylla NRAS-BRAF mutation test + Idylla KRAS mutation test	X	X	X
10	NGS Illumina Custom Kit	X	X (14%)	<b>WT</b>
11	NGS illumina NextSeq Custom Panel	X	X (12%)	Niet bepaald*
12	NGS Illumina Ampliseq Hotspot cancer Panel V2	X	X (17.1%)	X (44.4%)
<b>13*</b>	NGS Qiagen qiaseq Targeted DNA Custom panel	X	KRAS c.38G>A (p.G13D) (9.5%) NRAS c34G>A(p.Gly12Ser) (15.7%) [Nieuwe analyse na de afsluiting : 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
<b>16**</b>	NGS Qiagen Custom panel qiaseq	NRAS WT KRAS c34G>T (p.Gly12Cys)	KRAS c35G>A(p. G12D) (14%) KRAS c322G>A(p.Asp108Asn) (6.8%) NRAS c111+3G>A (5.1%)	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	Niet bepaald**	X
20	NGS Roche + home-made KAPPA HyperCap custom solid panel	X	X (15%)	Niet bepaald*
21	NGS Home-made	X	X (13%)	X (41%)

\*Dit laboratorium heeft de analyse op nieuwe coupes uitgevoerd na de afsluiting van de enquête. Het heeft ons aangegeven dat de kwaliteit van de verkregen sequenties suboptimaal was. Door de analyse van de nieuwe coupes, heeft het laboratorium de KRAS c35G>A (p.G12D) mutatie gedetecteerd (AF=7.1%) maar het heeft de mutatie KRAS c.38G>A (p.G13D) niet meer gedetecteerd. In routine, heeft het laboratorium "onbeslist" geantwoord.

\*\*Dit laboratorium heeft ons aanvankelijk aangegeven dat het de mutatie NRAS c181C>A p.(Glu61Lys) gedetecteerd heeft. Na contact en zending van zijn ruwe gegevens, heeft het laboratorium ons gezegd dat hij een schrijffout op het formulier gemaakt heeft. Het laboratorium heeft wel de mutatie NRAS c.181C>A p.(Gln61Lys) gedetecteerd.

### Verdeling van de gerapporteerde allelfrequenties voor de detectie van de mutatie KRAS G12D

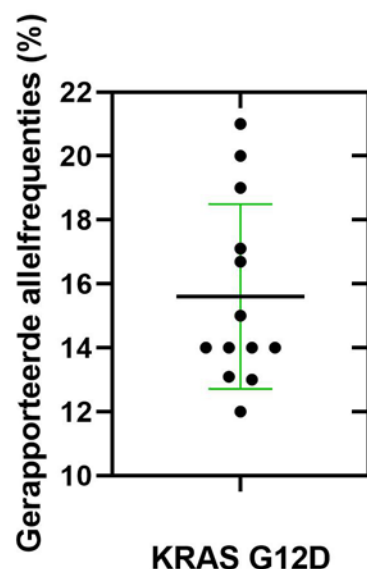


Chart 7 : Verdeling van de gerapporteerde allelfrequenties voor de detectie van de mutatie KRAS G12D in het staal F00050423

2 laboratoria die een NGS-methode gebruiken hebben een hogere allelfrequentie dan het gemiddelde van de gerapporteerde allelfrequentie gerapporteerd. 1 laboratorium dat ook de NGS gebruikt heeft een lagere allelfrequentie dan het gemiddelde van de gerapporteerde allelfrequentie gerapporteerd. Deze resultaten moeten niettemin in perspectief worden geplaatst met de feedback van de laboratoria over de kwaliteit en de kwantiteit van het geëxtraheerd DNA en zijn onder voorbehoud van de mogelijk heterogeniteit van de tumor.

## Verdeling van de gerapporteerde allelfrequenties voor de detectie van de mutatie NRAS Q61K

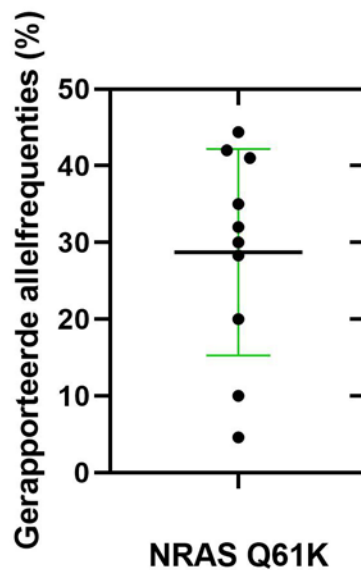


Chart 8 : Verdeling van de gerapporteerde allelfrequenties voor de detectie van de mutatie NRAS Q61K in het staal C00018871.2

2 laboratoria die een NGS-methode gebruiken hebben een veel lagere allelfrequentie dan het gemiddelde van de gerapporteerde allelfrequentie gerapporteerd. Deze resultaten moeten niettemin in perspectief worden geplaatst met de feedback van de laboratoria over de kwaliteit en de kwantiteit van het geëxtraheerd DNA en zijn onder voorbehoud van de mogelijk heterogeniteit van de tumor.

### 3. Commentaren

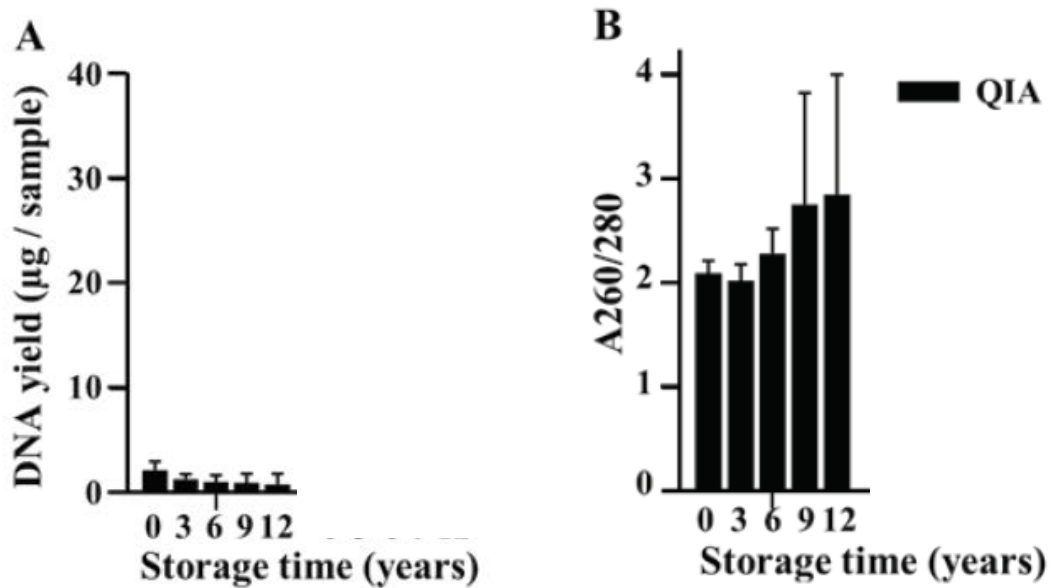
- Eén laboratorium heeft ons aangegeven dat het staal **F00050516** van slechte kwaliteit was. Niettemin, heeft het laboratorium goed op de enquête geantwoord.
- Eén enkel laboratorium heeft gerapporteerd dat het de mutatie KRAS c34G>T (p.Gly12Cys) gedetecteerd heeft met een allelfrequentie van 6.1 % in het staal **F00050516**.
- Voor de stalen **F00050423** et **C00018871.2**, moest één laboratorium zijn rapporteringslimiet verhogen tot 10%.
- Het laboratorium dat de mutatie KRAS G12D in het staal **F00050423** niet gedetecteerd heeft, heeft ons aangegeven dat het staal van slechte kwaliteit was.
- Het laboratorium dat de aanwezigheid van mutaties in het staal **F00050423** niet kon bepalen heeft ons aangegeven dat er een onbeschikbaarheid van de Idylla cartridge door de fabrikant Biocartis was. Het laboratorium heeft de cartridge dus niet op tijd voor gekregen de enquête.
- Eén enkel laboratorium heeft gerapporteerd dat het de mutaties KRAS c322G>A(p.Asp108Asn) en NRAS c111+3G>A gedetecteerd heeft met een allelfrequentie van respectievelijk 6.8 % en 5.1 % in het staal **F00050423**. Het heeft ze aangegeven als VUS (variant of unknown significance).
- Het laboratorium dat geen mutaties (WT) in het staal **C00018871.2** gedetecteerd heeft heeft ons aangegeven dat het staal van slechte kwaliteit was. Na contactname, heeft het laboratorium ons aangegeven dat in routine een nieuw staal zou gevraagd worden.
- Van de 3 laboratoria die de aanwezigheid van mutaties in het staal **C00018871.2** niet kunnen bepalen hebben 2 ons aangegeven dat het geëxtraheerd DNA van een suboptimale kwaliteit was en de andere heeft ons een "invalide" resultaat aangegeven. Een van deze laboratoria heeft ons ook een suboptimale kwantiteit van het geëxtraheerd DNA aangegeven.

- Voor staal **C00018871.2**, heeft 1 laboratorium gerapporteerd dat het de mutatie KRAS c34G>T (p.Gly12Cys) gedetecteerd heeft met een allelfrequentie van 59%.

Er werd een analyse van de wetenschappelijke literatuur met betrekking tot een mogelijke correlatie tussen de bewaringsduur en de kwaliteit/kwantiteit van het geëxtraheerde DNA uitgevoerd gezien de problemen die tijdens deze enquête gemeld werden. Volgens verschillende recente artikels dalen zowel de kwaliteit als de kwantiteit van het geëxtraheerde DNA af in functie van de bewaringsduur van de coupes:

“Storage of the FFPE tissue block for  $\geq 3$  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*



*Figuur 1 : A) Gemiddeld hoeveelheid van geëxtraheerd DNA van FFPE coupes bewaard gedurende minder dan 1 jaar, gedurende 3, 6, 9 of 12 jaren en gekwantificeerd met een UV methode. B) Kwaliteit van het geëxtraheerde DNA van FFPE-coupes bewaard gedurende minder dan 1 jaar, gedurende 3, 6, 9 of 12 jaren en gekwantificeerd met de ratio van de absorptie aan een golflengte van 260 en 280. Bron: Watanabe M, Experimental and Therapeutic medicine, 2017*



#### 4. Gebruikte methodes

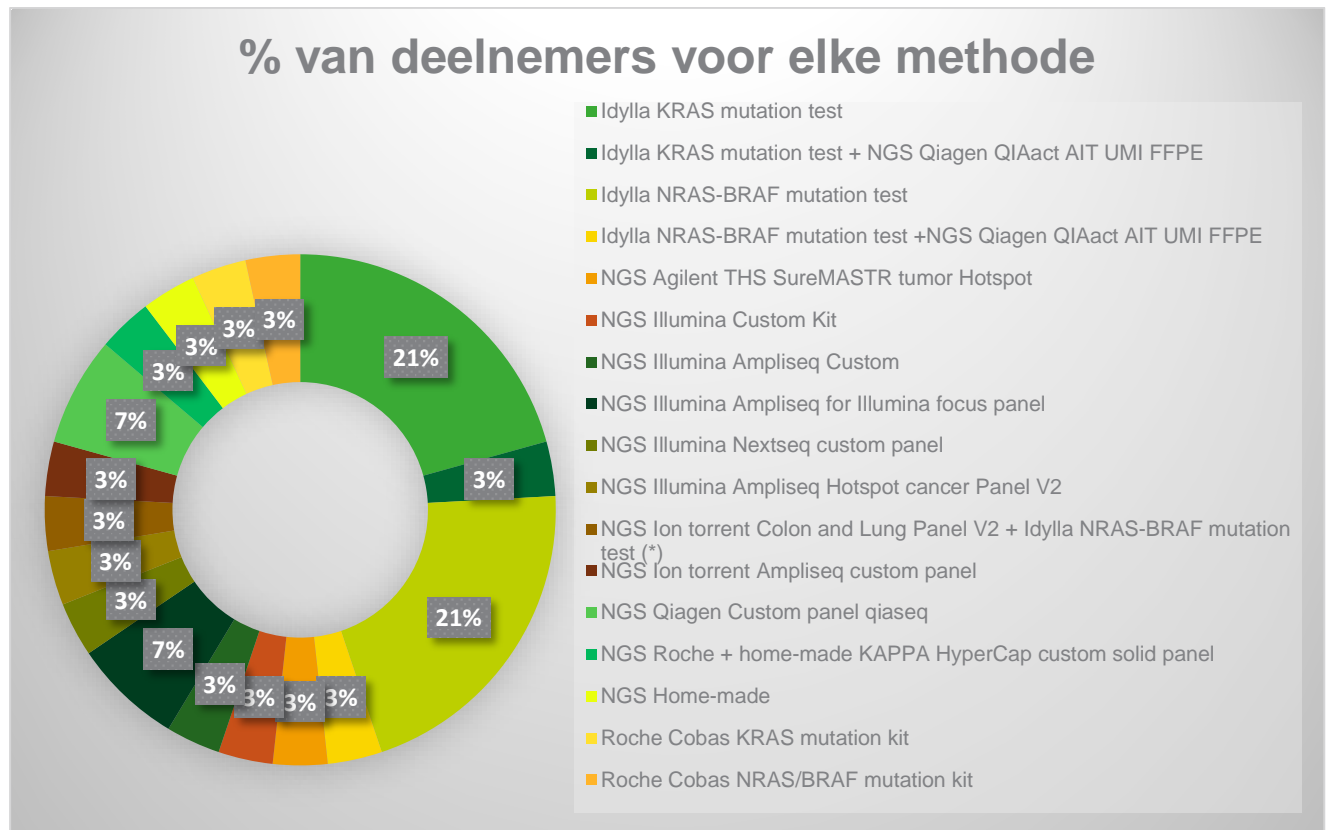


Chart 9 : Verdeling van laboratoria per gebruikte methode voor de detectie van KRAS en NRAS genen.

De meest gebruikte methodes zijn de Idylla en NGS.

Merk op dat wegens de stopzetting van fabricatie van de kits: Agilent SurMASTR hotspot en Roche SeqCAP EZ, 3 laboratoria van kit veranderd zijn tussen 2020 en 2021. Twee laboratoria hebben een kit van de firma Illumina gebruikt en het andere een kit van de firma Roche.

#### Conclusies over de resultaten van de laboratoria

Betreffende de detectie van de mutatie EGFR T790M, hebben alle laboratoria de verwachte mutatie in het overeenkomstige staal gedetecteerd. De analyse van deze mutatie zal in 2022 niet opnieuw voorgesteld worden. Voor 2023, zal de nadruk liggen, als mogelijk, op « routine » stalen en dus op FFPE-coupes waarvan het DNA geëxtraheerd en geanalyseerd zal worden.

Betreffende de genen KRAS en NRAS, zijn de resultaten van de laboratoria bevredigend. Alleen 1 laboratorium heeft de verwachte KRAS-mutatie in het overeenkomstige staal niet gedetecteerd. Voor het gen NRAS, heeft alleen 1 laboratorium de verwachte mutatie niet gedetecteerd maar hij heeft ons aangegeven dat het staal van een suboptimale kwaliteit was. Deze resultaten moeten dus in perspectief worden geplaatst met de feedback van de laboratoria over de kwaliteit en de kwantiteit van DNA uit de coupes. Inderdaad, werden deze kritische parameters als suboptimaal beschouwd door 7 laboratoria die NGS gebruikt hebben.

Voor de laboratoria die schrijffouten gemaakt hebben, wordt aanbevolen wordt dat zij dit documenteren in hun kwaliteitssysteem.

De detectie van de mutatie in KRAS en NRAS-genen zal opnieuw gebeuren in 2022. De enquête zal nogmaals met FFPE-coupes van patiënten stalen gebeuren. Bij de keuze van de stalen, zullen we er de nadruk op leggen dat de stalen ten laatste in de twee voorafgaande jaren afgenomen werden.

## BRAF V600E

### Stalen

De stalen zijn 5 µm FFPE-coupees van melanoom biopsieën. Het zijn patiënten stalen van de biobank Discovery Life Science, Ohio USA.

De stalen waren vergezeld van klinische gegevens van de patiënten: leeftijd, geslacht, ras, lokalisatie van de tumor, type van de tumor, pathologische data, gegevens over welke behandeling de patiënt vooraf heeft gekregen (als beschikbaar) en ook de mutationele status van BRAF V600E. Het percentage tumorale cellen werd eveneens gecommuniceerd aan de laboratoria.

Door de problemen met de RAS stalen tijdens onze vorige enquête 2021/3, meer bepaald de link tussen de bewaringstijd en de kwaliteit en kwantiteit van geëxtraheerd DNA, werden de stalen bestemd voor de enquête 2021/4 getest in het laboratorium van een expert van het expertencomité van moleculaire biologie, prof. Jacques Van Huysse. Uit deze analyse werd besloten dat één van de twee te gebruiken stalen niet bruikbaar was voor een kwaliteitscontrole door de lage DNA kwaliteit en kwantiteit.

### Klinische casus C00046336.K :

Man 50 jaar

Borstlaesie: geïncercereerd kwaadaardig nodulair melanoom met een verticale groeifase. Het stadium van de tumor is pT 4b met een focale necrose en focale angiolympfatische invasie. De laesie raakt de laterale marges van het specimen en komt dichtbij de diepe marge. Minimale tot beperkte aanwezigheid van infiltrerende lymfocyten. Aanwezigheid van verschillende verspreide foci van angiolympfatische invasie. De mitotische activiteit is hoog (31 /mm<sup>2</sup>).

### Deelnemers

23 laboratoria waren voor deze enquête ingeschreven. De verdeling is als volgt:

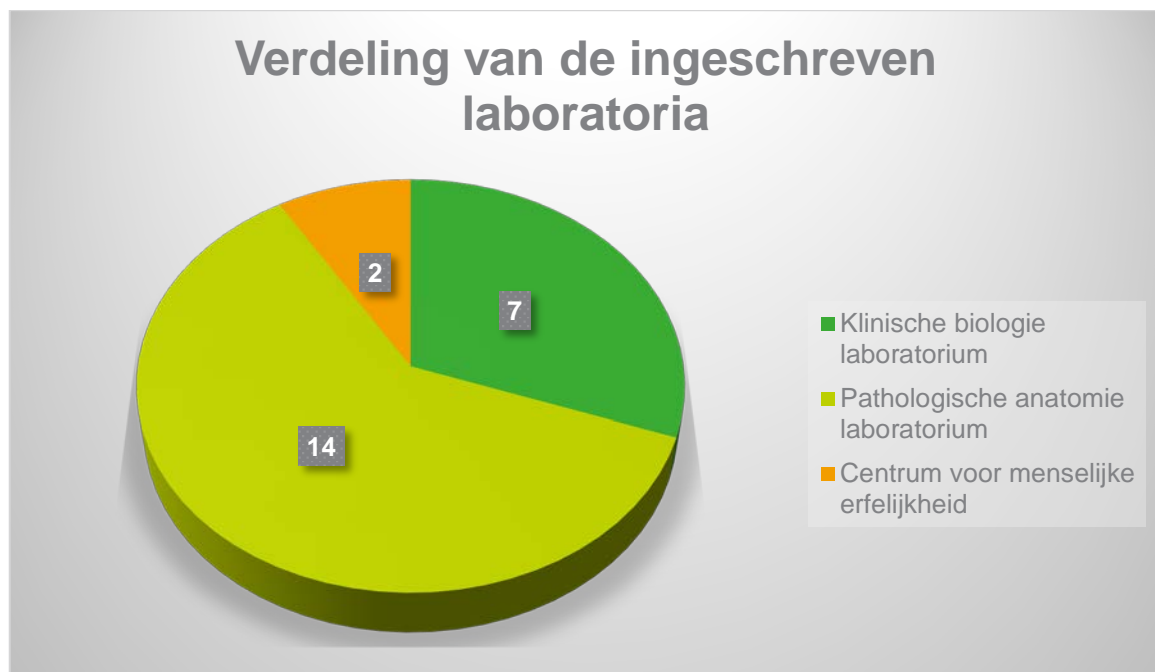


Chart 10 : Verdeling van ingeschreven laboratoria per specialiteit

Alle ingeschreven laboratoria hebben geantwoord.

### Resultaten

De laboratoria hebben 2 FFPE-coupees van melanoom biopsieën voor een klinische casus ontvangen. We hebben gevraagd aan de laboratoria om de aanwezigheid van de BRAF V600E mutatie met moleculaire

methodes op te sporen. We hebben hen ook gevraagd om de allelfrequentie te geven (indien bepaald) en hun gebruikte methode.

## 1. Resultaten per staal

Staal	Verwachte resultaten	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
<b>C00046336.K</b>	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)/ BRAF c.1799_1800delinsAT; c.1799_1800delinsAC p.(Val600Asp) *	7 (30.4%)
		BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)/ BRAF c.1799_1800delinsAT; c.1799_1800delinsAC p.(Val600Asp) *	2 (8.7%)

\*De gebruikte methode laat niet toe om deze varianten individueel te identificeren

## 2. Resultaten per laboratorium

		<b>C00046336.K</b>	
Labo	Gebruikte Methodes	BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)	AF
1	Biocartis Idylla BRAF mutation test	BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)/ c.1799_1800delinsAT; c.1799_1800delinsAC p.(Val600Asp)/ c.1799_1800delinsAA p.(Val600Glu)	NVT
2	NGS Illumina Ampliseq Illumina focus panel	c.1799T>A p.(Val600Glu)	33%
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	NVT
8	Roche Cobas 4800 BRAF V600 mutation test (rtPCR)	Val600Glu	NVT
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)	NVT

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; c.1799_1800delinsAC p.(Val600Asp)/ c.1799_1800delinsAA p.(Val600Glu)	NVT
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)	NVT
15	Biocartis Idylla BRAF mutation test	BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)/ c.1799_1800delinsAT; c.1799_1800delinsAC p.(Val600Asp)	NVT
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)	NVT
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)	NVT
19	Biocartis Idylla BRAF mutation test	BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)/ c.1799_1800delinsAT; c.1799_1800delinsAC p.(Val600Asp)	NVT
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)	NVT
22	NGS Roche home-made Kapa Hypercap custom solid panel (73 genen)	c.1799T>A p.(Val600Glu)	30%
23	NGS home-made	c.1799T>A p.(Val600Glu)	28%

\*Dit laboratorium heeft de twee coupes apart geanalyseerd.

## Verdeling van de gerapporteerde allelfrequenties voor de detectie van de mutatie BRAF V600E

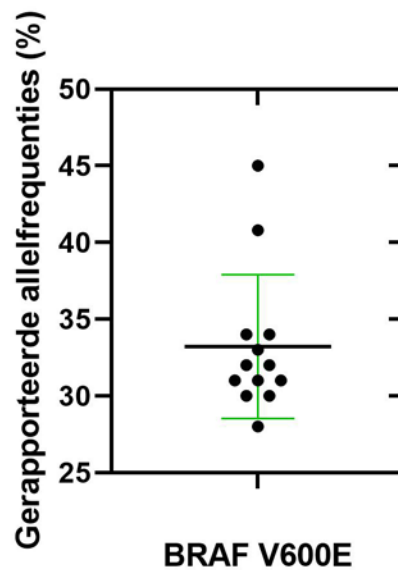


Chart 11 : Verdeling van de gerapporteerde allelfrequenties voor de detectie van de mutatie BRAF V600E in het staal C00046336.K.

2 laboratoria die een NGS-methode gebruiken hebben een hogere allelfrequentie dan de gemiddelde van de gerapporteerde allelfrequentie gerapporteerd. Deze resultaten zijn onder voorbehoud van de mogelijke heterogeniteit van de tumor.

### 3. Commentaren

- 4 laboratoria hebben ons aangegeven dat de aanwezigheid van een BRAF-mutatie gelinkt was aan gevoeligheid aan een therapie met BRAF-inhibitoren.
- Zoals beschreven in de literatuur, laat de Idylla BRAF mutation kit niet toe om de volgende varianten individueel te identificeren: BRAF c.1799T>A p.(Val600Glu)/ c.1799\_1800delinsAT p.(Val600Asp); c.1799\_1800delinsAC p.(Val600Asp)/ c.1799\_1800delinsAA p.(Val600Glu). Deze mutaties bevinden zich namelijk in hetzelfde codon.

#### 4. Gebruikte methodes

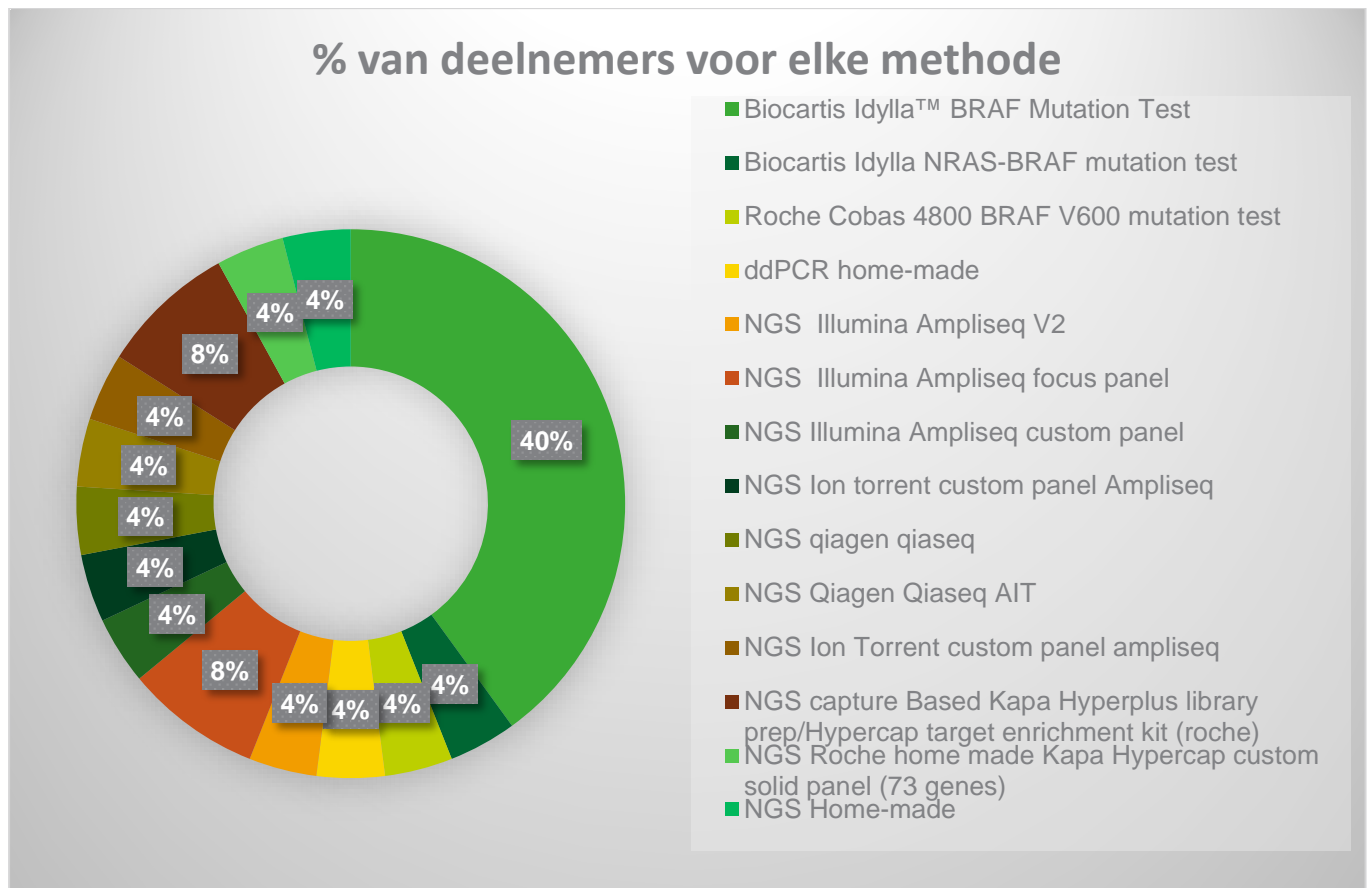


Chart 12 : Verdeling van laboratoria per gebruikte methode voor de detectie van mutatie in BRAF gen

De meest gebruikte methodes voor de detectie van de mutatie BRAFV600E zijn de real-time PCR (Idylla BRAF mutation test en Roche Cobas BRAF V600 Mutation test) en de NGS.

Merk op dat wegens de stopzetting van fabricatie van de kit: Roche SeqCAP EZ, 2 laboratoria van kit veranderd zijn tussen 2020 en 2021. Een laboratorium heeft een kit van de firma Illumina gebruikt en de andere een kit van de firma Roche.

Een laboratorium heeft zijn methode veranderd. In 2020 heeft het een NGS Illumina Truseq Amplicon methode gebruikt, nu gebruikt het de Illumina Ampliseq V2 methode.

#### Conclusies over de resultaten van de laboratoria

De resultaten van de laboratoria voor deze 2021/4-BRAFV600E enquête zijn bevredigend. Alle laboratoria hebben de aanwezigheid van de BRAF V600E mutatie gevonden. Echter, 9 laboratoria konden de varianten V600E, V600E2 en V600D niet van elkaar onderscheiden door hun gebruikte methode. Deze varianten bevinden zich namelijk in hetzelfde codon. Er is echter geen impact voor de patiënt op de therapie met BRAF-inhibitoren die is gelinkt aan de aanwezigheid van een BRAFV600 mutatie.

## HER 2 (2021/5)

### Stalen

De stalen zijn 4 µm FFPE-coupees van borstcarcinoom biopsieën. Het zijn patiënten stalen van de biobank Discovery Life Science, Ohio USA.

De stalen waren vergezeld van klinische gegevens van de patiënten: leeftijd, geslacht, ras, lokalisatie van de tumor, type van de tumor, pathologische data, gegevens over welke behandeling de patiënt vooraf (als beschikbaar) heeft gekregen, de resultaten van de IHC en ook de status van HER2 (geamplificeerd of niet) behalve voor de IHC 2+ casus.

#### Klinische casus F00105488:

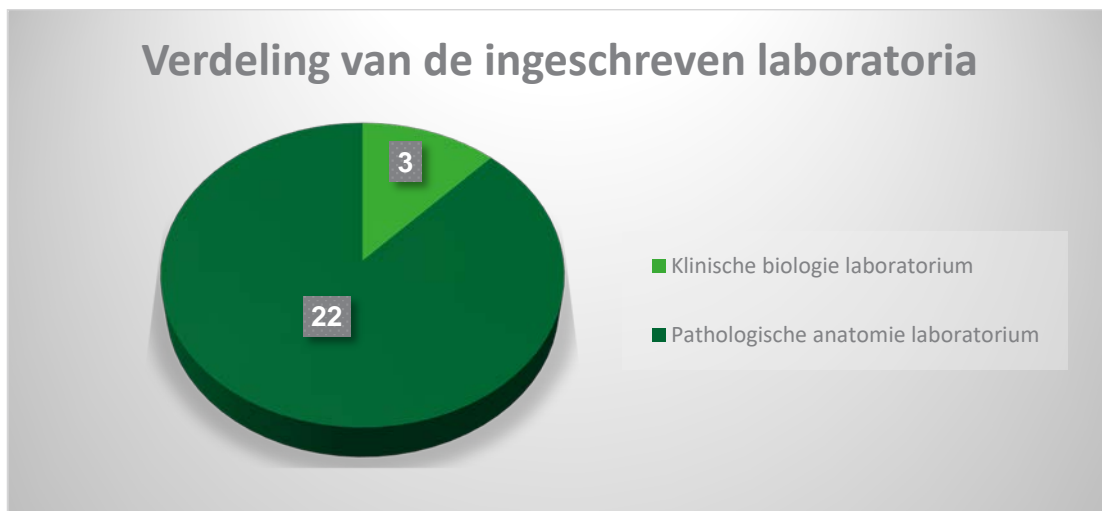
51-jarige vrouw met een borsttumor van 2.5 cm. Geen bijzonderheden ter hoogte van de lymfeklieren. Microscopische beschrijving: G2 invasief ductaal carcinoom N.O.S. 3 van de 10 onderzochte lymfeklieren tonen metastases. De HER2 IHC-score is 3+ (ER-positief en PR-negatief).

#### Klinische casus F00111263:

68-jarige vrouw met een matig gedifferentieerd invasief borstcarcinoom van het NST type ter hoogte van de linkerborst; graad G2 en stadium III-C. NPI=6; UICC TNM: T2N3aMO. In 14 van de 14 onderzochte lymfeklieren werden metastases gedetecteerd. Geen andere metastases gelokaliseerd. De HER2 IHC-score is 2+ (ER-positief en PR-positief).

### Deelnemers

25 laboratoria waren voor deze enquête ingeschreven. De verdeling is als volgt:



*Chart 13 : Verdeling van ingeschreven laboratoria per specialiteit*

Alle ingeschreven laboratoria hebben geantwoord.

### Resultaten

De laboratoria hebben 2 FFPE-coupees van twee verschillende klinische casussen ontvangen. We hebben aan de laboratoria gevraagd om de amplificatie van het HER2 gen met ISH-methodes op te sporen. Ter informatie hebben we hen voor elke klinische casus het IHC-resultaat gegeven. We hebben ook hun gebruikte methode en hun gebruikte richtlijnen gevraagd.

## 1. Resultaten per staal

Staal	Verwachte resultaten	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
F00105488	HER2 geamplificeerd	HER2 geamplificeerd	25 (100)
F00111263	HER2 equivocal (niet geamplificeerd*)	HER2 niet geamplificeerd	25 (100)

### \*Volgens de consensus van de antwoorden van de deelnemers

In tegenstelling tot wat vermeld was op het voorlopig rapport, hebben 25 laboratoria (en niet 24) de amplificatie van HER2 in de casus F00105488 gedetecteerd. Na contact, heeft het laboratorium dat in eerste instantie "niet geamplificeerd" geantwoord heeft ons aangegeven dat hij een schrijffout op het formulier gemaakt heeft. Het laboratorium heeft ons zijn ruwe gegevens gestuurd.

## 2. Resultaten per laboratorium

Labo.	Gebruikte Methodes	F00105488	F00111263
		Geamplificeerd	Niet geamplificeerd
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

\* Dit laboratorium heeft ons aanvankelijk aangegeven dat staal F00105488 niet amplificeerd was. Na contact en opsturen van zijn ruwe gegevens (Ratio Her2/CEP17=14.33), heeft het laboratorium ons gezegd dat hij een schrijffout op het formulier gemaakt heeft. Het laboratorium heeft wel de amplificatie gedetecteerd.

### 3. Commentaren

- 6 laboratoria hebben ons aangegeven dat een deel van het weefsel losgekomen was. De analyse was wel nog beoordeelbaar.
- 1 laboratorium heeft ons aangegeven dat het rode signaal te zwak was. Dit is misschien gelinkt aan de pre-analytische fase bij de firma of aan het type van de gebruikte glasjes.
- 3 laboratoria hebben ons hun HER2/CEP17 ratio's bezorgd:
  - F00105488: 12.4 (methode Ventana) ; 7,91 (methode Ventana) ; 5.29 (methode Abbott Vysis)
  - F00111263: 1.3 (methode Ventana) ; 1.4 (methode Ventana) ; 1.05 (methode Abbott Vysis)

### 4. Gebruikte methodes

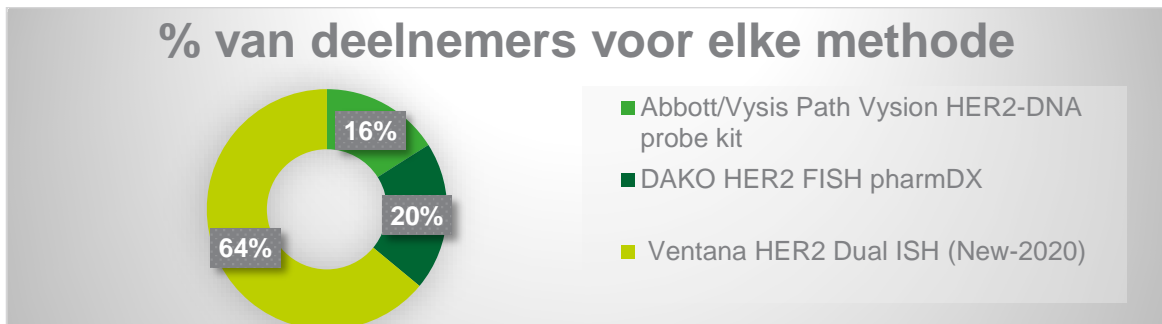
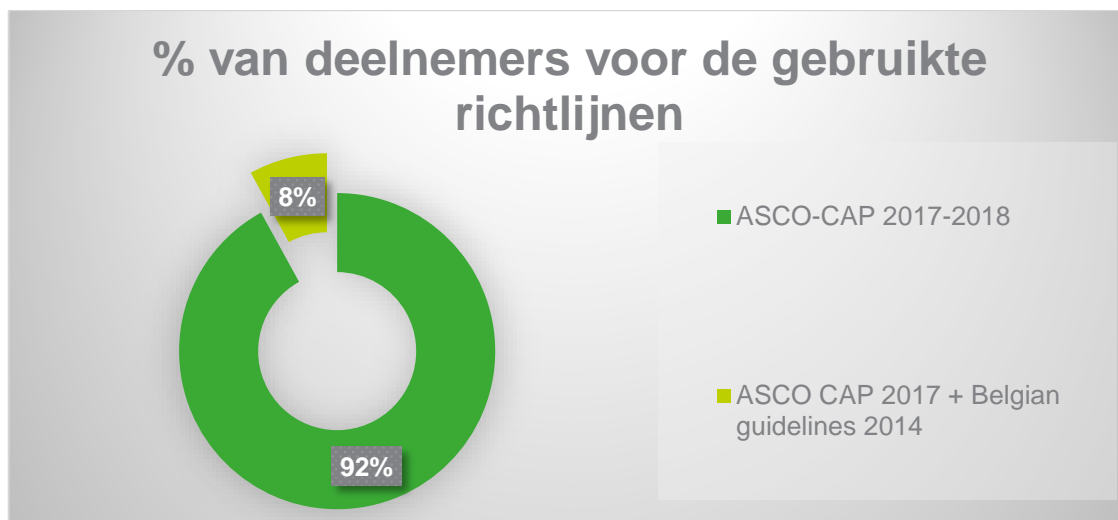


Chart 14 : Verdeling van laboratoria per gebruikte methode voor de detectie van de amplificatie van *HER2* gen

De meest gebruikte methode om de amplificatie van HER2 op te sporen is de methode Ventana HER2 Dual ISH.

## 5. Gebruikte richtlijnen

Door de 25 deelnemers werden de volgende richtlijnen gebruikt om de amplificatie van HER2 op te sporen:



*Chart 15 : Verdeling van laboratoria volgens de gebruikte richtlijnen voor de interpretatie van de HER2 analyse*

### Conclusies over de resultaten van de laboratoria

De resultaten van de laboratoria voor deze 2021/5-HER2 enquête zijn bevredigend. Alle deelnemers hebben de amplificatie van het HER2 gen in het geamplificeerde staal teruggevonden. Voor de equivocal casus, hebben alle laboratoria "niet geamplificeerd" geantwoord. Het laboratorium dat een schriffout gemaakt heeft, heeft dit gedocumenteerd in zijn kwaliteitssysteem.

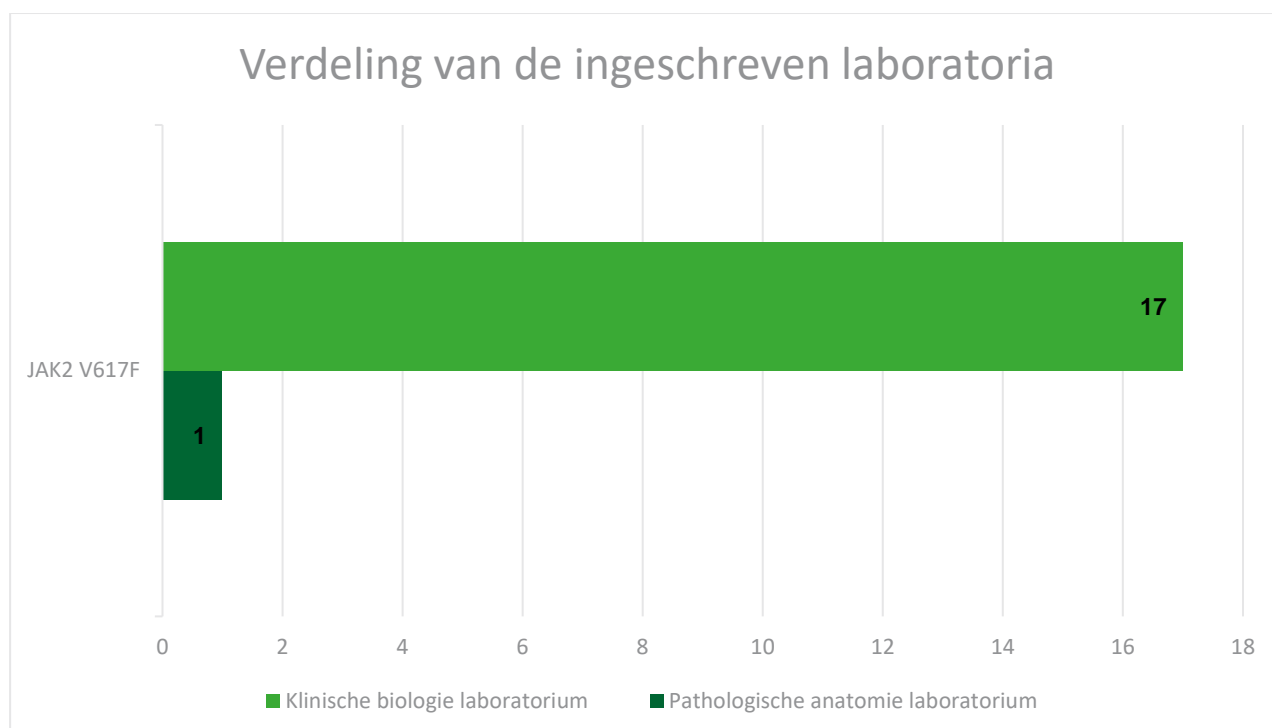
## Myéloïde: JAK2

### Stalen

Volgens de aanbestedingsprocedure uitgevoerd volgens de opstelling van een lastenboek, werden de JAK2 stalen bij de firma Amplitech, Compiègne, Frankrijk gekocht. De firma is een verdeler van de stalen van de firma Horizon Discovery Ltd-Waterbeach, United Kingdom. De stalen worden geleverd samen met een certificaat dat de aanwezigheid of afwezigheid van de mutatie en de allelfrequentie garandeert.

### Deelnemers

18 laboratoria waren voor deze enquête ingeschreven. De verdeling van de laboratoria is als volgt:



### Resultaten

De laboratoria ontvingen 2 tubes die respectievelijk 100µl en 20 µl DNA in Tris-EDTA bevatten (DNA-concentratie: 50 ng/µl). Er werd hen gevraagd de aanwezigheid van de JAK2 V617F mutatie op te sporen met moleculaire methoden in elk van beide stalen en om hun antwoorden met de HGVS-nomenclatuur te geven. De laboratoria hadden ook de mogelijkheid om andere mutaties dan JAK2V617F aan te geven.

#### 1. Resultaten per staal

Staal	Verwachte resultaten (AF)	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
<b><u>JK2021-1</u></b>	JAK2: c.1849G>T (p.Val617Phe)  NIET GEDETECTEERD	GEDETECTEERD	0
		NIET GEDETECTEERD	18 (100)
		NIET BEPAALD	0
<b><u>JK2021-2</u></b>	JAK2:c.1849G>T (p.Val617Phe) <b>(50%)</b>  GEDETECTEERD	GEDETECTEERD	18 (100)
		NIET GEDETECTEERD	0
		NIET BEPAALD	0

In tegenstelling tot wat vermeld was op het voorlopig rapport, hebben alle laboratoria de verwachte mutatie in het overeenkomstig staal gedetecteerd. Na contact, heeft het laboratorium dat in eerste instantie de mutatie in het staal JK2021-1 gedetecteerd heeft ons aangegeven dat hij een schrijffout op het formulier gemaakt heeft. Het laboratorium heeft wel de mutatie in het staal JK2021-2 gedetecteerd. Het laboratorium heeft ons zijn ruwe gegevens gestuurd.

## 2. Resultaten per laboratorium

Lab	Gebruikte methodes	JK2021-1	JK2021-2
		JAK2 WT	NM_004972.3(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%)

\*Het laboratorium heeft ons aangegeven dat de stalen laattijdig geleverd werden. De stalen hebben dus gedurende een onbekende tijd op kamertemperatuur gelegen.

\*\*Dit laboratorium heeft ons aanvankelijk aangegeven dat het de mutatie JAK2 c.1849G>T (p.Val617Phe) in het staal JK2021-1 gedetecteerd heeft. Na contact, heeft het laboratorium ons gezegd dat hij een schrijffout op het formulier gemaakt heeft. Het laboratorium heeft wel de mutatie in het staal JK2021-2 gedetecteerd.

### Verdeling van de gerapporteerde allelfrequenties voor de detectie van de mutatie JAK2 V617F

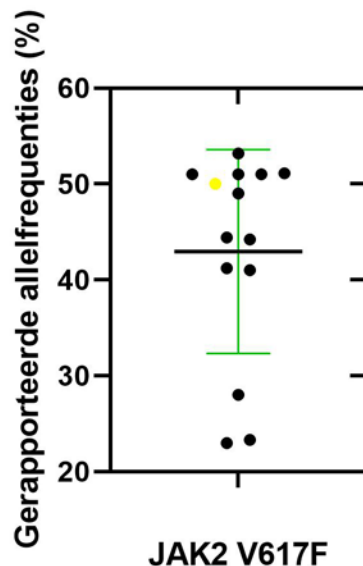


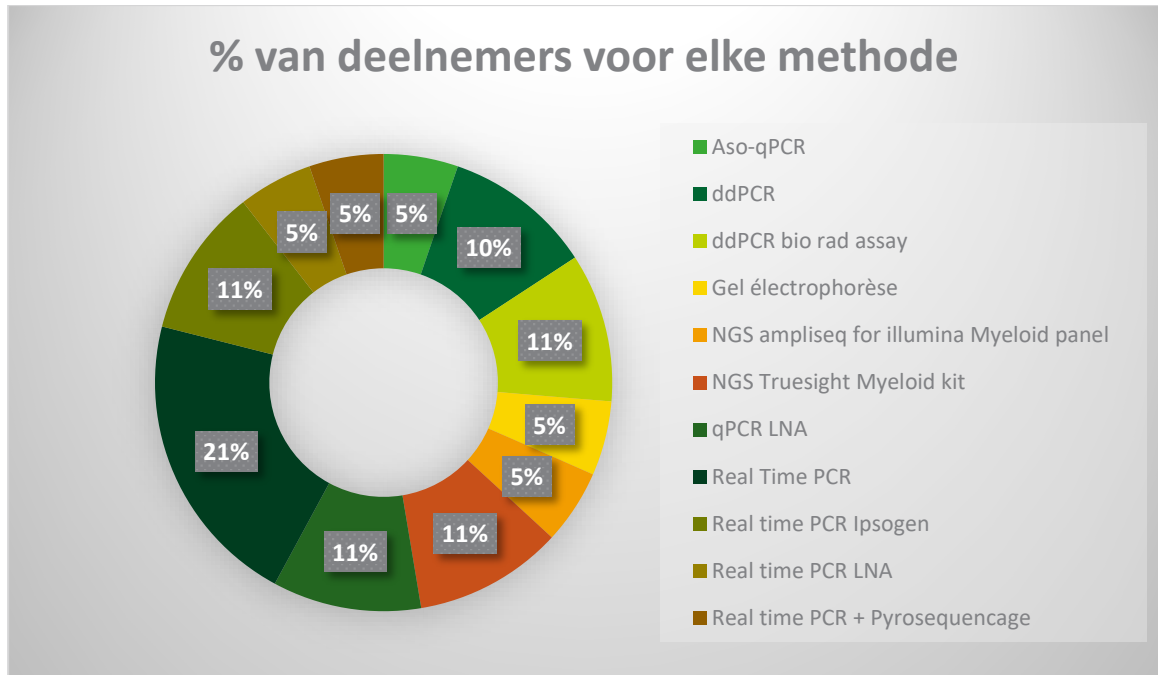
Chart 16: Verdeling van de allelfrequenties voor de detectie van de mutatie JAK2 V617F in het staal JK2021-2. Het punt in geel is de allelfrequentie gegeven door de leverancier van het staal.

3 laboratoria die een (LNA) qPCR home made methode gebruiken hebben een allelfrequentie ver onder de verwachte allelfrequentie en het gemiddelde van de gerapporteerde allelfrequenties. Wij raden deze laboratoria aan de validatie van hun techniek te verifiëren. Inderdaad, elementen als de specificiteit van de primers of de temperatuur kunnen een effect hebben op de bekomen allel frequentie. Indien nodig kunnen deze laboratoria de enquête-coördinator contacteren om een nieuw staal te bekomen voor verificatie/validatie.

### 3. Commentaren

- De resultaten van het laboratorium dat de stalen laattijdig ontvangen heeft zijn onder voorbehoud van een verminderde kwaliteit door de niet conforme temperatuur condities.

#### 4. Gebruikte methodes



De meeste gebruikte methodes voor de detectie van de JAK2 V617F mutatie zijn de Real time PCR (45%), de ddPCR (22%) en de qPCR (16%) methodes.

Een laboratorium heeft zijn methode veranderd. In 2020 heeft het een elektroforese methode gebruikt, nu gebruikt het de qPCR Ipsogen JAK2 Mutaquant Kit en illumina Truesight Myeloid kit methodes.

#### Conclusies over de resultaten van de laboratoria

De resultaten van de laboratoria voor deze enquête over de detectie van de mutatie JAK2V617F zijn bevredigend. Alle laboratoria hebben de verwachte JAK2V617F in het overeenkomstige staal teruggevonden. Het laboratorium dat een schrijffout heeft gemaakt, wordt aanbevolen dit te documenteren in zijn kwaliteitssysteem.

## Uitbestede evaluatie: Detectie van de mutaties van de Factor V en Protrombine genen

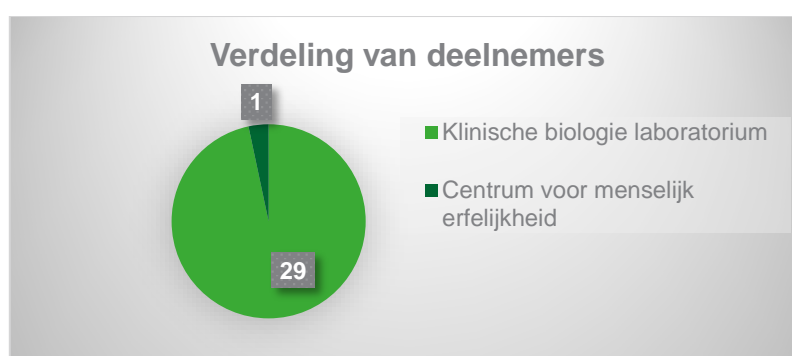
De enquête werd uitbesteed aan onze Europese partner *ECAT-External quality Control of diagnostic Assays and Tests* (<https://www.ecat.nl/>). Sciensano heeft de Belgische deelnemers ingeschreven. Onze partner ECAT heeft daarna *RfB-Reference institut for Bioanalytic* (<https://www.rfb.bio/cgi/surveys>) gecontacteerd. RfB is inderdaad de partner van ECAT voor de enquête van moleculaire genetica.

### Stalen

We hebben de Belgische deelnemers aan de enquête « Molecular genetics 1-SET A » ingeschreven. De enquête betreft de analyse van een gelyofiliseerd DNA-staal om de detectie van de mutatie in het protrombine gen en de mutatie in het factor-V Leiden gen uit te voeren.

### Deelnemers

30 laboratoria waren ingeschreven voor deze enquête. De verdeling van de laboratoria is als volgt:



- 2 laboratoria hebben zich uitgeschreven door de incompatibiliteit tussen het lyofiliseerde staal en hun methode.
- 3 laboratoria hebben zich uitgeschreven wegens een dubbele inschrijving. Deze laboratoria hadden zich ingeschreven bij Rfb en zij hebben Sciensano niet op de hoogte gebracht van hun inschrijving.

### Resultaten

We hebben de resultaten van RfB ontvangen. De leverancier heeft ons alleen een globaal rapport van de Belgische resultaten gestuurd hoewel wij het akkoord van de deelnemers hebben om toegang te hebben tot hun resultaten.

We hebben dus geen data over de gebruikte methode van de laboratoria.

#### 1. Resultaten per staal

Mutatie te detecteren in het Factor II gen: **NM\_000506.5(F2):c.\*97G>A (Gly20210Ala)**

Factor II (Protrombine)	Verwachte resultaten (AF)	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
<b>Staal 01</b>	G/G (homozygoot WT)	G/G	23 (100)
		G/A	0
		A/A	0
<b>Staal 02</b>	G/A (heterozygoot: G20210A)	G/G	2 (8.7)
		G/A	20 (86.9)
		A/A	1 (4.3)

Mutatie te detecteren in het Factor V gen: **NM\_000130.4(F5):c.1601G>A (p.Arg534Gln)**

Factor V-Leiden	Verwachte resultaten (AF)	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
<b>Staal 01</b>	Q/Q (homozygoot WT)	R/R	0
		R/Q	0
		Q/Q	23 (100)
<b>Staal 02</b>	R/Q (heterozygoot: R506Q)	R/R	1 (4.3)
		R/Q	21 (91.3)
		Q/Q	1 (4.3)

## 2. Commentaren

- We hebben alleen de resultaten van 23 laboratoria op 25 van RfB ontvangen.
- 2 laboratoria hebben WT homozygoot geantwoord en 1 laboratorium heeft gemuteerd homozygoot geantwoord voor het tweede staal voor Factor II hoewel het een heterozygote mutatie betreft.
- 1 laboratorium heeft WT homozygoot geantwoord en 1 laboratorium heeft gemuteerd homozygoot geantwoord voor het tweede staal voor factor V hoewel het een heterozygote mutatie betreft.

## Conclusies over de resultaten van de laboratoria

De resultaten die we van de organisator ontvangen hebben voor de Belgische laboratoria zijn zeer bevredigend. Voor het jaar 2022, hebben we 23 laboratoria bij onze partner ECAT ingeschreven. We hebben eind november de laboratoria op de hoogte gebracht van hun inschrijving.



## Annex

### 1. Bericht van Roche firma over de detectie van de mutatie EGFR Ex20INS met Cobas EGFR Mutation Test V2 kit



#### 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) FFPE 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 FFPE 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 FFPE sections.
- If the DNA stock is still < 2 ng/µL, request another FFPE sample section from the referring clinical site.

The root cause investigation is currently ongoing. During in-house testing, using customer-provided FFPE samples, an Ex20Ins false Mutation Detected result was reproduced for one FFPE 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**<sup>®</sup> DNA Sample Preparation Kit (M/N 05985536190) IFU for sample input. If an Ex20Ins Mutation Detected result is generated with the **cobas**<sup>®</sup> 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**<sup>®</sup> 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](mailto: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](https://dialog.roche.com) or scan the following QR code:*



This information can also be found on [www.e-labdoc.be](https://www.e-labdoc.be).



Katrien Royackers  
Head of marketing



Marijke Mertens  
Safety and Regulatory Affairs Officer

---

**EINDE**

---

©Sciensano, Brussel 2022.

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.