

**BIOLOGISCHE GEZONDHEIDSRISICO'S
KWALITEIT VAN LABORATORIA**

EXTERNE KWALITEITSEVALUATIE*

Moleculaire biologie

Genetische onderzoeken

**Rapport van de stabiliteitstudie van FFPE coupes
gebruikt in het kader van moleculaire biologie enquêtes**

2025

* KB 03/12/1999

* KB 05/12/2011

Sciensano/Moleculaire biologie-Genetische onderzoeken-stabiliteitstudie/13/NL

Biologische gezondheidsrisico's
Kwaliteit van laboratoria
Juliette Wytsmanstraat 14
1050 Brussel | België

www.sciensano.be

COMITE VAN EXPERTEN

Sciensano					
Secretariaat		Tel:	02/642.55.22	Fax:	02/642.56.45
		E-mail	ql_secretariat@sciensano.be		
Joséphine Lantoine	Coördinator	Tel:	02/642 53 94		
		E-mail:	Josephine.lantoine@sciensano.be		
Bernard China	Vervanger coördinator	Tel:	02/642 52 08		
		E-mail:	bernard.china@sciensano.be		
Vanessa Ghislain	Vervanger coördinator	Tel:	02/642 53 85		
		E-mail:	Vanessa.ghislain@sciensano.be		
Experten	Instelling				
Ina Benoy	Rode Kruis				
Elke Boone	AZ Delta				
Barbara Depreter	AZ Delta				
Evelien Heylen	ZNA				
Marie LeMercier	UZA				
Freya Vaeyens	UZ Brussel				
Jacques Van Huysse	AZ Sint Jan Brugge				

Een draft versie van dit rapport werd voorgelegd aan de experts op 23/09/2025.

De experts werden uitgenodigd om hun opmerkingen per e-mail te versturen.

Verantwoordelijkheden:

Het Comité van experts werd voor advies geraadpleegd over de inhoud van het globaal rapport, de interpretatie van de resultaten, de evaluatiecriteria en de organisatie van de volgende evaluaties. De verantwoordelijkheid voor de selectie van de gebruikte stalen en het definitieve ontwerp van de EKE-enquête wordt door de dienst Kwaliteit van laboratoria van Sciensano genomen.

Autorisatie van het rapport : door Joséphine Lantoine, coördinator

Publicatiedatum : 07/11/2025

Alle rapporten zijn tevens te raadplegen op onze website:

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

TABLE DES MATIERES

1	STALEN : ALGEMEEN INFORMATIE.....	4
1.1	EGFR stalen	4
1.2	HER2 stalen.....	4
2	STABILITEITSTUDIE: METHODOLOGIE	4
2.1	EGFR	4
2.2	HER2.....	5
3	STABILITEITSTUDIE: RESULTATEN.....	6
3.1	EGFR	6
3.2	HER2.....	7
4	CONCLUSIES	7

1 Stalen : Algemeen informatie

De stalen zijn 4 µm FFPE-coupes 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.

1.1 EGFR stalen

De aanwezigheid van een EGFR mutatie (p.G601Efs*104) in het chromosoom 7 met een allelfrequentie van 1.1% werd bevestigd door de firma die een NGS analyse heeft uitgevoerd (panel Qiagen multimodal).

Deze mutatie mag niet gerapporteerd worden door de deelnemers die een NGS techniek gebruikt hebben aangezien het buiten de scope van de NGS conventie ligt (https://www.inami.fgov.be/SiteCollectionDocuments/convention_next_generation_sequencing_annexe_0_1.pdf). Deze deelnemers mogen het staal rapporteren als Wild type.

De mutatie kan door de PCR gebruikers wel gerapporteerd worden zonder dat dit als fout beschouwd werd maar deze deelnemers mogen de lage allelfrequentie en het VUS karakter duidelijk rapporteren op het rapport.

De aanwezigheid van een BRAF V660E « NM_004333.4(BRAF):c.1799T>A (p.Val600Glu) » mutatie werd bevestigd door de firma met een allelfrequentie van 8.2 %.

1.2 HER2 stalen

Voor deze enquête, hebben we FFPE coupes van twee verschillende klinische casussen.

Klinische casus F10007534 : 62-jarige vrouw met een weinig gedifferentieerd invasief ductaal carcinoma. Het stadium van de tumor is I-A, de graad is G3 (TNM=T1c N1aMx). De HER2-IHC score is 3+, de tumor is ER-positief en PR-positief. het resultaat van de ISH analyse uitgevoerd door het expertlaboratorium dat de testen voor de stabiliteitstudie uitgevoerd heeft is HER2-positief.

Klinische casus F30001318 : 60-jarige vrouw met een matig gedifferentieerd invasief carcinoma, deels van het type NST, deels micropapillair . Het stadium van de tumor is II-A, de graad is G2 (TNM=T2N0(sn)M0). Een in situ component (DCIS) is aanwezig van 15%. De HER2-IHC is negatief, de tumor is ER-positief en PR-positief. Het resultaat van de ISH analyse uitgevoerd door het expertlaboratorium dat de testen voor de stabiliteitstudie uitgevoerd heeft is HER2-negatief.

2 Stabiliteitstudie: Methodologie

2.1 EGFR

Een stabiliteitsstudie werd uitgevoerd door een lid van het expertencomité dat de EKE moleculaire biologie art.33bis/33ter evalueert.

Om de stabiliteit van de coupes te garanderen over de periode van de enquête en dit onafhankelijk van de bewaartemperatuur hebben we een stabiliteitsstudie uitgevoerd bij kamertemperatuur, 4°C en 30°C.

Twee opeenvolgende coupes werden gestuurd naar een expert vóór het begin van de enquête (na de ontvangst van de coupes van de firma).

Daarna werden 3 series van twee opeenvolgende coupes naar Sciensano verstuurd, samen met de stalen die in de enquête naar de labo's gestuurd werden om deze te bewaren bij verschillende temperaturen voor de hele duur van de enquête.

- i) Een eerste serie werd bewaard bij kamertemperatuur om de stabiliteit bij deze temperatuur tijdens een zending te garanderen.
- ii) Een tweede serie werd bewaard bij 4°C; dit is de temperatuur die door de firma wordt aangeraden voor de bewaring van coupes met name in het kader van IHC analyses.
- iii) Een laatste serie werd bewaard bij 30°C om de stabiliteit te garanderen zelfs wanneer de temperatuur tijdens de zending hoger dan 25°C zou zijn.

De drie series van coupes werden bewaard bij deze verschillende temperaturen gedurende 1 maand en werden naar onze expert verstuurd (aan wie de eerste coupes ook werden gestuurd) en geanalyseerd met zijn eigen NGS methode.

Het was niet mogelijk voor het expertlaboratorium om de coupes bij 30°C te bewaren. Het heeft deze bij kamertemperatuur bewaard tot de DNA extractie.

De resultaten tonen aan dat er geen impact van de bewaringstemperatuur was op de NGS analyse uitgevoerd door het expert laboratorium. Dit laboratorium heeft het staal als EGFR WT vastgesteld voor de 3 casussen en het heeft de BRAF mutatie « NM_004333.4(BRAF):c.1799T>A (p.Val600Glu) » in elke casus wel degelijk teruggevonden.

2.2 HER2

Een stabiliteitsstudie werd uitgevoerd door een lid van de werkgroep die betrokken is bij de EKE van pathologische anatomie.

Om de stabiliteit van de coupes te garanderen over de periode van de enquête en dit onafhankelijk van de bewaartemperatuur hebben we een stabiliteitsstudie uitgevoerd bij kamertemperatuur, 4°C en 30°C.

Twee opeenvolgende coupes werden gestuurd naar de expert voor het begin van de enquêtes (na de ontvangst van de coupes van de firma) voor beide casussen.

Daarna werden 3 series van de twee opeenvolgende coupes, die door de fabrikant als positief werden geëvalueerd, naar Sciensano verstuurd, samen met de stalen die in de enquête naar de labo's gestuurd werden. De coupes werden bewaard bij verschillende temperaturen voor de hele duur van de enquête.

- i) Een eerste serie werd bewaard bij kamertemperatuur om de stabiliteit bij deze temperatuur tijdens een zending te garanderen.
- ii) Een tweede serie werd bewaard bij 4°C; dit is de temperatuur aangeraden door de firma voor de bewaring van coupes in het kader van IHC analyses.
- iii) Een laatste serie werd bewaard bij 30°C om de stabiliteit te garanderen zelfs wanneer de temperatuur tijdens de verzending hoger dan 25°C zou zijn.

De drie series van coupes werden bewaard bij deze verschillende temperaturen gedurende 1 maand en werden naar dezelfde expert verstuurd die de eerste coupes had ontvangen en geanalyseerd met zijn eigen ISH methode.

3 Stabiliteitstudie: Resultaten

3.1 EGFR

De resultaten tonen aan dat er geen impact was van de bewaringstemperatuur op de NGS analyse uitgevoerd door het expert laboratorium. Dit laboratorium heeft het staal als EGFR WT vastgesteld voor de 3 gevallen en het heeft de BRAF mutatie « NM_004333.4(BRAF):c.1799T>A (p.Val600Glu) » bij elke bewaartemperatuur wel degelijk teruggevonden. Het expertlaboratorium heeft een NGS methode gebruikt met de sequencer "Nextseq 550Dx" van Illumina en de kit "Qiaseq DNA custom panel" van Qiagen.

De kwaliteit van het staal was in elk geval goed : QC<0.04(gemiddeld QC= 0.024) en was gemeten met een qPCR methode en de automaat "ViiA7" van Thermofischer met de kit "Quant-iT dsDNA HS" van Qiagen.

De hoeveelheid geëxtraheerd DNA was gemiddeld 3ng/µl. Alleen van de coupes bewaard voor één maand aan 30°C en 5 dagen bij kamertemperatuur was de gemiddelde hoeveelheid geëxtraheerd DNA onder de 3ng/µl. De hoeveelheid geëxtraheerd DNA werd gemeten met een fluorometrie methode met de automaat "Qubit 3.0" van Thermofischer en de kit "Qubit dsDNA HS" ook van Thermofischer.

De grafiek hieronder toont de concentratie DNA die werd geëxtraheerd door het expertlaboratorium voor elke serie coupes in functie van de bewaartemperatuur.

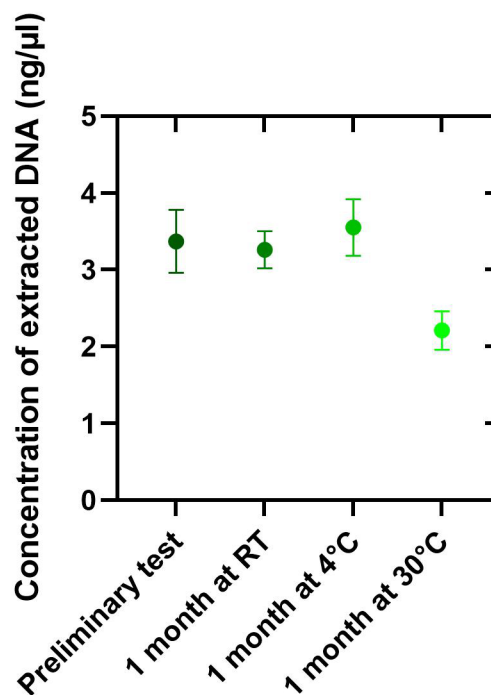


Chart 1 : Mediaan van de concentratie van het geëxtraheerd DNA voor elke series van coupes en van de interkwartielafstand.

3.2 HER2

Het expertlaboratorium heeft een automatische methode gebruikt met de automaat “BenchMark Ultra's” van Roche Diagnostics en de kit “INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail”, ook van Roche Diagnostics.

De resultaten tonen aan dat er geen impact van de bewaartemperatuur was op de ISH analyse uitgevoerd door het expert laboratorium. Dit laboratorium heeft het staal F10007534 vastgesteld als positief voor alle bewaartemperaturen. De ratio HER2/CEP17 was >4 voor de 3 series van coupes en clusters van meer dan 10 HER2 signalen/cellen werden gerapporteerd voor elke serie.

Het expertlaboratorium heeft besloten dat HER2 SISH zeer robuust is bij bewaring. In meer dan 90% van de celkernen zijn er immers goed telbare signalen gevonden voor de verschillende bewaaromstandigheden.

4 Conclusies

De stabiliteitstudies betreffende de stabiliteit van de FFPE coupes voor (i) een DNA extractie en een moleculaire NGS analyse en (ii) een ISH analyse die tijdens de enquêtes 2025/2 en 2025/3 uitgevoerd werden hebben aangetoond dat er geen impact was van de bewaringstemperatuur (KT, 4°C, 30°C) of van de tijdsduur tussen de ontvangst van de stalen door Sciensano en de afsluiting van de enquêtes (>1 maand). Inderdaad, de kwantiteit en kwaliteit van geëxtraheerd DNA voor de NGS analyse en de robuustheid van de HER2 signalen in het kader van de in situ hybridisatie werden namelijk niet zodanig beïnvloed dat de analyses niet konden worden uitgevoerd door de expertlaboratoria.

EINDE
