

**BIOLOGISCHE GEZONDHEIDSRISICO'S
KWALITEIT VAN LABORATORIA**

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

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

DEFINITIEF GLOBAAL JAARRAPPORT

**MOLECULAIRE BIOLOGIE
GENETISCHE ONDERZOEKEN**

**Art 33 bis en 33 ter
2023**

Sciensano/Moleculaire Biologie/16-NL

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

www.sciensano.be

EXPERTENCOMITE

Sciensano					
Secretariaat		TEL:	02/642 55 22	FAX:	02/642 56 45
Josephine Lantoine	Enquêtecoördinator	TEL:	02/642 53 94		
		e-mail:	Josephine.lantoine@sciensano.be		
Bernard China	Vervanger enquêtecoördinator	TEL:	02/642 52 08		
		e-mail:	bernard.china@sciensano.be		
Vanessa Ghislain	Vervanger enquêtecoördinator	TEL:	02/642 53 85		
		e-mail:	Vanessa.ghislain@sciensano.be		
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				
Barbara Depreter	UZ Brussel				

Een voorlopige versie (draft) van dit rapport werd voorgelegd aan de experts op 18/01/2024.

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

Autorisatie van het rapport: door Josephine Lantoine, enquêtecoördinator

Publicatiedatum : 26/02/2024

Alle rapporten zijn te raadplegen op onze website:

<https://www.sciensano.be/nl/externe-kwaliteitsevaluatie/klinische-gezondheid-ek-klinische-biologie>

<https://www.sciensano.be/nl/kwaliteit-van-laboratoria/ek-moleculaire-biologie-hemato-oncologie>

INHOUDSTAFEL

INLEIDING.....	4
BEPALING VAN ANDERE ANTIGENEN DAN ABO EN RH + BEPALING VAN ZWAKKE/VARIANT D	5
STALEN.....	5
DEELNEMERS.....	5
RESULTATEN.....	5
CONCLUSIES OVER DE RESULTATEN VAN DE LABORATORIA	10
EGFR.....	11
STALEN.....	11
DEELNEMERS.....	11
RESULTATEN.....	12
CONCLUSIES OVER DE RESULTATEN VAN DE LABORATORIA	20
ROS1	21
STALEN.....	21
DEELNEMERS.....	21
RESULTATEN.....	21
CONCLUSIES M.B.T DE RESULTATEN VAN DE LABORATORIA	24
NIPT.....	25
STALEN.....	25
DEELNEMERS.....	25
RESULTATEN.....	25
CONCLUSIES OVER DE RESULTATEN VAN DE LABORATORIA	29
PDGFRA.....	30
STALEN.....	30
DEELNEMERS.....	30
RESULTATEN.....	30
CONCLUSIES OVER DE RESULTATEN VAN DE LABORATORIA	35
HER 2	36
<i>NPM::ALK</i>.....	36
UITBESTEDE EVALUATIE: DETECTIE VAN DE MUTATIES VAN DE FACTOR V EN PROTROMBINE GENEN (ECAT).....	37
STALEN.....	37
DEELNEMERS.....	37
RESULTATEN.....	37
CONCLUSIES OVER DE RESULTATEN VAN DE LABORATORIA	40

INLEIDING

In 2023, hebben we 6 enquêtes betreffende de art.33 bis en 33 ter van de RIZIV-nomenclatuur georganiseerd.

De enquête 2023/1 ging over de bepaling van andere erythrocyten antigenen dan ABO en Rh en de bepaling van zwakke of variant D.

De enquête 2023/2 ging over de detectie van EGFR gen mutatie en ROS1 genherschikking in het kader van niet-squameus niet-kleincellig longcarcinoom.

De enquête 2023/3 ging over de prenatale opsporing van trisomie 21 door middel van een moleculaire biologische methode vanaf de 12de zwangerschapsweek.

De enquête 2023/4 ging over de detectie van PDGFRA gen mutatie in een gastrointestinale stromale tumor

De enquête 2023/5 ging over de detectie van HER2 genamplificatie bij (niet) gemetastaseerde borstkanker.

De enquête 2023/6 ging over de detectie van NPM-ALK fusiegen in het kader van lymfoma.

Voor de detectie van de mutaties in de genen factor II en factor V, hebben we de laboratoria bij ECAT ingeschreven. De performanties van de laboratoria in deze EKE worden besproken op pagina 37.

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 49.05 ng/µl en de zuiverheid (A260/ A280) was 1.86.

Deelnemers

11 klinische biologie laboratoria waren voor deze enquête ingeschreven. 1 laboratorium was alleen ingeschreven voor de bepaling van andere antigenen dan ABO en Rh; 1 laboratorium was alleen ingeschreven voor de bepaling van zwakke D en 1 laboratorium was alleen ingeschreven voor de bepaling van andere antigenen dan ABO en Rh en de bepaling van zwakke D. De andere laboratoria waren ingeschreven voor alle opgespoorde parameters.

10 laboratoria hebben geantwoord. Het laboratorium dat alleen was ingeschreven voor zwakke D heeft geen resultaten ingegeven door een foutieve inschrijving voor zwakke D.

Resultaten

De laboratoria hebben 1 tube van 140 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	Systeem	Ingegeven resultaten*	Aantal laboratoria /10)
ABO2023	MNS	MN SS	7
		MN SS U	2
		GYPA*M GYPA*N GYPB*S	1
	Lutheran	LubLub	4
	Kell	kk	7
		kk KpbKpb Js bJs b	3
	Duffy	FybFyb	8
		FybFyb (FyX- Fynull-)	2
	Kidd	JkaJkb	10
	Diégo	DibDib	2
		DibDib WrbWrb	2
	Scianna	ScaSca	1
	Dombrock	DobDob	9
		DobDob Hy Joa	1
	Colton	CoaCoa	4
	Landsteiner-Weiner	LwaLwa	3
	VEL	Vel +	5
		Vel*01	1
	RhCe	CC ee	4
		CC ee Cw-	1
Cartwright	YtaYta	4	
Knops	KnaKna	3	

*Volgens de gebruikelijke nomenclatuur

Staal	Ingegeven resultaten	Aantal laboratoria (/8)
<u>ABO2023</u>	Geen zwakke D	5
	Afwezigheid van een zwakke D	2
	negatief	1

Staal	Ingegeven resultaten	Aantal laboratoria (/8)
<u>ABO2023</u>	Afwezigheid van een D variant Rh:1 /"D normaal"	2
	geen D variant; RhD+/RhD*01	4
	RhD*01	1
	RhD pos	1

2. Resultaten per laboratorium

Lab	Gebruikte methodes ABO/Rh	ABO2023											
		MNS	Lutheran	Kell	Duffy	Kidd	Diégo	Scianna	Dombrock	Colton	Landsteiner -Wiener	VEL	Autre
1	PCR-SSP RBC fluo gene Verify + RBC fluogene Rare- inno-train	MN SS	Lub Lub	kk Kpb Kpb Jsb Jsb	FybFyb	JkaJkb	DibDib Wrb Wrb		DobDob	CoaCoa	LwaLwa		RhCE: CC ee Knops: KnaKna Cartwright: YtaYta
2**	BioArray HEA Beaschips- immucor	M/N S/S	Lub/Lub	k/k Kpb/Kpb Jsb /Jsb	Fyb/Fyb	Jka/Jkb	Dib/Dib	Sca/Sca	Dob/Dob Hy Joa	Coa/Coa	Lwa/Lwa		RHCE: CC ee Cartwright: YtaYta Knops: KnaKna
3	PCR-SSP BAGene kit-BAG diagnostics	MN SS	Lub Lub	kk Kpb Kpb	FybFyb	JkaJkb	DibDib		DobDob	CoaCoa		Vel+	RHCE: CC ee Cartwright: YtaYta Knops: KnaKna Wright: WrbWrb* Sutter: JsbJsb*
4	PCR-SSP RBC Ready gene VERYfy kit-inno- train	GYPA*M GYPA*N GYPB*S		kk	FybFyb	JkaJkb			DobDob			VEL*01	
5	PCR-SSP RBC Ready gene VERYfy kit-inno- train	M+ N+ S+ s-		k/k	FybFyb	JkaJkb			DobDob			Vel+	
6	PCR-SSP RBC fluogene VERYfy kit-inno- train	M/N/S/S	LubLub	kk	FybFyb	JkaJkb	DibDib		DobDob	CoaCoa	LwaLwa	Vel+	Cartwright: YtaYta
7	PCR-SSP RBC fluogene VERYfy kit-inno- train	M N S U		kk	FybFyb	JkaJkb			DobDob				RhCE: Ce
8	PCR-SSP RBC Ready gene VERYfy kit-inno- train	M N SS		kk	FybFyb	JkaJkb			DobDob			Vel+	RhCE: CCee

Lab	Gebruikte methodes ABO/Rh	ABO2023											
		MNS	Lutheran	Kell	Duffy	Kidd	Diégo	Scianna	Dombrock	Colton	Landsteiner -Wiener	VEL	Autre
9**	PCR-SSP RBC Ready gene VERYfy kit-inno- train)	M+ N+ S+ s-		K-k+	Fya-Fyb+ FyX- Fynull-	Jka+Jkb+			Doa-Dob+			Vel+	RhCE: D+ C+ c- E- e+
10**	PCR-SSP RBC fluogene VERYfy kit-inno- train	M N SS U (UvarNY- PZ-)		kk	FybFyb FyX- Fynull-	JkaJkb			DobDob				RHCE:CC ee Cw-

*Het "Sutter systeem" behoort tot het "Kell systeem" en het "Wright systeem" behoort tot het "Diego systeem".

Labo	Gebruikte methodes Zwakke D	Gebruikte methodes D variant	ABO2023	
			Zwakke D	D variant
1	PCR-SSP Weak D BAGene kit -BAG diagnostics	PCR-SSP Partial D type BAGene kit- BAG diagnostics	geen zwakke D	RhD positief
2**	BioArray RHD beadchips-immucor	BioArray RHD beadchips-immucor	afwezigheid van zwakke D Rh:1	afwezigheid van een D variant Rh:1
3	PCR-SSP Weak D BAGene kit -BAG diagnostics	PCR-SSP Partial D type BAGene kit -Bag diagnostics	RHD*01 geen zwakke D	RHD*01 geen D variant
4	PCR-SSP RBC ready gene Weak D kit - inno-train	PCR-SSP RBC ready gene CDE kit -inno-train	negatief; geen zwakke D	RHD*01
5	Ingeschreven voor zwakke D maar methode nog in validatie			
6	PCR-SSP RBC fluogene Weak D kit-inno- train	PCR-SSP RBC fluogene CDE kit -inno-train	afwezigheid van een zwakke D " D normaal "	afwezigheid van een variant D " D normaal "
7	PCR-SSP RBC fluogene Weak D kit-inno- train	PCR-SSP RBC fluogene CDE kit -inno-train	geen zwakke D	intact RhD allel, geen detecteerbare variant D
8	Vergissing inschrijving voor zwakke D			
9**	PCR-SSP RBC ready gene Weak D kit-inno- train	PCR-SSP RBC ready gene CDE kit-inno-train	negatief	geen variant D gedetecteerd
10**	PCR-SSP RBC RBC fluogene Weak D kit- inno-train	PCR-SSP RBC fluogene CDE kit -inno-train	geen zwakke D gedetecteerd	RhD+ geen D variant gedetecteerd

**Resultaten onder voorbehoud door leveringsprobleem (bewaringstemperatuur niet gegarandeerd)

3. Commentaren

- De resultaten van 3 laboratoria zijn onder voorbehoud door de niet gegarandeerde bewaringstemperatuur. Inderdaad, was er een probleem met de levering door de transporteur B-post. De stalen werden geleverd 3 tot 4 dagen na de zending in plaats van de dag nadien.

4. Gebruikte methodes

A. Bepaling van andere genen dan ABO en Rh

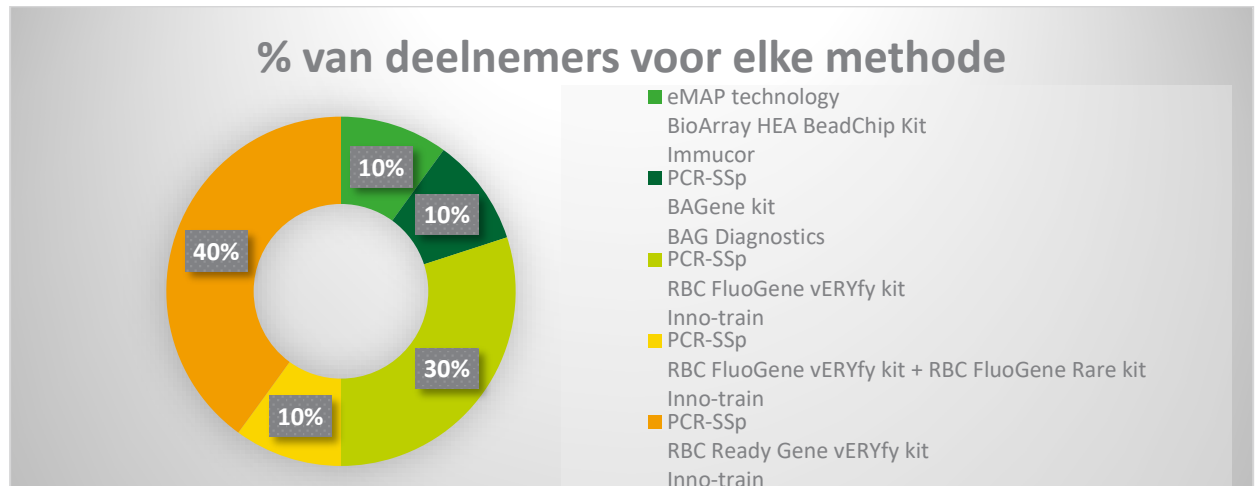


Chart 1 : Verdeling van laboratoria per gebruikte methode voor de bepaling van andere genen dan ABO en Rh

De meest gebruikte methode voor de bepaling van andere antigenen dan ABO en Rh is de methode PCR-SSP met de RBC-Ready Gene vERYfy kit van inno-train gevolgd door de RBC-FluoGene vERYfy kit van inno-train.

B. Bepaling van variant D

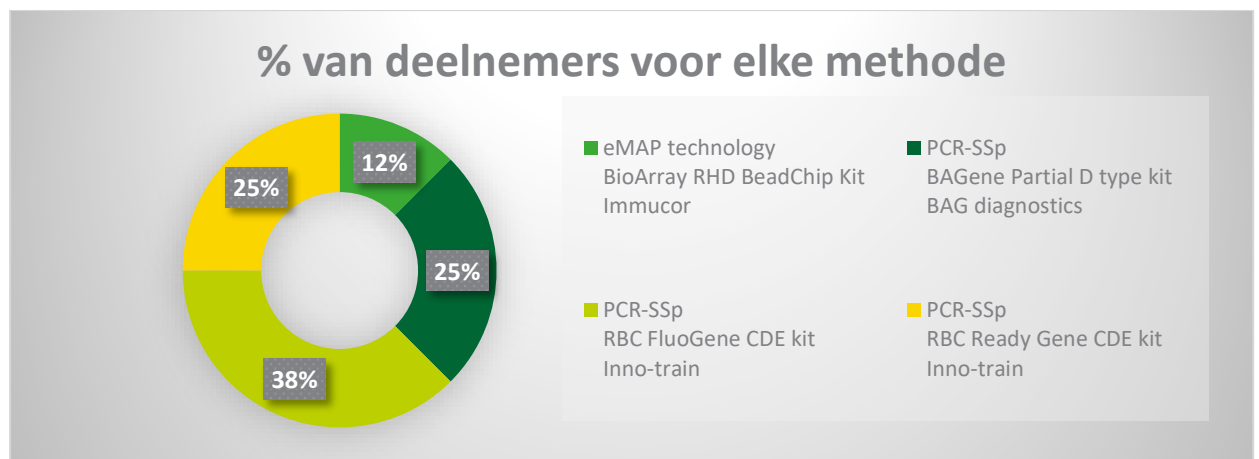


Chart 2 : Verdeling van laboratoria per gebruikte methode voor de bepaling van variant D

De meest gebruikte methodes voor de bepaling van variant D is de PCR-SSP met de RBC-FluoGene CDE kit van inno-train gevolgd door de RBC-Ready Gene CDE kit van inno-train en de partial D type kit van BAG Diagnostics.

C. Bepaling van zwakke D

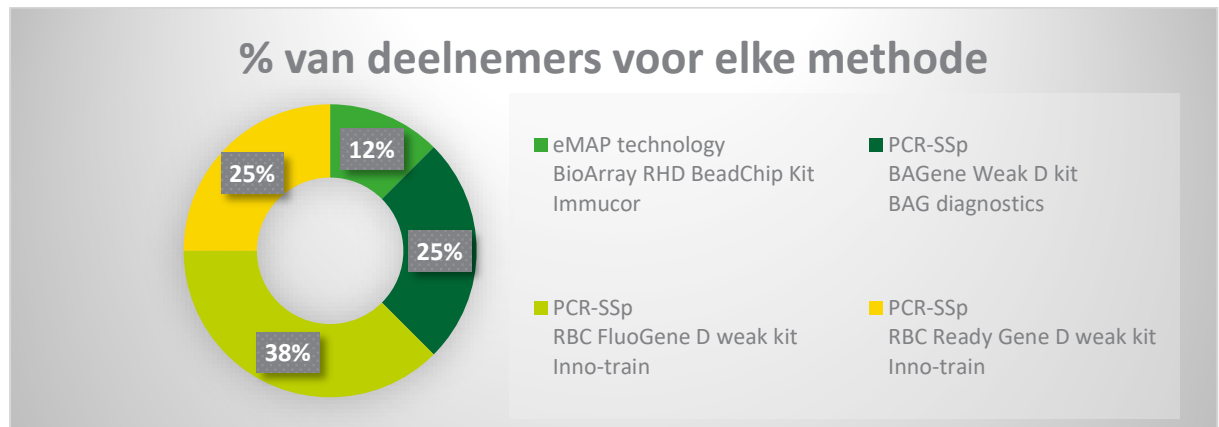


Chart 3 : Verdeling van laboratoria per gebruikte methode voor de bepaling van zwakke D

De meest gebruikte methode voor de bepaling van zwakke D is de PCR-SSP met de RBC FluoGene WEAK D kit van inno-train gevolgd door de BAGene WEAK D kit van BAG Diagnostics en RBC Ready Gene WEAK D kit van inno-train.

Conclusies over de resultaten van de laboratoria

We hebben geen tegenstrijdigheid waargenomen tussen de resultaten ingegeven door de laboratoria. We willen wel de laboratoria waarschuwen dat in overeenstemming met ons beleid en om een billijke behandeling van deelnemers te garanderen de laboratoria die zich uitschreven na ontvangst van de stalen (dus een laattijdige uitschrijving) een score “niet geslaagd” aan het individueel rapport van de enquête zullen krijgen in 2024 (indien de foutieve inschrijving een fout van het laboratorium is). Het doel van deze sanctie is om laboratoria bewust te maken van het feit dat een laattijdige uitschrijving extra kosten en extra werk voor beide partijen met zich meebrengt.

EGFR

Stalen

De stalen zijn 4 µm FFPE-coupees van longcarcinoom biopsieën. Het zijn patiënten stalen van de biobank Discovery Life Science (3509 Elgin St, Suite 300 Houston, TX 77004-USA).

De stalen waren vergezeld van klinische gegevens van de patiënten: leeftijd, geslacht, ras, lokalisatie van de tumor, type tumor, pathologische data, gegevens over welke behandeling de patiënt vooraf heeft gekregen (indien beschikbaar) en de EGFR mutatie status.

Klinische casus F00191338: 70-jarige vrouw met een matig gedifferentieerd squameus longcarcinoom van graad G2. De tumor van 6cm diameter bevindt zich ter hoogte van de bovenste kwab van de linkerlong. De classificatie van de tumor is T3 N1 M0. Het stadium is III-A. Metastases werden gedetecteerd in 1 van de 12 onderzochte lymfeklieren. De andere onderzochte lymfeklieren tonen sinus histiocytose, folliculaire hyperplasie en antracose.

Klinische casus F00221616: 69-jarige vrouw met een weinig gedifferentieerd long adenocarcinoom van graad G3. De tumor bevindt zich ter hoogte van de bovenste kwab van de rechterlong. De classificatie van de tumor is T2aN1M0 en het stadium II-B. De tumor bevat kleine zones van necrose en ook een lymfocyttaire en plasmocyttaire infiltratie. Er zijn haarden van tumorinvasie ter hoogte van de bronchiolen met een extensie van de tumor tot de bronchiolaire en alveolaire lumina (STAS1). Er zijn haarden van tumorinvasie ter hoogte van de pleura zonder penetratie ervan. Er is ook lymfo-vasculaire en perineurale invasie (LVI 1, PNI 1). Er is geen tumorgroei ter hoogte van de bronchus van de lob (R0). Metastases werden gedetecteerd in 1 van de 2 onderzochte lymfeklieren (pN1).

Deelnemers

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

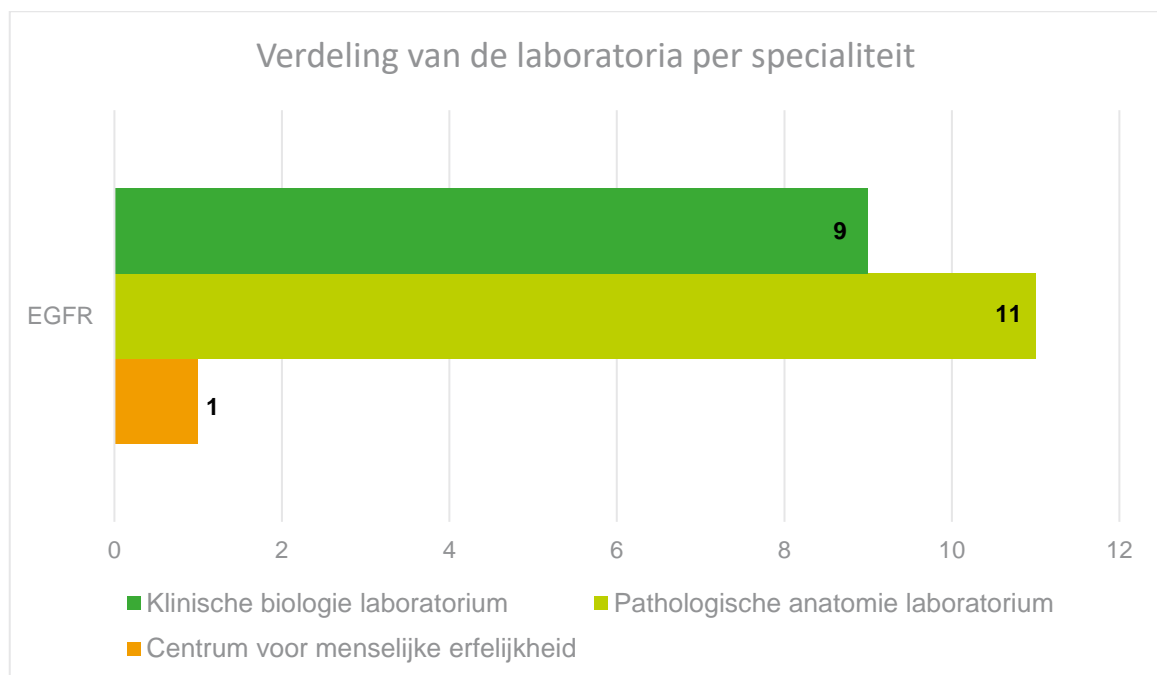


Chart 4 : Verdeling van ingeschreven laboratoria per specialiteit

Een laboratorium van klinische biologie heeft geen resultaten gestuurd.

Resultaten

De laboratoria hebben 4 FFPE-coupees van 4 µm per klinische casus ontvangen. We hebben aan de laboratoria gevraagd om de aanwezigheid van EGFR-mutaties met moleculaire methodes op te sporen. We hebben ook de biologische en klinische interpretaties, de allelfrequentie indien deze bepaald werd gevraagd. De laboratoria werden ook gevraagd om hun gebruikte methode te rapporteren.

1. Resultaten per staal

Om een optimale analyse van de resultaten uit te voeren, hebben we beslist om twee verschillende groepen van laboratoria te maken in functie van de gebruikte methode.

1.A Groep NGS (15/21)

Staal	Verwachte resultaten (VAF)	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
<u>F00191338</u>	EGFR WT goedaardig	EGFR WT	15 (100)*
<u>F00221616</u>	NM_005228.5 (EGFR) c.2573T>G p.(Leu858Arg) pathogeen-Tier I (25%)	NM_005228.5 (EGFR) c.2573T>G (p.Leu858Arg)	13 (86)**
		EGFR c.2573T>G (p.Leu 585 Arg)	1 (6)***
		niet bepaald (technisch probleem; DNA concentratie te laag)	1 (6)

*Resultaten onder voorbehoud voor 2 laboratoria (suboptimale DNA kwaliteit/kwantiteit)

** Resultaten onder voorbehoud voor 3 laboratoria (suboptimale DNA kwaliteit/kwantiteit)

*** Na contact met en opsturen van zijn ruwe data, heeft dit laboratorium de mutatie c.2573T>G (p.Leu858Arg) wel gedetecteerd. Het heeft echter een schrijffout gemaakt tijdens het invullen van het formulier.

Om de biologische en klinische classificatie te scoren, heeft het expertencomité van moleculaire biologie de volgende scoring gedefinieerd voor deze enquête. Dit scoring is gebaseerd op de richtlijnen van de Compermed : <https://www.compermed.be/en/guidelines>.

Goed
Aanvaardbaar
Niet evalueerbaar

Staal	Vastgestelde biologische classificatie	Aantal laboratoria (/15)
<u>F00191338</u>	niet vermeld/NVT	15

Staal	Vastgestelde klinische classificatie	Aantal laboratoria (/15)
<u>F00191338</u>	advies voor RNA seq.	1
	geen verhoogde respons op anti-EGFR therapie	1
	niet vermeld	13

Voor de EGFR WT casus, hebben 100% van de laboratoria een score van « niet evalueerbaar » voor de biologische en de klinische classificatie gekregen.

Staal	Eventueel vastgestelde therapeutische conclusies	Aantal laboratoria (/15)
<u>F00191338</u>	patiënt komt niet in aanmerking voor EGFR therapie	1

Staal	Vastgestelde biologische classificatie	Aantal laboratoria (/14)
F00221616	pathogeen	14

Staal	Vastgestelde klinische classificatie	Aantal laboratoria (/14)
F00221616	Tier I	11
	Tier IA	2
	verhoogde respons op TKI therapie	1

Voor de EGFR L858R casus, 100% van de laboratoria hebben een “goede” score gbehaald voor de biologische classificatie. Voor de klinische classificatie, hebben 92% van de laboratoria een « goede » score gehad en 7% hebben een “niet evalueerbaar” score gehad voor de klinische classificatie.

Staal	Vastgestelde therapeutische conclusies	Aantal laboratoria (/14)
F00221616	verhoogde gevoeligheid voor EGFR TKIs therapie	7
	patient komt in aanmerking voor een therapie met EGFR inhibitoren	4
	predictief voor respons op anti-EGFR (Osimertinib) therapie	2

1.B Groep PCR (5/21)

Staal	Verwachte resultaten (VAF)	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
F00191338	EGFR WT goedaardig	EGFR WT	5 (100)
F00221616	EGFR NM_005228.5 (EGFR) c.2573T>G p.(Leu858Arg) pathogeen Tier I (25%)	EGFR c.2573T>G ; c.2573_2574delinsGT ; c.2573_2574delinsGA L858R	3 (60)*
		EGFR (p.Leu858Arg)	2 (40)

*De gebruikte techniek laat niet toe om deze varianten individueel te identificeren.

Met een educatief doel, werden de eventuele doorgestuurde biologische en klinische classificaties ook geanalyseerd. Deze evaluatie is zuiver informatief omdat deze classificaties door de NGS guidelines van de Compermed gedefinieerd worden.

Het expertencomité van moleculaire biologie heeft de volgende scoring gedefinieerde voor deze enquête:

Goed
Aanvaardbaar
Niet evalueerbaar

Staal	Vastgestelde biologische classificatie	Aantal deelnemers (/5)
F00191338	negatief	1
	geen mutatie	1
	niet vermeld	3

Staal	Vastgestelde klinische classificatie	Aantal laboratoria (/5)
F00191338	geen gevoeligheid aan EGFR inhibitoren	1
	niet vermeld	4

Staal	Eventueel vastgestelde therapeutische conclusies	Aantal laboratoria (/5)
F00191338	patient komt niet in aanmerking voor EGFR therapie	1
	Geen gevoeligheid aan EGFR inhibitoren	1

Staal	Vastgestelde biologische classificatie	Aantal deelnemers (/5)
F00221616	pathogeen	2
	biologische	1
	EGFR gen gemuteerd	1
	niet vermeld	1

Staal	Vastgestelde klinische classificatie	Aantal laboratoria (/5)
F00221616	Tier I	1
	Tier IA	1
	gevoeligheid aan EGFR inhibitoren/TKIs	2
	niet vermeld	1

Staal	Vastgestelde therapeutische conclusies	Aantal laboratoria (/5)
F00221616	gevoeligheid aan EGFR inhibitoren	3
	komt in aanmerking voor EGFR TKIs therapie	1

Houd er rekening mee dat één laboratorium niet is opgenomen in de statistiek per groep, aangezien het geen resultaten heeft doorgestuurd.

2. Resultaten per laboratorium

2.1 F00191338

Labo.	Methodologie			Vastgestelde resultaten				
	Gebruikte methode	LOD (%)		EGFR mutaties	AF	Biologische class.	Klinische class.	Therapeutische conclusie
		SNV	Indels					
1	Geen resultaten ontvangen							
2	NGS-Miseq-Illumina Qiaseq DNA custom panel-Qiagen	5	5	WT				
3*	NGS-Miseq-Illumina Ampliseq focus Panel-Illumina	3	3	WT				
4	NGS-Miseq-Illumina Qiaseq DNA custom panel-Qiagen	5	5	WT		RNA seq advies voor detectie van fusie en MET varianten		
5	NGS-Nextseq-Illumina Custom twist panel-Twist Bioscience	2	2	/				
6	NGS-Miseq-Illumina Sophia STS panel- SOPHiA Genetics	5	5	/				
7	qPCR-Idylla EGFR mutation assay-Bicartis	NVT	NVT	WT				
8	NGS-Miseq-Illumina Ampliseq focus Panel-Illumina	5	5	/				geen indicatie voor een therapie anti-EGFR
9	qPCR-Idylla EGFR mutation assay-Bicartis	NVT	NVT	WT		negatief	negatief	
10	NGS-Ion Torrent S5-Thermofischer Oncomine focus assay-Thermofischer	5	5	WT				
11**	NGS-Novaseq 6000-Illumina Custom panel SeqCap EZ hyperCap-Roche	5	5	/				
12	NGS-Miseq-Illumina Cancer hotspot panel V2-Illumina	5	5	WT				
13	NGS-Novaseq-Illumina Archer CTL	5 (expressie)	5 (expressie)	/				

		Methodologie		Vastgestelde resultaten				
Labo.	Gebruikte methode	LOD (%)		EGFR mutaties	AF	Biologische class.	Klinische class.	Therapeutische conclusie
		SNV	Indels					
14	NGS-Nextseq 550Dx-Illumina-Custom twist panel-Twist Bioscience	5	5	/				
15	NGS-Ion Torrent S5 Gene Studio-Thermofischer Custom Ampliseq panel	4	4	WT				
16	qPCR-Idylla EGFR mutation assay-Biocardis	NVT	NVT	WT		geen mutatie	geen mutatie	geen gevoeligheid aan EGFR inhibitoren
17	NGS-Nextseq-Illumina Qiaseq custom panel	5	5	WT				
18	qPCR-Idylla EGFR mutation assay-Biocardis	NVT	NVT	WT				patiënt komt niet in aanmerking voor EGFR TKIs therapie
19	NGS-Ion Torrent S5 XL-Thermofischer Custom panel Alpha_V4	2.5	2.5	/				
20	qPCR-Idylla EGFR mutation assay-Biocardis	NVT	NVT	WT				
21	NGS-Novaseq 6000-Illumina Custom panel HyperCap-Roche	5	5	WT			geen verhoogde respons op anti-EGFR therapie	

2.2 F00221616

		Methodologie		Vastgestelde resultaten				
Labo.	Gebruikte methode	LOD (%)		EGFR mutaties	AF	Biologische class.	Klinische class.	Therapeutische conclusie
		SNV	Indels					
1	Geen resultaten ontvangen							
2	NGS-Miseq-Illumina Qiaseq DNA custom panel-Qiagen	5	5	c.2573T>G p.(Leu858Arg)	17	pathogeen	Tier I	verhoogde gevoeligheid voor EGFR TKIs therapie
3	NGS-Miseq-Illumina Ampliseq focus Panel-Illumina	3	3	c.2573T>G p.(Leu858Arg)	16	pathogeen	Tier IA	/
4**	NGS-Miseq-Illumina Qiaseq DNA custom panel-Qiagen	5	5	c.2573T>G p.(Leu858Arg)	22	pathogeen	Tier I	verhoogde gevoeligheid voor EGFR TKIs therapie. Osimertinib kan in adj. setting worden overwogen

Labo.	Methodologie			Vastgestelde resultaten				
	Gebruikte methode	LOD (%)		EGFR mutaties	AF	Biologische class.	Klinische class.	Therapeutische conclusie
		SNV	Indels					
5	NGS-Nextseq-Illumina Custom twist panel-Twist Bioscience	2	2	Technisch probleem- te laag concentratie van DNA na extractie				
6	NGS-Miseq-Illumina Sophia STS panel- SOPHiA Genetics	5	5	c.2573T>G p.(Leu858Arg)	7	pathogeen	Tier I	patiënt komt in aanmerking voor EGFR therapie
7	qPCR-Idylla EGFR mutation assay-Biocartis	NVT	NVT	c.2573T>G c.2573_2574de linsGT c.2573_2574de linsGA L858R	NVT	biologische	Tier IA	gevoeligheid aan TKIs van 1,2,3 generaties bij afwezigheid van resistentie mutatie
8	NGS-Miseq-Illumina Ampliseq focus Panel-Illumina	5	5	c.2573T>G p.(Leu585Arg) Après relecture : c.2573T>G p.(Leu858Arg)	44	pathogeen	Tier IA	predictief voor respons op anti-EGFR therapie (Osimertinib)
9	qPCR-Idylla EGFR mutation assay-Biocartis	NVT	NVT	c.2573T>G c.2573_2574de linsGT c.2573_2574de linsGA L858R	NVT	EGFR gen gemuteerd	mutatie gevoelig aan TKIs	
10	NGS-Ion Torrent S5-Thermofischer Oncomine focus assay-Thermofischer	5	5	c.2573T>G p.(Leu858Arg)	4	pathogeen	Tier I	patiënt komt in aanmerking voor EGFR inhibitoren therapie
11**	NGS-Novaseq 6000-Illumina Custom panel SeqCap EZ hyperCap-Roche	5	5	NM_005228.5 c.2573T>G p.(Leu858Arg)	25	pathogeen	Tier I	
12	NGS-Miseq-Illumina Cancer hotspot panel V2-Illumina	5	5	c.2573T>G p.(Leu858Arg)	14	pathogeen	Tier I	
13	NGS-Novaseq-Illumina Archer CTL	5 (expressie)	5 (expressie)	c.2573T>G p.(Leu858Arg)	36	pathogeen	Tier I	
14	NGS-Nextseq 550Dx-Illumina Custom twist panel-Twist Bioscience	5	5	c.2573T>G p.(Leu858Arg)	12.8	pathogeen	Tier I	gevoeligheid aan TKIs van 1,2,3 generaties
15	NGS-Ion Torrent S5 Gene Studio-Thermofischer Custom Ampliseq panel	4	4	c.2573T>G p.(Leu858Arg)	11	pathogeen	Tier I	

Methodologie				Vastgestelde resultaten				
Labo.	Gebruikte methode	LOD (%)		EGFR mutaties	AF	Biologische class.	Klinische class.	Therapeutische conclusie
		SNV	Indels					
16	qPCR-Idylla EGFR mutation assay-Biocardis	NVT	NVT	c.2573T>G c.2573_2574de linsGT c.2573_2574de linsGA L858R	NVT	pathogeen	gevoeligheid aan EGFR inhibitoren	
17**	NGS-Nextseq-Illumina Qiaseq custom panel-Qiagen	5	5	c.2573T>G p.(Leu858Arg)	31	pathogeen	Tier I	
18	qPCR-Idylla EGFR mutation assay-Biocardis	NVT	NVT	p.(Leu858Arg)	NVT			in aanmerking voor EGFR TKIs
19	NGS-Ion Torrent S5 XL-Thermofischer custom panel Alpha_V4	2.5	2.5	NM_005228.4 c.2573T>G p.(Leu858Arg)	12	pathogeen	Tier I	in aanmerking voor EGFR TK
20	qPCR-Idylla EGFR mutation assay-Biocardis	NVT	NVT	p.(Leu858Arg)	NVT	pathogeen	Tier I	
21	NGS-Novaseq 6000-Illumina Custom panel HyperCap-Roche	5	5	c.2573T>G p.(Leu858Arg)	29	pathogeen	verhoogde gevoeligheid voor anti-EGFR therapie.	

*resultaten niet conclusief wegens veel C:T /G:A transities

**Suboptimale DNA kwaliteit-resultaten onder voor behoud

Verdeling van de gerapporteerde allelfrequenties voor de detectie van de mutatie EGFR L858R

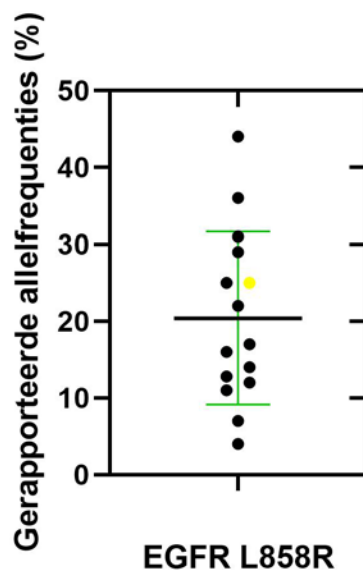


Chart 5 : Verdeling van de gerapporteerde allelfrequenties voor de detectie van de mutatie EGFR L858R in het staal F00221616. Het gele punt is de allelfrequentie aangegeven door de leverancier.

2 laboratoria hebben een hogere allelfrequentie dan het gemiddelde van de gerapporteerde allelfrequenties gerapporteerd. 2 laboratoria hebben een lagere allelfrequentie dan het gemiddelde van de gerapporteerde allelfrequenties gerapporteerd.

3. Commentaren

- Enkele laboratoria hebben hun resultaten onder voorbehoud ingediend (2 voor de WT casus en 3 voor de gemuteerde casus) wegens de te lage hoeveelheid geëxtraheerd DNA of door de aanwezigheid van veel C: T/G : A transities. We hebben contact opgenomen met de firma omtrent dit probleem.
- 1 laboratorium heeft geen resultaten doorgestuurd. Het heeft geen reden opgegeven betreffende zijn niet-deelname wat betreft zijn niet-deelname.

4. Gebruikte methodes

4.1 Groep NGS

De meest gebruikte sequencer is de sequencer Miseq van Illumina :

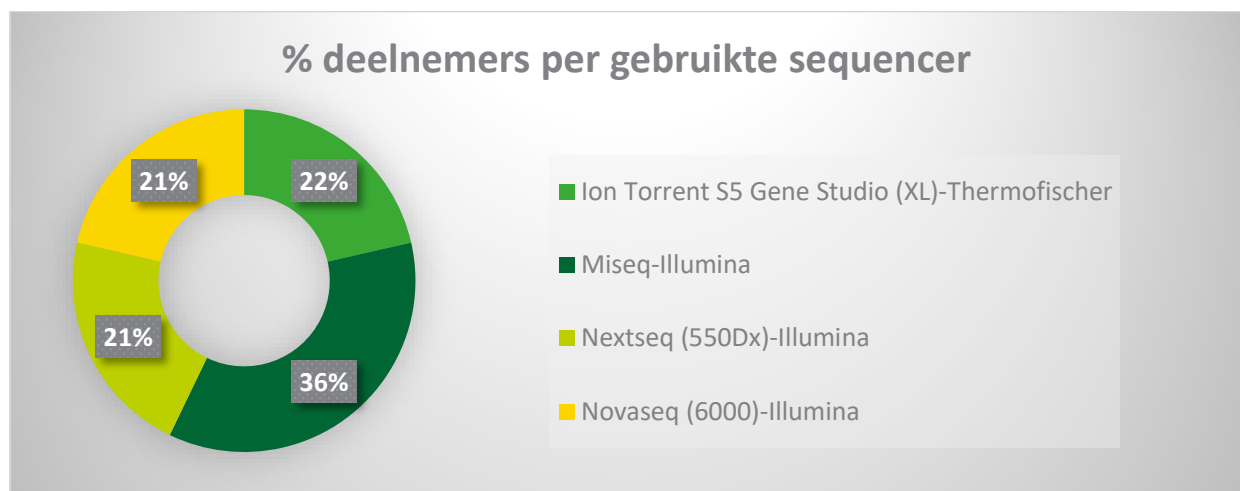


Chart 6 : Verdeling van de sequencers gebruikt in de laboratoria voor de detectie van mutaties in het EGFR gen met de NGS techniek

De gedetailleerde informatie per gebruikt(e) kit/panel is hieronder getoond:

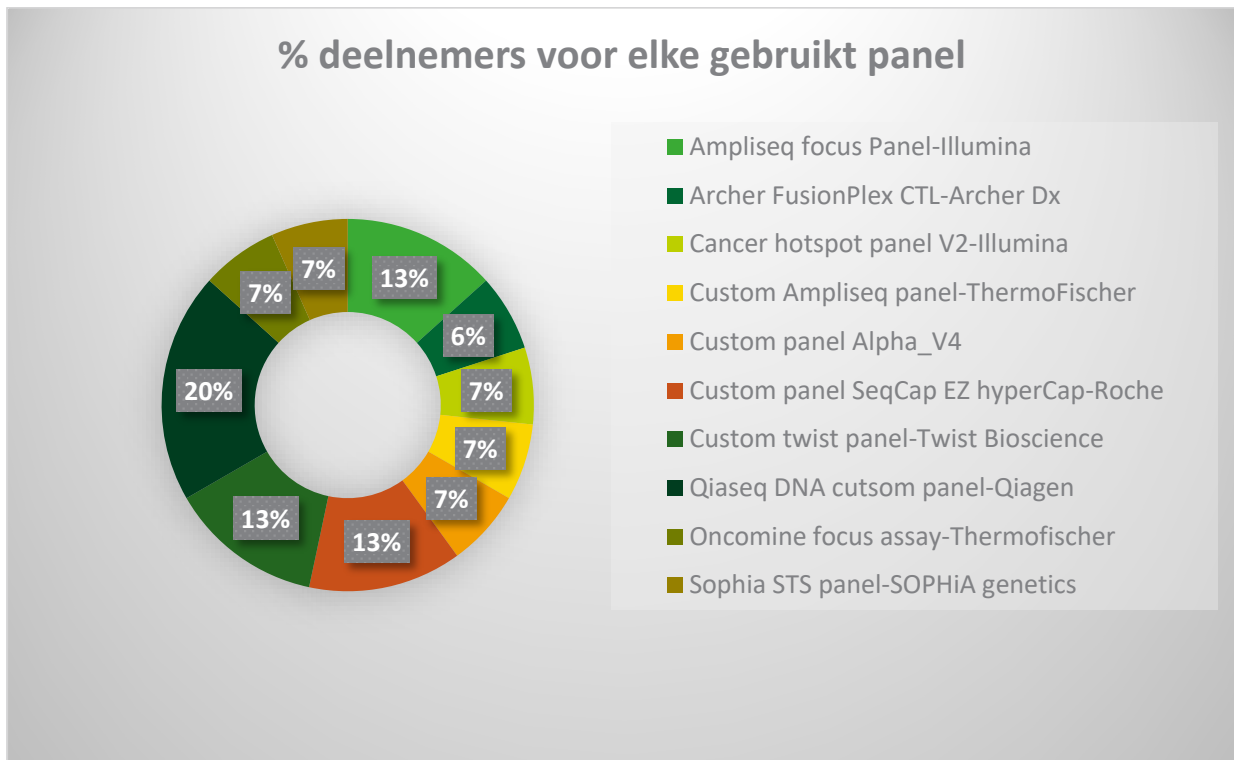


Chart 7: Verdeling van de gebruikte kits/panels voor de detectie van mutaties in het EGFR gen met de NGS techniek.

Het meest gebruikte panel is de “Qiaseq DNA custom” van Qiagen.

4.2 Groep PCR

De meeste gebruikte methode is de qPCR met de kit « Idylla EGFR mutation assay » van biocartis.

Conclusies m.b.t de resultaten van de laboratoria

De resultaten van de laboratoria voor deze enquête zijn zeer bevredigend. Slechts één labo kon de aanwezigheid van de mutatie EGFR L858R niet terugvinden in het gemuteerde staal door een probleem gelinkt aan de hoeveelheid van geëxtraheerd DNA. 5 laboratoria hebben hun resultaten onder voorbehoud gerapporteerd door een suboptimale DNA-kwantiteit/kwaliteit maar deze hebben de mutatie wel teruggevonden. De firma waarvan de stalen komen, kan niet voor de kwaliteit/kwantiteit van geëxtraheerd DNA instaan omdat zij de extractie niet uitgevoerd hebben. In geval van twijfel omtrent de kwantiteit/kwaliteit van geëxtraheerd DNA, kunnen we aan de firma een analyse van enkele coupes vragen (bij aankoop van een blokje) om de kwaliteit ervan te garanderen.

We willen de laboratoria waarschuwen dat in overeenstemming met ons beleid en om een billijke behandeling van deelnemers te garanderen de laboratoria die zich uitschreven na ontvangst van de stalen (dus een laattijdige uitschrijving) een score “niet geslaagd” in zijn individueel rapport van de enquête zullen hebben (indien de foutieve inschrijving een fout van het laboratorium is). Het doel van deze sanctie is om laboratoria bewust te maken van het feit dat een laattijdige uitschrijving extra kosten en extra werk voor beide partijen met zich meebrengt.

ROS1

Stalen

De ROS1 stalen werden geleverd door de firma Sanbio (Frontstraat 2-C, 5405 PB Uden, NL). De firma werkt met de firma Histoocyte (Neon Building Quorum Business Park Benton Lane, Newcastle upon Tyne NE12 8BU, UK). In het kader van de 2022-2023 enquêtes, werden 75 positief geladen glaasjes met twee 4 µm FFPE-coupes van cellijnen (longadenocarcinoma of borstadenocarcinoma) geproduceerd. Elk glaasje bevat dus 2 spots, één WT-spot en één spot met de mutatie (SLC34A2-ROS1 translocatie).

ROS1-Klinische casus spot A: 64-jarige man met een niet-squameus longcarcinoom met een component ADC waarvoor geen driver mutatie werd gedetecteerd (met NGS of een andere moleculaire methode). U ontvangt FFPE-coupes van een biopsie uitgevoerd ter bevestiging met de resultaten van de eerder uitgevoerde IHC test (gegevens hier niet meegedeeld) d.m.v. ISH om de therapie keuze te bepalen.

ROS1-Klinische casus spot B: 70-jarige vrouw met een niet-squameus longcarcinoom met een component ADC waarvoor geen driver mutatie werd gedetecteerd (met NGS of een andere moleculaire methode). U ontvangt FFPE-coupes van een biopsie uitgevoerd ter bevestiging met de resultaten van de eerder uitgevoerde IHC test (gegevens hier niet meegedeeld) d.m.v. ISH om de therapie keuze te bepalen.

Deelnemers

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

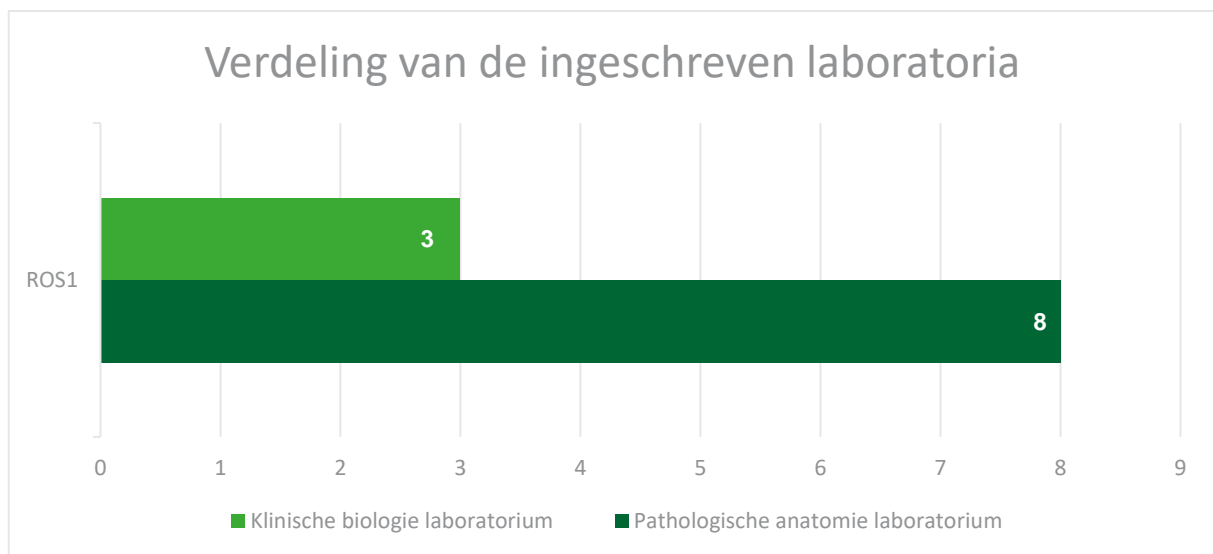


Chart 8: Verdeling van ingeschreven laboratoria per specialiteit

2 laboratoria van pathologische anatomie hebben zich uitgeschreven na verzending van de stalen.

Resultaten

De laboratoria hebben 3 FFPE-coupes van 4µm dikte van cellijnen ontvangen. Elke coupe bevat twee spots zoals geïllustreerd hieronder. Elke spot komt overeen met een verschillende klinische casus.

1. Resultaten per staal

Staal	Verwachte resultaten	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
<u>ROS1-2023 SPOT A</u>	WT	WT	9* (82)
<u>ROS1-2023 SPOT B</u>	gemuteerd	gemuteerd	9* (82)

*een laboratorium heeft geantwoord met niet gevalideerde methodes voor dit type van staal (NGS/qPCR in plaats van FISH).

Met een educatief doel, werden de eventuele vastgestelde biologische en klinische classificaties van de 8 FISH gebruikers ook geanalyseerd. Deze evaluatie is zuiver informatief omdat deze classificaties door de NGS guidelines van de Compermed gedefinieerd worden.

Staal	Vastgestelde biologische classificatie	Aantal laboratoria (/8)
<u>ROS1-2023 SPOT A</u>	niet vermeld	6
	negatief	1
	geen ROS1 translocatie	1

Staal	Eventueel vastgestelde therapeutische conclusie	Aantal laboratoria (/8)
<u>ROS1-2023 SPOT A</u>	geen kans op respons aan ROS1 inhibitie therapie	1
	geen indicatie voor een therapie met ROS1 inhibitoren	1

Staal	Vastgestelde biologische classificatie	Aantal laboratoria (/8)
<u>ROS1-2023 SPOT B</u>	niet vermeld	2
	pathogeen Tier IA	1
	vermoedelijk pathogeen	1
	positief	1
	behandeling met TKIs	1
	ROS1 translocatie	2

Staal	Eventueel vastgestelde therapeutische conclusie	Aantal laboratoria (/8)
<u>ROS1-2023 SPOT B</u>	kans op respons aan ROS1 inhibitie therapie	1
	indicatie voor een therapie met ROS1 inhibitoren	2
	specifieke behandeling met Tyrosine Kinase	1

2. Resultaten per laboratorium

Lab.	Gebruikte methodes	Vasgestelde resultaten	
		SPOT A	SPOT B
1	Automatische methode-Leica bond III Kreatech FISH ROS1 (6q22) Break XL for Bond probes- Leica biosystems	ROS1 WT	ROS1 generschikking
2	NGS-RNA seq	ROS1 WT	ROS1 gemuteerd
	qPCR-Idylla		
3	Semi-automatische methode -VP2000 Vysis ROS break apart FISH probe kit - Abbott	ROS1 WT	ROS1 translocatie
4	Semi-automatische method-VP2000 ON ROS1 (6q22) Break probe-Leica biosystems	ROS1 WT	ROS1 translocatie
5	Automatische methode-Dako Omnis ROS1 IQFISH Break apart probe-Agilent	ROS1 WT	Positief
6	Manuele methode Kreatech ROS1 (6q22) Break probe - Leica biosystems	ROS1 WT	ROS1 generschikking
7	Manuele methode Kreatech ROS1 (6q22) Break probe - Leica biosystems	ROS1 WT	ROS1 gemuteerde
8	Manuele methode FISH ROS1 kit Abbott	ROS1 WT	ROS1 generschikking
9	Manuele methode-ZytoLight SPEC ROS1 Dual Color Break Apart Probe kit-Zytovision-ForLab	ROS1 WT	ROS1 gemuteerd

3. Commentaren

- Het laboratorium dat NGS en qPCR technieken gebruikte heeft dezelfde resultaten als de gebruikers van FISH behaald. We zullen in de volgende jaren een bredere enquête (PCR+FISH) organiseren wanneer dit type stalen van dezelfde firma zullen gebruikt worden.

4. Gebruikte methodes

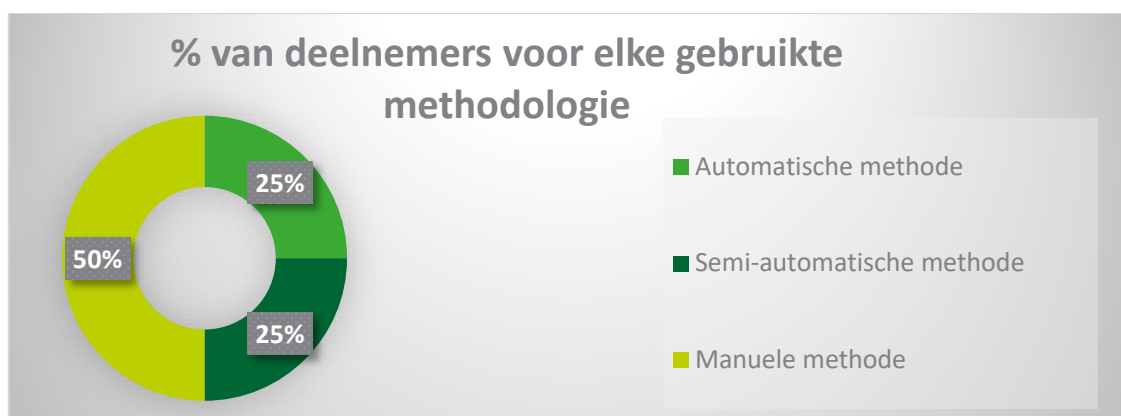


Chart 9: Verdeling van de door laboratoria gebruikte methodologie voor de detectie van ROS1 gen translocaties.

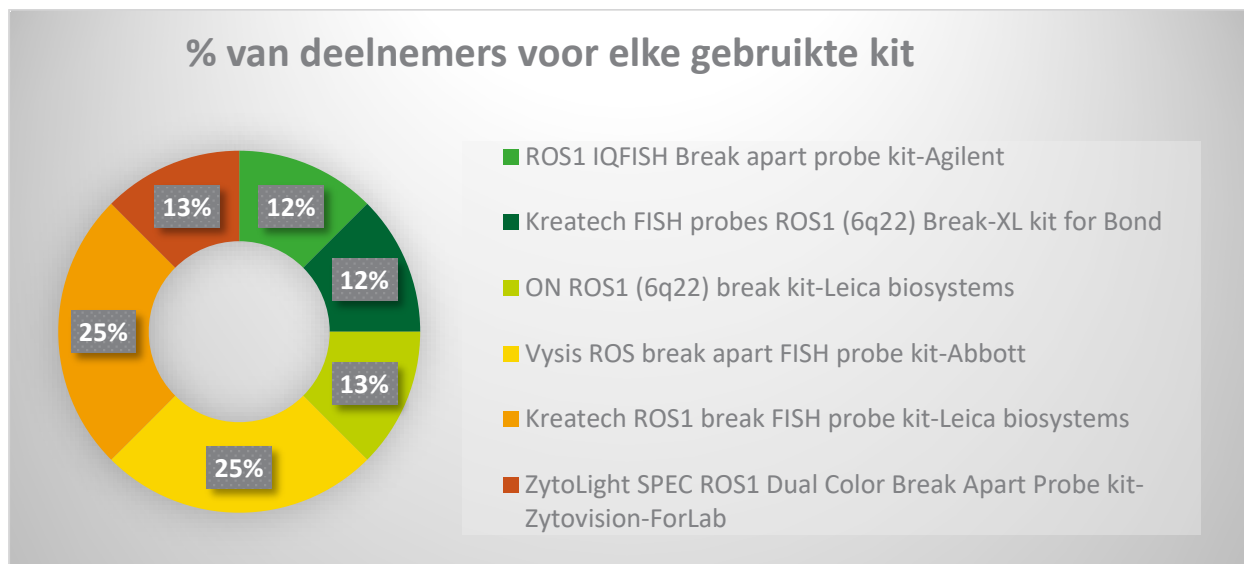


Chart 10: Verdeling van de gebruikte kits voor de detectie van translocaties in het ROS1 gen.

Onder de gebruikers van een FISH-methode voor de detectie van ROS1 geherschikking, zijn de manuele methode met ofwel een Vysis ROS1 break apart FISH probe van Abbott ofwel een Kreatech ROS1 break FISH probe van Leica biosystems de meest gebruikte.

Conclusies m.b.t de resultaten van de laboratoria

De resultaten van de laboratoria voor de detectie van herschikkingen van de ROS1 gen zijn zeer bevredigend. We kunnen opmerken dat het laboratorium dat een PCR-methode gebruikt heeft resultaten heeft gerapporteerd die in overeenstemming zijn met de verwachte resultaten en met de resultaten gerapporteerd door de laboratoria die een FISH-methode gebruikt hebben (gevalideerd voor dit type van stalen). In de volgende jaren, zullen we een enquête organiseren met dit type stalen van dezelfde firma, zodat de analyse met de PCR-techniek zal mogelijk zijn bovenop de FISH-techniek.

We willen de laboratoria waarschuwen dat in overeenstemming met ons beleid en om een billijke behandeling van deelnemers te garanderen de laboratoria die zich uitschreven na ontvangst van de stalen (dus een laattijdige uitschrijving) een score "niet geslaagd" in zijn individueel rapport van de enquête zal hebben (indien de foutieve inschrijving een fout van het laboratorium is). Het doel van deze sanctie is om laboratoria bewust te maken van het feit dat een laattijdige uitschrijving extra kosten en extra werk voor beide partijen met zich meebrengt.

NIPT

Stalen

De stalen zijn 1ml gesimuleerd plasma (Matribase) met ingekapseld foetaal DNA (cfDNA concentratie= 20ng/µl). Het is een commerciële staal van de firma Seracare (37 Birch St, Milford, MA 01757, USA) dat in België door de firma Sopachem (Nieuwe Steenweg 20A 9810 Nazareth BE) verdeeld wordt.

De stalen waren naar de laboratoria gestuurd met “gesimuleerde” klinische gegevens: naam, voornaam, adres, gewicht, lengte, van de patiënte, de geboortedatum en de bloedafname datum en uur. De zwangerschapsduur op het moment van de afname, de mogelijkheid dat het een tweeling betref als van toepassing en de geplande bevalling datum waren ook getoond.

We hebben gevraagd aan de laboratoria om de aanwezigheid van de trisomie 21 met moleculaire methodes op te sporen. Naast het antwoord formulier dat een precisering van de gebruikte methode vroeg, hebben we aan de laboratoria ook gevraagd het klinisch rapport van de analyse van het staal toe te voegen.

Deelnemers

14 klinische biologie laboratoria waren voor deze enquête ingeschreven.

Alle ingeschreven laboratoria hebben geantwoord.

4 laboratoria hebben de analyse uitbesteed aan een centrum van menselijk erfelijkheid en 1 laboratorium aan een ander laboratorium van klinische biologie.

Resultaten

Elk laboratorium heeft één of twee stalen met ingekapseld DNA ontvangen. Het aantal stalen is afhankelijk (i) van de resultaten van de preliminaire bevraging over de gebruikte methode en de nodige DNA-hoeveelheid die we in 2021 naar de deelnemers gestuurd hebben en (ii) van de commentaren van de enquête van 2022.

1. Resultaten per staal

1.A Interpretatie

Hieronder worden de verschillende interpretaties getoond die de laboratoria weergegeven hebben in het klinische rapport van de patiënt:

Staal	Verwachte resultaten	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
NIPT2023	Hoge risico op trisomie 21	afwijkend- T21 waarschijnlijk/ risico voor T21	8 (57)
		trisomie 21 zeer waarschijnlijk	1 (7)
		verhoogd risico voor T21	3 (21)
		trisomie 21 gedetecteerd-afwijkend- voorspellende waarde 59%	1 (7)
		verdenking van een chromosomale anomalie van het autosoom 47 ;XY;21	1 (7)

1.B. Verplichting van een bevestiging met een invasieve test

Het aantal laboratoria die de verplichting van bevestiging (door het hoog risico op 21 trisomie) op het klinisch rapport aangegeven hebben:

Staal	Verwachte resultaten	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
NIPT2023	Verplichting van bevestiging	vermeld op het rapport	14 (100)

1.C. Informatie over de detectie limiet van de test

Het aantal laboratoria die de detectie limiet van de test op het klinisch rapport aangegeven hebben:

Staal	Verwachte resultaten	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
NIPT2023	Vermeld op het rapport	duidelijk vermeld op het rapport	12 (86)
		onduidelijk/vage limiet	2 (14)

Met een educatief doel, werd de administratieve nauwkeurigheid van de gegevens van het rapport ook geanalyseerd:

1.D. Identificatie van het patiënt

Het aantal laboratoria die een correcte identificatie van de patiënt op het klinisch rapport aangegeven hebben:

Staal	Verwachte resultaten	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
NIPT2023	Fanny Kiekeboe (23/12/1993)	correcte identificatie (NAAM-VOORNAAM-GD)	14 (100)

1.E Afname datum (24/04/2023)/Receptie Datum/Rapport datum

Hieronder worden de laboratoria getoond die de afname datum, de receptie datum en de datum van het rapport vermeld hebben. Voor de afname datum wordt eveneens in rekening gebracht of deze correct vermeld werd:

Staal	Verwachte resultaten	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
NIPT2023	Vermelding van de 3 data op het rapport	3 data vermeld op het rapport	9 (64)
		verkeerde afname datum (25/04; 26/04; 03/05) en vermelding van de receptie en rapport datum	4 (21)
		geen afname datum vermeld	1 (7)

1.F Zwangerschapsduur

Hieronder worden de laboratoria getoond die de correcte zwangerschapsduur op het moment van de afname op het klinisch rapport vermeld hebben

Staal	Verwachte resultaten	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
NIPT2023	12w en 5d	12w en 5d	14 (100)

NB: 5 laboratoria hebben een correcte zwangerschapsduur vermeld hoewel zij een onjuiste afname datum aangegeven hebben.

2. Resultaten per laboratorium

Labo	Gebruikte methode	Vastgestelde resultaten T21	Verplichting tot invasieve test J/N	Detectie limiet J/N	Identificatie van de patient Fanny Kiekeboe (GD: 23/12/1993)	Zwangerschapsduur 12w en 5d	Afname (24/04/2023) /receptie/ rapport data J/N
1	WGS-Nextseq 500-Illumina Veriseq NIPT solution Versie 2-Illumina	Verhoogd risico optrisomie 21	J	J	J	J	J
2	WGS-Nextseq 500-Illumina Veriseq NIPT solution Versie 2-Illumina	trisomie 21 gedetecteerd-afwijkend positieve voorspellende waarde 59%	J	J	J	J	J
3*	NIPT-PLUZ Hiseq4000-Illumina Custom pipeline	afwijkend voor trisomie 21- trisomie 21 waarschijnlijk	J	J	J	J	verkeerde afname datum (25/04)
4*	NIPT-PLUZ Hiseq/Novaseq-Illumina Custom pipeline (GCAP_18_12_cloud)	afwijkend voor trisomie 21- trisomie 21 waarschijnlijk	J	J	J	J	J
5*	NIPT-PLUZ Hiseq/Novaseq-Illumina Custom pipeline (GCAP_18_12_cloud)	afwijkend voor trisomie 21- trisomie 21 waarschijnlijk	J	J	J	J	J
6*	WGS- Nextseq 500Dx Illumina Veriseq NIPT solution Versie 2-Illumina	verhoogd risico op trisomie 21	J	J	J	J	J
7	Shallow WGS-Nextseq-Illumina Veriseq Versie 2-Illumina	afwijkend voor trisomie 21- verhoogd risico op trisomie 21	J	J	J	J	J
8	Microarray Harmony prenatal test-Roche Ariosa	afwijkend voor trisomie 21- verhoogd risico op trisomie 21	J	J	J	J	J

Labo	Gebruikte methode	Vastgestelde resultaten T21	Verplichting tot invasieve test J/N	Detectie limiet J/N	Identificatie van de patient Fanny Kiekeboe (GD: 23/12/1993)	Zwangerschapsduur 12w en 5d	Afname (24/04/2023) /receptie/ rapport data J/N
9	WGS-Nextseq 500Dx-Illumina Veriseq NIPT solution Versie 2- Illumina	verhoogd risico op T21	J	J	J	J	J
10	WGS- Nextseq 500Dx-Illumina Veriseq Versie 2- Illumina	afwijkend voor trisomie 21- verhoogde risico op trisomie 21	J	J	J	J	geen afname datum vermeld
11	Microarray Harmony prenatal test- Roche Ariosa	trisomie 21 zeer waarschijnlijk	J	J	J	J	verkeerde afname datum (26/04)
12	WGS-Nextseq 500Dx-Illumina Veriseq NIPT solution-Illumina	afwijkend voor trisomie 21- verhoogd risico op trisomie 21	J	J	J	J	verkeerde afname datum (03/05)
13*	NIPT-PLUZ Hiseq4000-Illumina Custom pipeline	Afwijkend voor trisomie 21- trisomie 21 waarschijnlijk	J	J	J	J	J
14	NGS-Nextseq 550Dx-Illumina Nextseq 500/550 High output kit V2,5 (Anomalies <7Mbp)	verdenking van een chromosomale anomalie van het autosoom 47 ;XY;21	J	J	J	J	verkeerde afname datum (25/04)

* analyse uitbestede

3. Commentaren

- Een laboratorium heeft een verdenking van een chromosomale anomalie vermeld maar heeft niet duidelijk een hoog risico op trisomie 21 op het rapport vermeld zoals aanbevolen door de richtlijnen. In vergelijking met vorig jaar, heeft dit laboratorium een vermelding van een noodzaak van een invasieve test op het rapport naast een genetische counseling vermeld.
- Een laboratorium heeft niet een hoge risico op trisomie 21 op het rapport vermeld zoals aanbevolen door de richtlijnen maar het heeft een detectie van trisomie 21 met een voorspellende waarde van 59% vermeld.
- Ter informatie, 4 laboratoria hebben een verkeerde afname datum vermeld met betrekking tot de afname datum vermeld in de klinische gegevens gestuurd met de stalen. Eén laboratorium heeft geen afname datum vermeld.

4. Gebruikte methodes

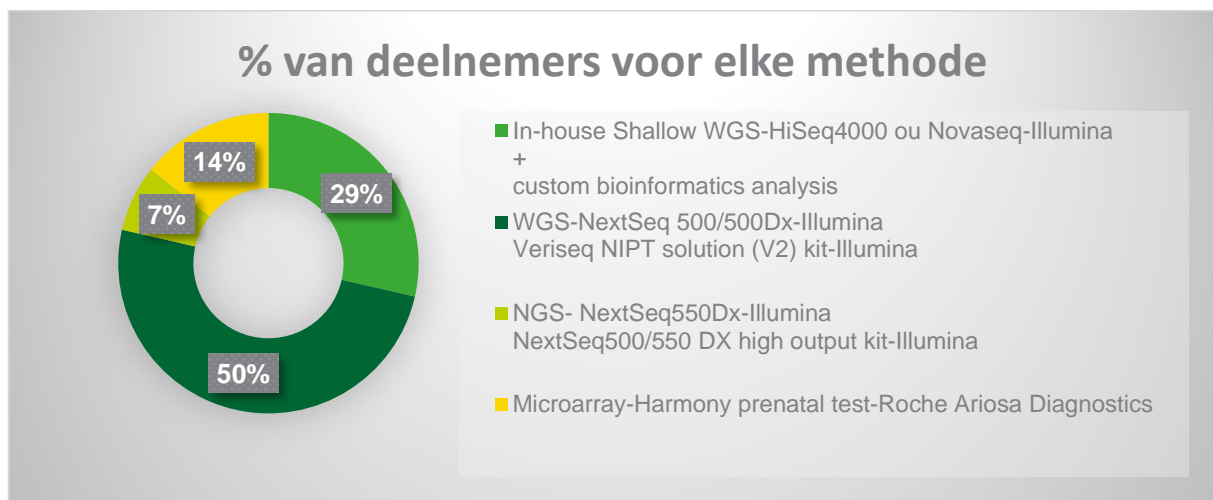


Chart 13 : Verdeling van laboratoria per gebruikte methode voor de detectie van trisomie 21 in het staal NIPT2022.

De meest gebruikte methode voor de detectie van de trisomie 21 is de WGS met de sequencer Nextseq 500 of 550Dx van Illumina en met de kit een Veriseq NIPT-solution (V.2) van Illumina.

Conclusies over de resultaten van de laboratoria

Het geheel van de geëvalueerde/geanalyseerde punten in deze enquête is gebaseerd op verschillende Belgische en Europese richtlijnen zodat de kritische punten van het NIPT klinisch rapport kunnen geïdentificeerd worden. U vindt hieronder de referentie van deze documenten:

- ISO15189:2012-Medical laboratories — Requirements for quality and competence
- BeSHG Prenatal Committee, NIPT good clinical practice guidelines. 2017
- Deans ZC. et al. Chapter 11: Best Practices for Integrating Cell-Free DNA-Based NIPT Into Clinical Practice, in Non-Invasive Prenatal testing (NIPT). Lieve Page-Christiaens and Hanns-Georg Klein, 2018; 191–205
- Deans ZC, Allen S, Jenkins L, et al. Ensuring high standards for the delivery of NIPT world-wide: Development of an international external quality assessment scheme. Prenatal Diagnosis. 2019; 39:379–387

De resultaten van de laboratoria voor deze enquête zijn bevredigend. Alleen 2 laboratoria hebben nagelaten om adequaat te antwoorden op de enquête door de richtlijnen voor de rapportering van de resultaten van een NIPT test niet te volgen. Inderdaad, hebben deze laboratoria de opsporing van de trisomie 21 in termen van hoog risico niet gerapporteerd. We hebben deze 2 laboratoria gecontacteerd. Zij hebben corrigerende maatregelen genomen inclusief de conclusies vermeld in hun klinische rapporten.

PDGFRA

Stalen

De PDGFRA stalen werden geleverd door de firma Sopachem (Nieuwe Steenweg 20A 9810 Nazareth BE) De firma is een leverancier van de stalen van de US firma SeraCare (37 Birch St, Milford, MA 01757, USA).

In het kader van deze enquête, is het staal een tube met 1µg van gDNA in een tris-EDTA buffer (DNA conc. 50ng/µl) met de mutatie PDGFRA: c.2525A>T p.(Asp842Val) (VAF 30%).

Deelnemers

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



Chart 9 : Verdeling van ingeschreven laboratoria per specialiteit

Alle ingeschreven laboratoria hebben geantwoord.

Resultaten

De laboratoria hebben 1 tube met 1µg gDNA in een Tris-EDTA buffer ontvangen. De DNA-concentratie is 50ng/µl. We hebben hen ook gevraagd om de allelfrequentie van de gevonden mutaties te geven (indien bepaald), de biologische en klinische classificaties/interpretaties en hun gebruikte methode.

1. Resultaten per staal

Staal	Verwachte resultaten	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
PDGFRA-2023	Aanwezigheid van de mutatie NM_006206.6 (PDGFRA) : c.2525A>T p.(Asp842Val) (AF=30%) Pathogen-Tier IA	PDGFRA c.2525A>T p.(Asp842Val) aanwezig	17 (100)

Om de biologische en klinische classificatie te scoren, heeft het expertencomité van moleculaire biologie de volgende scoring gedefinieerd voor deze enquête. Dit scoring is gebaseerd op de richtlijnen van de Compermed : <https://www.compermed.be/en/guidelines>.

Goed

Aanvaardbaar

Niet evalueerbaar

Vastgestelde biologische classificaties	Vastgestelde klinische classificaties (Tier)	% laboratoria
Pathogeen	Tier I	82
Pathogeen	Tier IA	18

100% van de laboratoria hebben een « goede » score voor de biologische en de klinische classificatie gekregen.

De eventuele vastgestelde therapeutische conclusies zijn, ter info hieronder getoond. Het experten comité heeft deze niet gescoord.

Vastgestelde therapeutische conclusies	% laboratoria
resistentie aan l'Imatinib/ Sunitinib; gevoeligheid aan Avapritinib/Dasatinib	59
resistentie aan l'Imatinib	12
Imatinib niet aangewezen; nieuwe indicatie is in ontwikkeling oo Avapritinib	6
verminderde gevoeligheid aan TKIs	6
verminderde gevoeligheid voor Imatinib; gevoeligheid voor Avapritinib	6
komt in aanmerking voor multikinase inhibitoren zoals Sunitinib Regorafenib et Ripretinib	6
ok voor TKs inhibitoren	6

2. Resultaten per laboratorium

Labo	Methodologie			Vastgestelde resultaten			
	Gebruikte sequencer/ panel	LOD		PDGFRA mutaties	Biologische classificatie	Klinische classificatie	Therapeutische conclusies
		SNV	Indels				
1	NGS-Miseq-Illumina QIAseq Targeted DNA custom-Qiagen	5	5	NM_006206.6 c.2525 A>T p.(Asp842Val) D842V	pathogeen	I	vermindere gevoeligheid voor Imatinib; gevoeligheid voor Avapritinib
2	NGS-Miseq-Illumina Ampliseq focus panel-Illumina	3	3	c.2525 A>T p.(Asp842Val) D842V	pathogenic	IA	resistentie aan Imatinib en mogelijks Sunitinib, gevoelighed aan Dasatinib
3	NGS-Miseq-Illumina QIAseq Targeted DNA custom-Qiagen	5	5	NM_006206.6 c.2525 A>T p.(Asp842Val) D842V	pathogeen	I	imatinib niet aangewezen; nieuwe indicatie is in ontwikkeling oo avapritinib
4	NGS-Nextseq-Illumina Custom panel	5	5	NM_006206 c.2525 A>T p.(Asp842Val) D842V	pathogeen	I	resistentie aan Imatinib gevoelighed aan Avapritinib
5	NGS-Miseq-Illumina SOPHiA DDM Solid Tumor Solutions (STS)-Sophia Genetics	5	5	c.2525 A>T p.(Asp842Val) D842V	pathogenic	I	resistentie aan Imatinib; goedgekeurd voor Avapritinib
6	NGS-Miseq-Illumina QIAseq Human Actionable Solid Tumor-Qiagen	0,9	2	c.2525 A>T p.(Asp842Val) D842V	pathogenic	IA	resistentie aan Imatinib gevoelighed aan Avapritinib et Dasatinib. Indien resistentie aan Avapritinib en Dasatinib dan Ripretinib
7	NGS-Miseq-Illumina Ampliseq focus panel-Illumina	5	5	NM_006206 c.2525 A>T p.(Asp842Val) D842V	pathogeen	IA	resistentie aan Imatinib
8	NGS-Ion S5 gene studio - ThermoFischer Oncomine focus-ThermoFischer	5	5	c.2525 A>T p.(Asp842Val) D842V	pathogeen	I	verminderde gevoeliheid aan TKIs
9	NGS-Novaseq 6000-Illumina KAPA HyperCap Custom-Roche	5	5	NM_006206.6 c.2525 A>T p.(Asp842Val) D842V	pathogeen	I	komt in aanmerking voor multikinase inhibitoren zoals Sunitinib Regorafenib et Ripretinib

Labo	Methodologie			Vastgestelde resultaten			
	Gebruikte sequencer/ panel	LOD		PDGFRA mutaties	Biologische classificatie	Klinische classificatie	Therapeutische conclusies
		SNV	Indels				
10	NGS-Novaseq 6000-Illumina Custom panel	5	5	NM_006206.6 c.2525 A>T p.(Asp842Val) D842V	pathogeen	I	resistentie aan Imatinib en Sumatinib, gevoeligheid aan nieuwe generatie TKI Avapritinib
11	NGS-Ion Gene Studio S5-ThermoFischer Custom-Thermofischer	4	4	c.2525 A>T p.(Asp842Val) D842V	pathogenic	I	resistentie aan Imatinib en gevoeligheid voor Avapritinib
12	NGS-Nextseq 550Dx-Illumina Twist custom-Twist Bioscience	5	5	NM_006206.6 c.2525 A>T p.(Asp842Val) D842V	pathogenic	I	resistentie aan Imatinib
13	NGS-Ion Gene Studio S5-ThermoFischer Custom-Thermofischer	4	4	c.2525 A>T p.(Asp842Val) D842V	pathogenic	I	resistentie aan Imatinib en gevoeligheid voor Avapritinib
14	NGS-Nextseq 550dx- Illumina QIAseq Targeted DNA custom-Qiagen	5	5	c.2525 A>T p.(Asp842Val) D842V	pathogeen	I	resistentie aan Imatinib en gevoeligheid voor Dasatinib en Avapritinib
15	NGS-Ion gene studio S5XL - Thermofischer Custom panel Alpha_V4-Thermofischer	2,5	2,5	NM_006206.5 c.2525 A>T p.(Asp842Val) D842V	pathogenic	I	ok voor TK inhibitoren
16	NGS-Novaseq-Illumina KAPA HyperPlus-Roche	5	5	c.2525 A>T p.(Asp842Val) D842V	pathogeen	I	resistentie aan Imatinib en mogelijks Sumatinib, gevoeligheid aan Avapritinib
17	NGS-Novaseq 6000-Illumina Custom panel	5	5	NM_006206.5 c.2525 A>T p.(Asp842Val) D842V	pathogeen	I	resistentie aan Imatinib en Dasatinib en Avapritinib ipv Imatinib -MCCM guidelines GIST 2021

Verdeling van de gerapporteerde allelfrequenties voor de detectie van de mutatie PDGFRA D842V

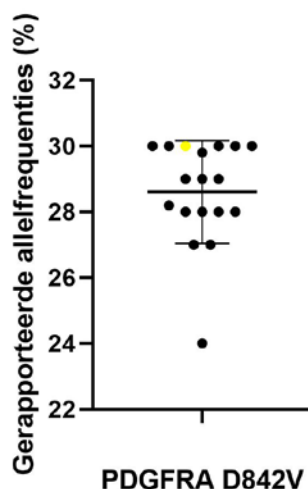


Chart 10: Verdeling van de gerapporteerde allelfrequenties voor de detectie van de mutatie PDGFRA D842V in het staal PDGFRA-2023. Het punt in geel is de aangegeven allelfrequentie bij de leverancier.

Een laboratorium dat NGS gebruikt heeft een lagere AF dan het gemiddelde van de gerapporteerde AF vermeld.

3. Commentaren

- Alle laboratoria hebben de mutatie teruggevonden. Zij hebben een score “goed” gekregen voor de biologische en klinische classificaties.
 - Betreffende de therapeutische conclusies, een laboratorium heeft een gevoeligheid voor TK-inhibitoren vermeld maar zonder vermelding aan welke TKIs of een eventuele resistentie aan sommige TKIs. Een ander laboratorium heeft een verminderde gevoeligheid vermeld voor TKIs maar zonder vermelding van welke TKIs mogen gebruikt worden.
- De experts hebben de vastgestelde therapeutische conclusies geanalyseerd. Hoewel deze worden gevraagd en geanalyseerd met een educatief doel, het expertencomité heeft onderlijnd dat het antwoord “OK voor TKs inhibitoren” niet geschikt is. Inderdaad, het is bekend dat de aanwezigheid van de mutatie tot resistentie aan bepaald TKs leidt. Het zou beter geweest zijn om de geschikte TK aan te geven.

4. Gebruikte methodes

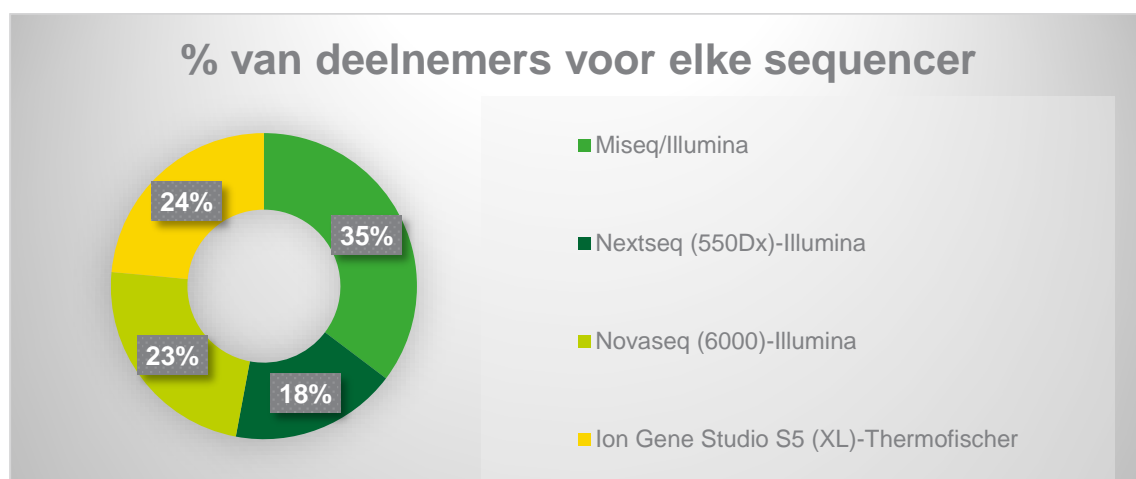


Chart 11: Verdeling van laboratoria per gebruikte sequencer voor de detectie van mutaties in het PDGFRA gen

De meeste gebruikte sequencer is de Miseq van de firma Illumina.

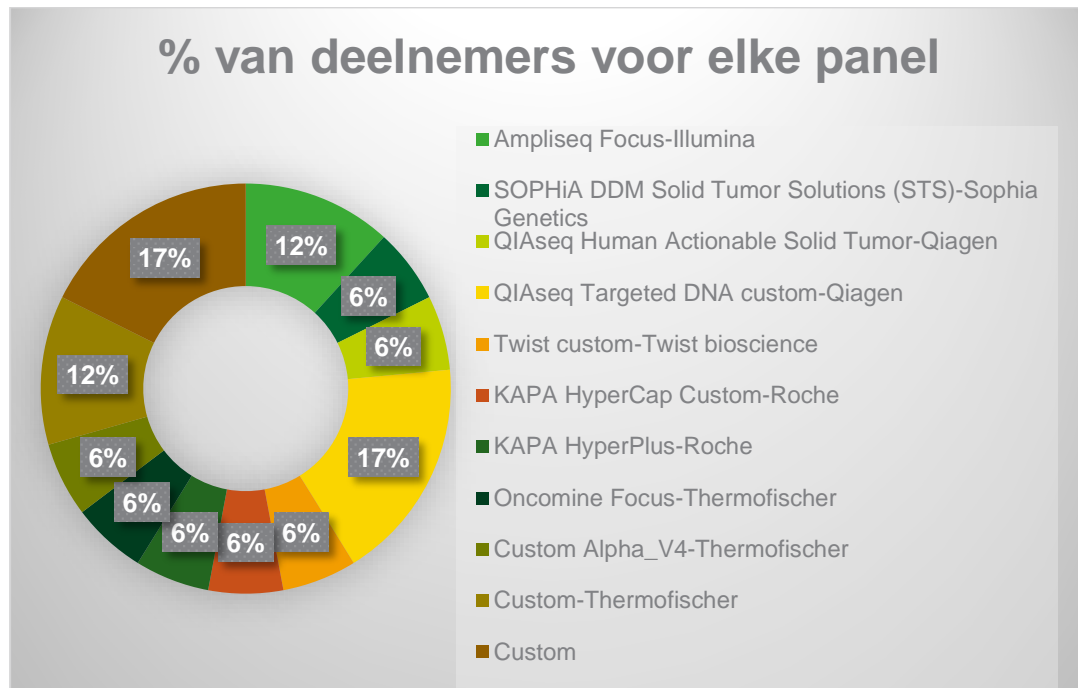


Chart 12: Verdeling van laboratoria per gebruikte panel voor de detectie van mutatie in PDGFRA gen

De meest gebruikte panels voor de detectie van mutaties in het PDGFRA gen zijn het QIAseq Targeted DNA panel van Qiagen en “custom” panels. Merk op dat de 3 laboratoria die “custom” hebben vermeld, geen leverancier hebben vermeld.

Conclusies m.b.t de resultaten van de laboratoria

De resultaten van de laboratoria voor deze enquête zijn bevredigend. Alle laboratoria hebben de mutatie PDGFRA D842V teruggevonden. 100% van de laboratoria heeft een score “goed” voor de vermelde biologische en klinische classificaties behaald. De experts hebben het antwoord “OK voor TKS” niet geschikt bevonden aangezien er enkele inhibitoren zijn waarvoor er resistentie is door de aanwezigheid van deze mutatie.

HER 2

Voor de enquête 2023/5, verwijzen we naar het globaal rapport dat voor deze enquête uitgebracht is. Dit rapport is beschikbaar op onze website:

<https://www.sciensano.be/nl/kwaliteit-van-laboratoria/eke-moleculaire-biologie-hemato-oncologie#recente-rapporten>

De resultaten van de laboratoria voor klinische biologie en pathologische anatomie zijn zeer bevredigend. Enkel transcriptiefouten bij het invullen van het formulier werden vastgesteld. De twee laboratoria die een score “niet geslaagd” hebben behaald, hebben ons hun ruwe data doorgestuurd. Volgens deze data, hadden deze laboratoria correct moeten antwoorden en hadden ze dus een score “geslaagd” moeten behalen. We raden de laboratoria die dit soort fouten hebben gemaakt aan om een NC op te stellen in hun kwaliteitssysteem en om de nodige acties te ondernemen om deze transcriptiefouten te vermijden. Noteer dat één van de twee laboratoria dit type van fout in 2022 al gemaakt heeft. Er werd een NC in hun kwaliteitssysteem opgesteld.

We herinneren de laboratoria er ook aan dat we, volgens ons intern beleid en ons kwaliteitssysteem geen individuele resultaten mogen wijzigen na afsluiten van de EKE en dus ook geen individueel rapport wijzigen. Enkel een fout die aan ons te wijten is kan leiden tot een wijziging van het individueel rapport en dus tot een wijziging van de score van het laboratorium.

NPM::ALK

Voor de enquête 2023/6, verwijzen we naar het globaal rapport dat voor deze enquête uitgebracht is. Dit rapport is beschikbaar op onze website:

<https://www.sciensano.be/nl/kwaliteit-van-laboratoria/eke-moleculaire-biologie-hemato-oncologie#recente-rapporten>

De resultaten van de laboratoria voor de detectie van het fusiegen *NPM::ALK* zijn zeer bevredigend. Alle laboratoria hebben het *NPM::ALK* fusiegen gedetecteerd in de betreffende spot, zowel voor de PCR als voor de FISH gebruikers. We kunnen opmerken dat 3 klinische biologie laboratoria zich laattijdig hebben uitgeschreven (na ontvangst van de stalen).

We herinneren de laboratoria eraan dat we een email sturen vóór het begin van de enquête, die hen toelaat ons op de hoogte te brengen van eventuele wijzigingen m.b.t. hun inschrijving/deelname. Daarom, in overeenstemming met ons beleid en om een billijke behandeling van deelnemers te garanderen ontvangen de laboratoria die zich uitschreven na ontvangst van de stalen een score “niet geslaagd” als gevolg van hun laattijdige uitschrijving (indien de foutieve inschrijving een fout van het laboratorium is).

Uitbestede evaluatie: Detectie van de mutaties van de Factor V en Protrombine genen (ECAT)

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 het *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 voor 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 (Factor II) gen en de mutatie in het Factor-V Leiden gen uit te voeren.

Deelnemers

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

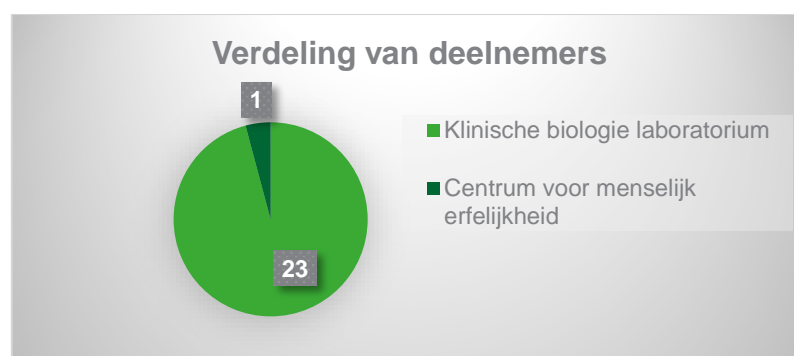


Chart 13: Verdeling van laboratoria per specialiteit

5 laboratoria hebben ons geen resultaten terug gestuurd. Zij worden dus als “niet-deelnemend” behoud.

Resultaten

Als sponsor van deze EKE, hebben we gevraagd aan de laboratoria om ons hun resultaten te sturen. Van elk van de deelnemende laboratoria die ons resultaten gestuurd hebben, hebben we ook de gebruikte methodologie ontvangen.

1. Resultaten per staal

Mutatie te detecteren in het Factor V-Leiden gen: **NM_000130.5:c.1601G>A, rs6025**

Round 1-April 2023 (/15 deelnemers)*

Facteur V-leiden	Verwachte resultaten (AF)	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
Staal 01	A/A (homozygoot: c.1601A)	G/G	0
		G/A	0
		A/A	15 (100)
Staal 02	G/G (homozygoot WT)	G/G	15 (100)
		G/A	0
		A/A	0

*Houd er rekening mee dat sommige laboratoria alleen aan 1 van de 2 georganiseerde ronden deelnamen.

Round 2-September 2023 (/19 deelnemers)*

Facteur V-leiden	Verwachte resultaten (AF)	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
Staal 01	G/A (heterozygoot: c.1601G/c.1601A)	G/G	1 (5)
		G/A	18 (95)
		A/A	0
Staal 02	G/G (homozygoot WT)	G/G	18 (95)
		G/A	1 (5)
		A/A	0

*Houd er rekening mee dat sommige laboratoria alleen aan 1 van de 2 georganiseerde rondes deelnamen.

Mutatie te detecteren in het Factor II (prothrombine) gen: **NM_000506.5:c.*97G>A, rs1799963**

Round 1-April 2023 (/15 deelnemers)*

Factor V-Leiden	Verwachte resultaten (AF)	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
Staal 01	G/G (homozygoot WT)	G/G	15 (100)
		G/A	0
		A/A	0
Staal 02	G/G (homozygoot WT)	G/G	15 (100)
		G/A	0
		A/A	0

*Houd er rekening mee dat sommige laboratoria alleen aan 1 van de 2 georganiseerde rondes deelnamen.

Round 2-September 2023 (/19 deelnemers)*

Factor V-Leiden	Verwachte resultaten (AF)	Vastgestelde resultaten	Aantal laboratoria (%)
Staal 01	G/G (homozygoot WT)	G/G	19 (100)
		G/A	0
		A/A	0
Staal 02	G/G (homozygoot WT)	G/G	19 (100)
		G/A	0
		A/A	0

*Houd er rekening dat sommige laboratoria alleen aan 1 van de 2 georganiseerde rondes deelnamen.

2. Commentaren

- Het laboratorium met een slechte score voor het tweede staal in het kader van de detectie van Factor V gen mutatie heeft een NC opgesteld. Het laboratorium heeft beide stalen verwisseld. Het laboratorium heeft zijn ruwe data en het rapport van de NC naar ons opgestuurd.

3. Gebruikte methods

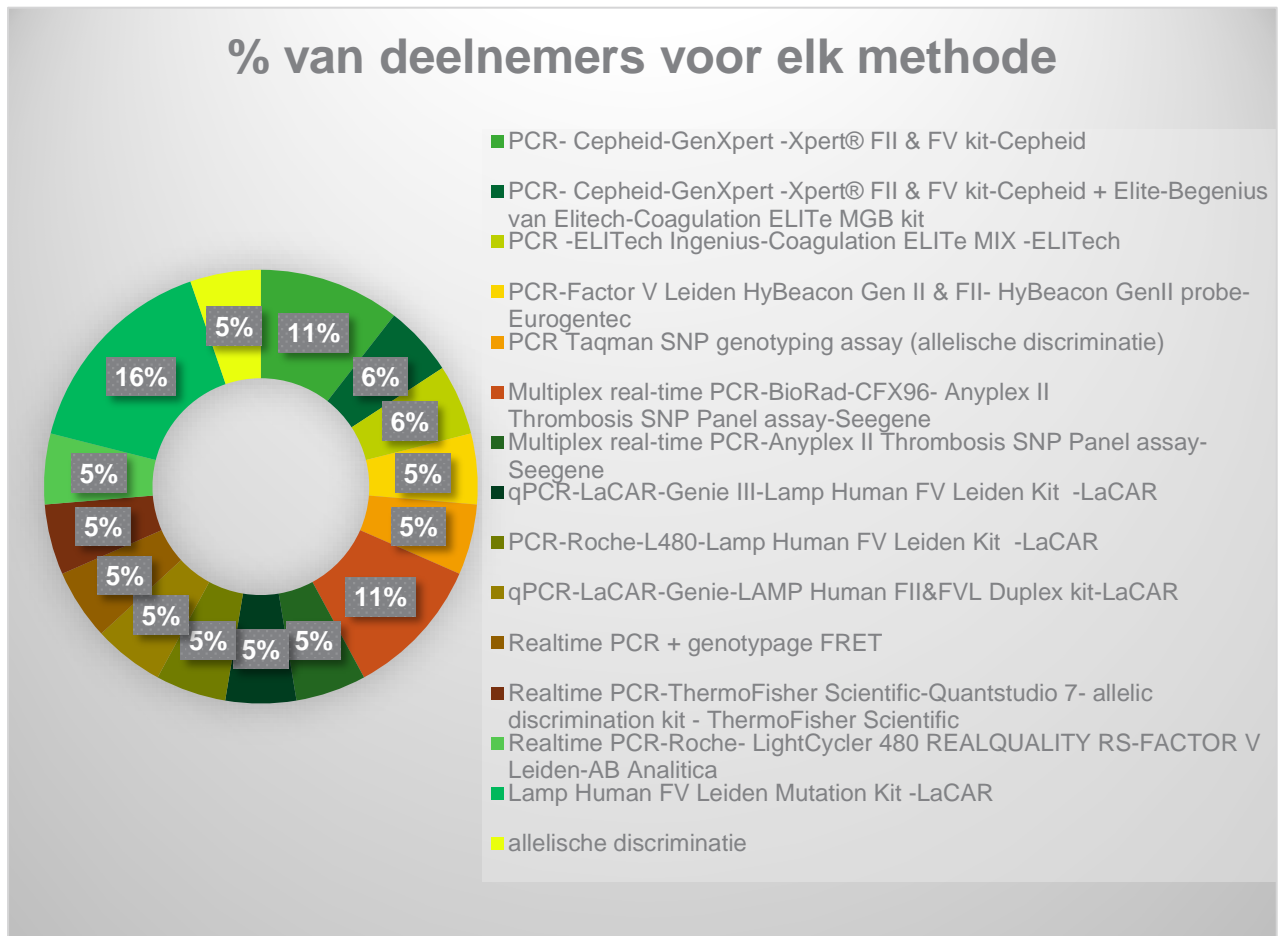


Chart 14: Verdeling van laboratoria per gebruikte panel voor de detectie van mutatie in Factor V Leiden gen.

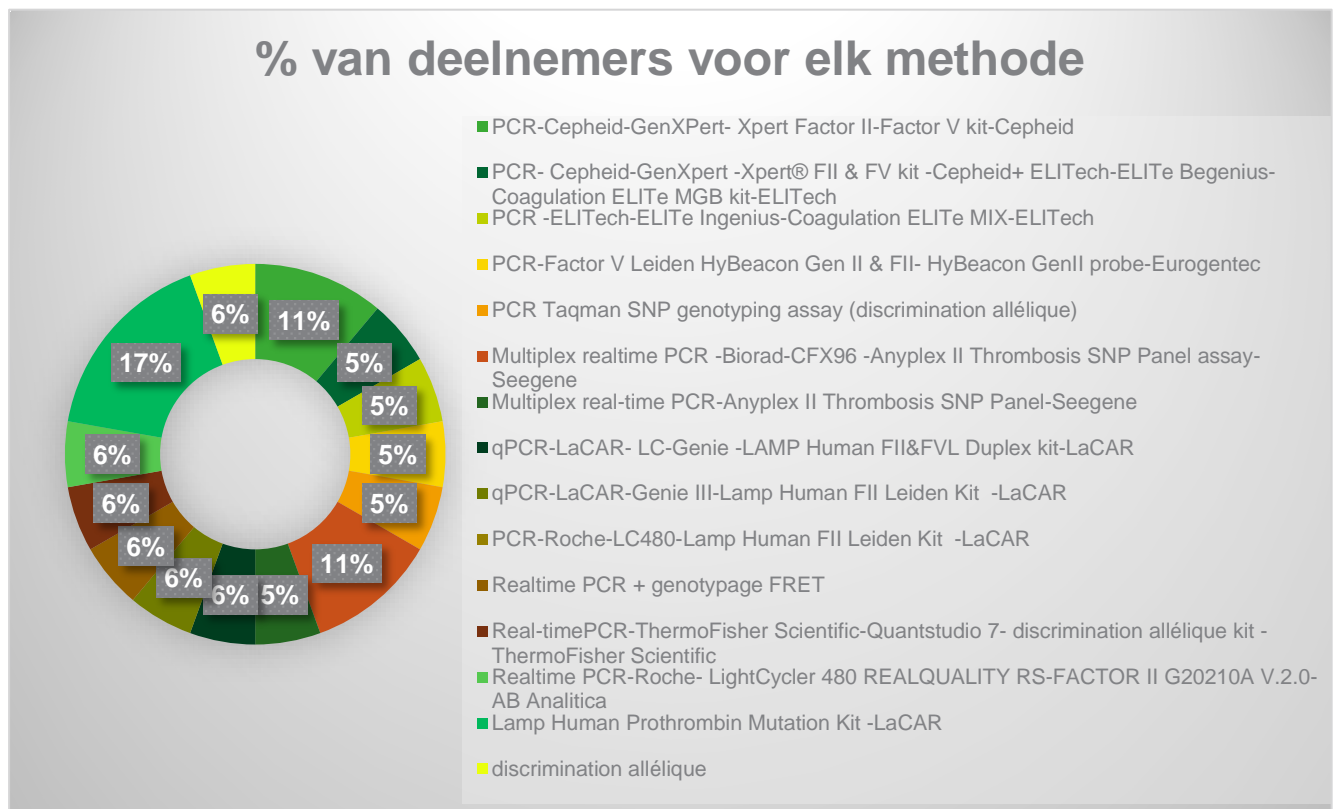


Chart 15: Verdeling van laboratoria per gebruikt panel voor de detectie van mutatie in Factor II/prothrombin gen.

De meeste gebruikte kit voor de detectie van mutatie in Factor V leiden gen is de kit "Lamp Human FV Leiden mutation kit" van de firma LaCAR gevolgd door de kits "Xpert Factor II-Factor V" van de firma Cepheid en "Anyplex II Thrombosis SNP panel" van de firme Seegene.

De meeste gebruikte kit voor de detectie van mutatie in Factor II/prothrombin gen is de kit "Lamp Human Prothrombin mutation kit" van de firma LaCAR gevolgd door de kits "Xpert Factor II-Factor V" van de firma Cepheid en "Anyplex II Thrombosis SNP panel" van de firme Seegene.

Conclusies over de resultaten van de laboratoria

De resultaten die we van de laboratoria ontvangen hebben zijn zeer bevredigend. Er is alleen maar één laboratorium dat de performantie vereisten voor de detectie van mutaties in het Factor V gen niet voldaan heeft. Dit betrof een schrijffout en een NC werd niettemin opgesteld door het laboratorium.

EINDE

©Sciensano, Brussel 2024.

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.

