

NOTE DE SERVICE

MEMORANDUM

Date 2024-11-11

À : Tous les utilisateurs externes des laboratoires de la Pathologie et de la Génétique moléculaires du CUSM

To: All external users of Molecular Pathology and Molecular genetics of the MUHC

De/From: **Mohammed KADHIM**

Titre: (Intérim) Gestionnaire Microbiologie, Génétique Moléculaire et Cytogénétique

Title (Interim) Manager of Microbiology, Molecular Genetics and Cytogenetic

Objet : **Rejet des échantillons sur blocs FFIP envoyés pour les analyses moléculaires**

Subject: **Rejection of FFPE based samples sent to molecular testing**

Chers collègues,

Effectif à partir du 1^{er} Janvier 2025, afin de hausser notre efficacité de gestion des échantillons et réduire les risques pré-analytiques :

- 1) Les blocs FFIP ne seront plus acceptés au laboratoire de Diagnostic Moléculaire du CUSM - site Glen. Seul les échantillons coupés à l'avance, conforme à nos procédures, seront acceptés
- 2) Les lames H&E ne seront pas retournées comme stipulé sur notre requête.

Pour respecter la conformité des coupes de FFIP des tests moléculaires, il est impératif de travailler de façon à ne pas contaminer les échantillons entre eux (contamination croisée).

La conformité des coupes entre chaque échantillon doit suivre les consignes :

La lame de microtome doit être nettoyée avec un produit de type RNase AWAY. Ensuite, on procède à la coupe de

- BRCA : 10 scroll d'une épaisseur de 10 microns. <https://cusm.ca/sites/default/files/docs/m-Labs/brca-somatic-instruction-test-description-fr.pdf>
- RNA-seq : 10 scroll d'une épaisseur de 10 microns <https://muhc.ca/sites/default/files/docs/m-Labs/targeted-rnaseq-instruction-test-description-en.pdf>
- Ampliseq Focus Panel : 6 scroll d'une épaisseur de 5 microns <https://muhc.ca/sites/default/files/docs/m-Labs/ampliseq-focus-panel-test-information-instructions-en.pdf>

Quand l'échantillon a été déposé dans un tube *Eppendorf*, on nettoie le microtome avec le *RNase Away*. On peut alors procéder pour un second patient.

La feuille d'information de chaque test ainsi que la procédure pour couper les rubans de paraffine se trouvent dans le lien ci-bas et il est aussi ci-joint à ce mémo.

<https://cusm.ca/sites/default/files/docs/m-Labs/ampliseq-focus-panel-test-information-instructions-fr.pdf>

<https://cusm.ca/sites/default/files/docs/m-Labs/brca-somatic-instruction-test-description-fr.pdf>

<https://cusm.ca/sites/default/files/docs/m-Labs/targeted-rnaseq-instruction-test-description-fr.pdf>

Pour toutes questions veuillez contacter le laboratoire de Diagnostic Moléculaire du CUSM Site Glen au 514-934-1934 x24900

see below for English version

Dear colleagues,

Effective since January 1, 2025, to increase our sample management efficiency and reduce pre-analytical risks:

- 1) FFPE blocks will no longer be accepted at the MUHC Core Molecular Diagnostics Laboratory - Glen site. Only samples cut in advance, in accordance with our procedures, will be accepted.
- 2) H&E slides will not be returned as stipulated in our request.

To respect the conformity of the FFIP sections of molecular tests, it is imperative to work in such a way as not to contaminate the samples between them (cross-contamination).

The conformity of the cuts between each sample must follow the instructions:

The microtome blade must be cleaned with an RNase AWAY type product. Then we proceed to cut:

- BRCA: 10 scrolls with a thickness of 10 microns.
<https://cusm.ca/sites/default/files/docs/m-Labs/brca-somatic-instruction-test-description-fr.pdf>
- RNA-seq: 10 scrolls with a thickness of 10 microns <https://muhc.ca/sites/default/files/docs/m-Labs/targeted-rnaseq-instruction-test-description-en.pdf>
- Ampliseq Focus Panel: 6 scrolls with a thickness of 5 microns <https://muhc.ca/sites/default/files/docs/m-Labs/ampliseq-focus-panel-test-information-instructions-en.pdf>

When the sample has been placed in an Eppendorf tube, we clean the microtome with the RNase Away. We can then proceed for a second patient.

The information sheet for each test as well as the procedure for cutting the paraffin scrolls can be found in the link below and it is also attached to this memo.

<https://muhc.ca/sites/default/files/docs/m-Labs/ampliseq-focus-panel-test-information-instructions-en.pdf>

<https://muhc.ca/sites/default/files/docs/m-Labs/brca-somatic-instruction-test-description-en.pdf>

<https://muhc.ca/sites/default/files/docs/m-Labs/targeted-rnaseq-instruction-test-description-en.pdf>

For any questions please contact the Molecular Diagnostics laboratory of the MUHC Site Glen at 514-934-1934 x24900



AmpliSeq Focus Panel – Préparation et envoi des échantillons

Afin d'obtenir des acides nucléiques dont la qualité permet de garantir les résultats de l'*AmpliSeq Focus Panel*, il est important de respecter les conditions adéquates de l'**étape pré-analytique**, en particulier celles concernant la fixation et la préparation des échantillons.

1- Fixation:

Seule la fixation au **formol à 10 %** neutre tamponné durant 24 à 72 heures permet la préservation des acides nucléiques. Les autres fixateurs peuvent entraîner des faux négatifs et ne sont pas acceptés (liquide de Bouin/Hollande, B5, AZF, décalcification acide, etc). La sous ou la sur-fixation peut entraîner des résultats non optimaux.

2- Coupes au microtome:

Elles nécessitent un matériel propre afin d'éviter les contaminations croisées et les RNases. Le matériel à usage unique ou des pinces à bouts lisses nettoyés avec des anti-RNases (par exemple RNase Away™) sont encouragés.

- 1) Porter des gants et les changer fréquemment, en particulier entre les échantillons
- 2) Changer la lame du microtome pour chaque cas
- 3) Utiliser un matériel propre pour transférer les coupes (aiguille stérile pour transférer les *scrolls* dans le tube Eppendorf 1.5 ml)
- 4) Utilisation d'une plaque chauffante ou d'un bain marie propre (pour les lames non colorées)
- 5) Le matériel de support (lames, tubes) doit être correctement étiqueté (2 identifiants requis)

3- Préparation des échantillons:

Type	Instructions
Coupes FFPE*	<p>≥ 10% de cellules tumorales sur l'ensemble de la surface de l'échantillon est nécessaire (proportion de cellules tumorales viables sur l'ensemble des cellules nucléés).</p> <p>1) 10 coupes à 5-µm (minimum 5 coupes) dans un tube Eppendorf de 1.5 ml</p> <p>2) 1 lame H&E</p>
Lames blanches (non colorées) FFPE	<p>Indispensable pour la macrodissection quand les cellules tumorales <10%</p> <p>1) 6 lames blanches étiquetées à 5-µm d'épaisseur, non chauffées</p> <p>2) 1 lame H&E, la région tumorale entourée si les cellules tumorales <10%</p>

*FFPE: block de tissue fixé et inclus en paraffine. Si le % tumoral est supérieur à 10%, les scrolls sont préférés

Revisé par Dr. Gomez 23-10-26



AmpliSeq Focus Panel – Informations sur l'analyse

Indications

L'analyse permet de détecter la présence d'anomalies génomiques, ayant un rôle diagnostique, pronostique ou prédictif pour certaines thérapies ciblées dans un certain nombre de tumeurs solides (broncho-pulmonaire, colorectal, mélanomes, etc).

Méthodologie

L'*AmpliSeq Focus Panel* est un test de séquençage ciblé de nouvelle génération permettant l'analyse des régions dites "*hotspot*" dans 52 gènes d'intérêt pour les tumeurs solides. Ce panel permet l'étude simultanée et dans une même technique d'altérations génomiques associées aux tumeurs solides les plus fréquentes (broncho-pulmonaires, colorectales, etc). L'analyse parallèle de l'ADN et de l'ARN permet la détection des diverses altérations incluant : 1) des variations ponctuelles (SNV), 2) des petites insertions / délétions (indels), 3) des amplifications (augmentation du nombre de copies des gènes), et 4) des fusions de gènes. La liste des gènes analysés est détaillée ci-dessous. Merci de contacter le laboratoire pour toute information complémentaire.

Liste des gènes

ADN (variations " <i>hotspot</i> " et *amplifications)				
AKT1	EGFR*	FGFR4*	JAK3	MYCN*
ALK*	ERBB2*	GNA11	KIT*	NRAS
AR*	ERBB3	GNAQ	KRAS*	PDGFRA*
BRAF*	ERBB4	HRAS	MAP2K1	PIK3CA*
CCND1*	ESR1	IDH1	MAP2K2	RAF1
CDK4*	FGFR1*	IDH2	MET*	RET
CDK6*	FGFR2*	JAK1	MTOR	ROS1
CTNNB1	FGFR3*	JAK2	MYC*	SMO
DDR2				

ARN (fusions)				
ABL1	EGFR	ETV5	NTRK1	PPARG
ALK	ERBB2	FGFR1	NTRK2	RAF1
AKT3	ERG	FGFR2	NTRK3	RET
AXL	ETV1	FGFR3	PDGFRA	ROS1
BRAF	ETV4	MET		

Interprétation

Seules les altérations avec une signification clinique reconnue de nature diagnostique, thérapeutique ou pronostique sont rapportés (Tier I et II; PMID: 27993330). Des résultats additionnels peuvent être fournis à la demande.

Note: Les grandes délétions ne sont pas détectées.

Types d'échantillons acceptés

- Pourcentage de cellules **tumorales** $\geq 10\%$. L'information doit absolument nous être transmise, pour attester la validité du test.

- Matériel (cellulaire ou tissulaire), congelé ou fixé et inclus en paraffine (FFPE)

- Pour le FFPE: RUBANS OU LAMES BLANCHES uniquement seront acceptés

- Lames blanches: minimum de 5 coupes de 5 μm d'épaisseur sur des lames de verre non traitées par la chaleur et non chargées, avec 1 lame H&E (indiquant la zone tumorale d'intérêt si une procédure de macrodissection est envisagée).

La procédure est détaillée dans le document de préparation d'échantillons.

Limites

L'interprétation des résultats doit être faite en **connaissance de l'ensemble du contexte clinique, radiologique et histologique**. Si les résultats obtenus sont incohérents ou si vous avez de nouvelles informations pertinentes, merci de bien vouloir contacter le laboratoire dans les plus brefs délais pour une mise à jour de l'interprétation.

Les résultats peuvent être compromis si les procédures recommandées de préparation tissulaire n'ont pas été suivies.

Un résultat négatif n'exclut pas de façon formelle la présence d'une altération mais peut être lié aux limites de détection de ce test (% insuffisant de cellules tumorales par exemple).

De rares polymorphismes peuvent être présents et peuvent conduire à des faux négatifs ou positifs.

Délai des résultats: 10 jours ouvrables

Revisé Dr Gomez 23-10-26

BRCA Tumour Panel – Préparation et envoi des échantillons

Afin d'obtenir des acides nucléiques dont la qualité permet de garantir les résultats de le *BRCA Tumour Panel*, il est important de respecter les conditions adéquates de l'**étape pré-analytique**, en particulier celles concernant la fixation et la préparation des échantillons.

1- Fixation:

Seule la fixation au **formol à 10 %** neutre tamponné durant 24 à 72 heures permet la préservation des acides nucléiques. Les autres fixateurs peuvent entraîner des faux négatifs et ne sont pas acceptés (liquide de Bouin/Hollande, B5, AZF, décalcification acide, etc). La sous ou la sur-fixation peut entraîner des résultats non optimaux.

2- Coupes au microtome:

Elles nécessitent un matériel propre afin d'éviter les contaminations croisées et les RNases. Le matériel à usage unique ou des pinces à bouts lisses nettoyés avec des anti-RNases (par exemple RNase Away™) sont encouragés.

- 1) Porter des gants et les changer fréquemment, en particulier entre les échantillons
- 2) Changer la lame du microtome pour chaque cas
- 3) Utiliser un matériel propre pour transférer les coupes (aiguille stérile pour transférer les *scrolls* dans le tube Eppendorf 1.5 ml)
- 4) Utilisation d'une plaque chauffante ou d'un bain marie propre (pour les lames non colorées)
- 5) Le matériel de support (lames, tubes) doit être correctement étiqueté (2 identifiants requis)

3- Préparation des échantillons:

Type	Instructions
Scrolls FFIP*	Le CCT est le nombre de cellules tumorales nucléées viables proportionnellement au nombre total de cellules. <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 10% de contenu en cellules tumorales (CCT) sur toute la surface coupée est requis • 10 scrolls à 10 µm (minimum 5 rouleaux) dans un tube Eppendorf de 1,5 ml avec 2 identifiants de patients doivent être soumis. • 1 lame H&E
Lames blanches (non colorées) FFIP*	Requis pour la macrodissection lorsque le CCT global est <10 % <ul style="list-style-type: none"> • 6 lames blanches étiquetées à 10-µm d'épaisseur, non chauffées • 1 lame H&E, la région tumorale entourée si le CCT est <10%

(*):FFIP: block de tissu fixé en formol et inclus en paraffine.



BRCA Tumour Panel – Information sur l'analyse

Indications

Cette analyse détecte les anomalies génomiques des gènes *BRCA1* et *BRCA2* qui peuvent rendre le patient éligible à une thérapie ciblée avec des inhibiteurs de PARP. Cette analyse peut être demandée pour les patients atteints des types de tumeurs suivants:

- Sein (triple négatif, HER2 négatif, ER+ à haut risque, gBRCA-positif*)
- Ovaire (non mucineux de haut grade)
- Prostate (résistant à la castration)
- Pancréas (tous)

*Patients présentant une variation pathogène germinale du gène *BRCA1/2*

Méthodologie

Le *BRCA Tumour Panel* est un panel ciblé de séquençage de nouvelle génération pour l'analyse de l'entier des gènes *BRCA1* et *BRCA2*. Ce test analyse uniquement l'ADN et peut détecter plusieurs types d'altérations, notamment : (i) les variations de nucléotides simples (SNV), (ii) les petites insertions/délétions (indels), (iii) les variations du nombre de copies (délétions et duplications).

Gènes Testés

- *BRCA1*
- *BRCA2*

Interprétation

Seules les variations classées comme pathogènes ou probablement pathogènes selon les critères modifiés de l'ACMG sont rapportés (PMID : 25741868, <https://cspec.genome.network/cspec/ui/svi/affiliation/50087>). Des résultats additionnels peuvent être fournis à la demande. Ce test ne permet pas de déterminer avec certitude si une variation est présente dans la lignée germinale ou limitée à la tumeur.

Types d'échantillons acceptés

- **Pourcentage de cellules tumorales $\geq 10\%$** est requise. Cette information est obligatoire pour évaluer la validité du test.
- **Rubans** ou **lames blanches** provenant d'échantillons fixés au formol et inclus en paraffine (FFIP) (cytologie ou histologie) sont acceptés.
- Les blocs FFIP ne sont PAS acceptés
- Rubans : **Dix** rubans à **10 μ m**
- Lames blanches: minimum de 5 lames étiquetées de 10 μ m d'épaisseur sur des lames de verre non traitées par la chaleur et non chargées, avec 1 lame H&E (la zone tumorale doit être délimitée avec un marqueur permanent si une macrodissection est nécessaire).
- La procédure complète est détaillée dans le document *Preparation and Shipping Guidelines*.

Limites

L'interprétation des résultats doit être faite en connaissance de l'ensemble du contexte clinique, radiologique et histologique. Si les résultats obtenus sont incohérents ou si vous avez de nouvelles informations pertinentes, merci de bien vouloir contacter le laboratoire dans les plus brefs délais pour une mise à jour de l'interprétation.

Les résultats peuvent être compromis si les procédures recommandées de préparation tissulaire n'ont pas été suivies.

Un résultat négatif n'exclut pas de façon formelle la présence d'une altération mais peut être lié aux limites de détection de ce test (% insuffisant de cellules tumorales par exemple).

La détection des CNV ne peut être garantie si le pourcentage de cellule tumorale est $<40\%$.

Délai des résultats: 4-6 semaines



Targeted RNAseq Panel – Information sur l'analyse

Indications

Cette analyse détecte les translocations, les fusions, les sauts d'exons, les duplications internes en tandem et les variations de séquence dans certains oncogènes (voir la liste des gènes) pouvant avoir des implications diagnostiques, pronostiques ou thérapeutiques pour les patients atteints de certains types de tumeurs (voir ci-dessous). Cette analyse peut être demandée pour les patients atteints des types de tumeurs suivants :

- Sarcomes
- Cholangiocarcinomes
- Tumeurs cérébrales
- Tumeurs solides rares
- Certaines hémopathies malignes

Méthodologie

Le panel *Targeted RNASeq* est un panel de capture de séquençage ciblé de nouvelle génération pour l'analyse d'une liste ciblée de gènes pertinents pour certains types de tumeurs. Ce test analyse uniquement l'ARN et peut détecter plusieurs types d'altérations, notamment (i) les translocations/fusions, (ii) les duplications internes en tandem, (iii) les variations mononucléotidiques (SNV), les petites insertions/délétions (indels) et (iv) les altérations qui provoquent un saut d'exon.

Interprétation

Seules les variations ayant une signification clinique diagnostique, pronostique ou thérapeutique reconnue ou prédictive sont rapportées (niveaux I et II ; PMID : 27993330). Des résultats supplémentaires peuvent être fournis sur demande. Ce test ne permet pas de déterminer avec certitude si une variation est présente dans la lignée germinale ou limitée à la tumeur.

Types d'échantillons acceptés

- **Pourcentage de cellules tumorales $\geq 20\%$** est requis. Cette information est obligatoire pour évaluer la validité du test.

De préférence :

- **Tissu congelé** : au minimum 30 mg de tissu sur glace sèche
- **Tissu frais sur RNAlater** : au minimum 30 mg de tissu

Si du tissu frais/congelé n'est pas disponible:

- **Les blocs FFIP** ne sont PAS acceptés
- **Rubans ou lames blanches** des échantillons FFIP (cytologie ou histologie) sont acceptés.

Rubans: Dix rubans à **10 μ m**

Lames blanches: minimum 10 lames étiquetées de 10 μ m d'épaisseur, lames de verre non traitées par la chaleur et non chargées, avec 1 lame H&E (la zone tumorale doit être délimitée avec un marqueur permanent si une macrodissection est nécessaire).

- La procédure complète est détaillée dans le document *Préparation et envoi des échantillons*.

Limites

L'interprétation des résultats doit être faite en connaissance de l'ensemble du contexte clinique, radiologique et histologique. Si les résultats obtenus sont incohérents ou si vous avez de nouvelles informations pertinentes, merci de bien vouloir contacter le laboratoire dans les plus brefs délais pour une mise à jour de l'interprétation.

Les résultats peuvent être compromis si les procédures recommandées de préparation tissulaire n'ont pas été suivies.

Un résultat négatif n'exclut pas de façon formelle la présence d'une altération mais peut être lié aux limites de détection du test (% insuffisant de cellules tumorales, par exemple).

Délai pour les résultats: 15 jours ouvrables



LISTE DES GÈNES

Fusions de gènes actionnables

ABL1	ALK	ATF1	AXL	BCL2	BCL6	BCR	BRAF	BRCA1	BRCA2
CBFB	CD74	EGFR	EIF3E	EML4	ERBB2	ERG	ESR1	ETV4	EWSR1
FGFR1	FGFR2	FGFR3	FGFR4	FIP1L1	FL1	KMT2A	MAST1	MET	MYC
MYH11	NFKB2	NOTCH1	NRG1	NTRK1	NTRK2	NTRK3	PAX8	PDGFRA	PDGFRB
PML	PPARG	PTPRK	QKI	RAF1	RARA	RET	ROS1	RSPO2	RSPO3
RUNX1	TERT	TMPRSS2							

Fusions de gènes cliniquement pertinentes

ABCC4	ABI1	ABL2	ACACA	ACE	ACER1	ACKR3	ACSL6	ADD3	AFF1
AFF3	AFF4	AGR3	AHI1	AHRR	AKAP12	AKT3	ANKRD28	AR	ARHGAP20
ARHGAP26	ARNT	ASPSCR1	ASTN2	ATIC	ATP1B4	ATXN1	AUTS2	BACH2	BAG4
BAIAP2L1	BAZ2A	BCAS3	BCAS4	BCL10	BCL11A	BCL11B	BCL2L1	BCL3	BCL9
BCOR	BDNF	BICC1	BIRC3	BIRC6	BRD1	BRD3	BRD4	BRWD3	BTBD18
BTG1	C11orf1	C11orf95	C2CD2L	C3orf27	CAMTA1	CAPRIN1	CARS	CASC5	CASP7
CBFA2T3	CBL	CCAR2	CCDC28A	CCDC6	CCDC88C	CCNB1IP1	CCNB3	CCND1	CCND2
CCND3	CDH11	CDK5RAP2	CDK6	CDX1	CDX2	CEBPA	CEBPB	CEBPD	CEBPE
CEP170B	CEP85L	CHD6	CHIC2	CHMP2B	CHST11	CIC	CIITA	CLP1	CLTC
CLTCL1	CMKLR1	CNBP	CNOT2	CNTRL	COG5	COL1A1	COL1A2	COL6A3	COX6C
CPSF6	CRADD	CREB1	CREB3L1	CREB3L2	CREBBP	CRLF2	CRTC1	CSF1	CSF1R
CTDSP2	CTNNB1	CUX1	DAB2IP	DACH1	DACH2	DDIT3	DDX10	DDX20	DEK
DMRT1	DNAJB1	DNASE2	DPM1	DUSP22	DUX4	EBF1	ECHDC1	EEFSEC	EGR1
EGR2	EGR3	EGR4	EIF4A2	ELF4	ELK4	ELL	ELN	EML1	EP300
EP400	EPC1	EPOR	EPS15	ERBB3	ERC1	ERCC1	ERLIN2	ETS1	ETV1
ETV5	ETV6	EZR	FAM19A2	FCGR2B	FCRL4	FEN1	FEV	FGF8	FGFR1OP
FGFR1OP2	FGR	FHIT	FLNA	FLT3	FLT3LG	FNBP1	FOSB	FOSL1	FOXO1
FOXO4	FOXP1	FRK	FRYL	FUS	GAS5	GAS7	GATA1	GATAD2A	GIT2
GLI1	GORASP2	GOSR1	GOT1	GPR107	GPR128	GPR34	GRHPR	GRID1	GTF2I
H2AFX	HAS2	HEY1	HHEX	HIP1	HIPK1	HIST1H4I	HLF	HMGA2	HNF1A
HOXA10	HOXA11	HOXA13	HOXA9	HOXC11	HOXC13	HOXD11	HOXD13	HSP90AA1	ID4
IKZF1	IL2	IL21R	IL3	INPP5D	INSR	IQCG	IRF2BP2	IRF4	IRS4
ITK	JAK1	JAK2	JAZF1	KANK1	KAT6A	KAT6B	KDM5A	KIAA1524	KIF5B
KPNB1	KSR1	LASP1	LCK	LCP1	LGR5	LHFP	LHX2	LHX4	LINC00598
LINC00982	LMBRD1	LMO1	LMO2	LNP1	LPP	LPXN	LRMP	LRRC37B	LTBP1
LYL1	LYN	MACROD1	MAFB	MALT1	MAML2	MAPRE1	MAST2	MBNL1	MBTD1
MAF	MDS2	MEAF6	MECOM	MEF2D	MGEA5	MKL1	MKL2	MLF1	MLLT1
MLLT10	MLLT11	MLLT3	MLLT4	MLLT6	MN1	MNX1	MSI2	MSMB	MSN
MTCP1	MTHFD1L	MUC1	MUSK	MUTYH	MYB	MYBL1	MYH9	MYO18A	MYO1F
NAB2	NAPA	NBEAP1	NBR1	NCOA1	NCOA2	NCOA3	NCOA4	NDE1	NF1
NFATC2	NFIB	NGF	NGFR	NIN	NIPBL	NKX2-5	NONO	NOTCH2	NPM1
NR4A3	NR6A1	NSD1	NT5C2	NTF3	NTF4	NUMA1	NUMBL	NUP107	NUP214
NUP98	NUTM1	NUTM2A	NUTM2B	OFD1	OLIG2	OLR1	OMD	P2RY8	PAPPA
PATZ1	PAX3	PAX5	PAX7	PBX1	PCM1	PDE4DIP	PDGFB	PER1	PHF1
PHF23	PHIP	PICALM	PIK3CA	PIM1	PKM	PKN1	PLAG1	POM121	POU2AF1
POU5F1	PPAP2B	PPARGC1A	PPFIBP1	PPP2R1B	PRCC	PRDM16	PRKACA	PRKAR1A	PRKCA
PRKCB	PRKG2	PRRX2	PSIP1	PSMD2	PTPRR	PVT1	RABEP1	RAD51B	RANBP2
RAP1GDS1	RBM15	RBM6	RCOR1	RCS1	RELA	RHOH	RNF213	RPL22	RPN1
RREB1	RRM1	RTEL1	RUNX1T1	SARNP	SEC31A	SEPT2	SEPT5	SEPT6	SEPT9
SERPINE1	SERPINF1	SET	SETBP1	SFPQ	SH3D19	SH3GL1	SIK3	SLC34A2	SLC45A3
SLCO1B3	SMAP1	SMARCA5	SMARCB1	SNHG5	SORBS2	SORT1	SP3	SPDYE4	SPECC1
SPTBN1	SQSTM1	SRF	SRSF3	SS18	SS18L1	SSBP2	SSX1	SSX2	SSX4
ST6GAL1	STAT5B	STAT6	STRN	SUGP2	SUZ12	SYK	TACC1	TACC2	TACC3
TAF15	TAF6L	TAL1	TAL2	TAOK1	TBX15	TCF12	TCF3	TCL1A	TCTA
TEAD1	TEAD2	TEAD3	TEAD4	TEC	TENM1	TET1	TFE3	TFEB	TFG
TFPT	TFRC	TGFBR3	THADA	THRAP3	TIRAP	TLX1	TLX3	TMEM66	TNFRSF17
TOP1	TOP2B	TP53BP1	TPM3	TPM4	TP63	TRHDE	TRIM24	TRIP11	TRPS1
USP16	USP42	USP6	VGLL3	WASF2	WDR18	WDR70	WHSC1	WHSC1L1	WSB1
WT1	WWTR1	XIAP	YAP1	YTHDF2	YWHAE	ZBTB16	ZC3H7A	ZC3H7B	ZFP64
ZFPM2	ZFYVE19	ZMIZ1	ZMYM2	ZMYND11	ZNF207	ZNF384	ZNF444	ZNF521	ZNF585B
ZNF687	ZNF84								

Gènes pour les appels de variations (hotspots sélectionnés)

ACVR1	ALK	BRAF	BCOR	CTNNB1	EGFR	FGFR1	FGFR2	FGFR3	H3-3A
H3-C2	H3-C3	HRAS	IDH1	IDH2	KIT	KRAS	NRAS	PDGFRA	PIK3CA
TP53									

Gènes pour les répétitions internes en tandem

BCOR	BRAF	CEBPA	EGFR	FGFR1	FLT3	KIT	WT1		
------	------	-------	------	-------	------	-----	-----	--	--

Révisé et approuvé par Dr. Gomez 2024-05-01

MUHC Glen site E05-5051

1001, boulevard Décarie, ■ Montréal (Québec) ■ H4A 3J1 ■ (514) 934-1934 24900



AmpliSeq Focus Panel – Preparation and Shipping Guidelines

The quality of the *AmpliSeq Focus Panel* result depends on the following **critical pre-analytical steps** in order to obtain high-quality nucleic acids. This includes fixation, microtome section preparation, specimen preparation and shipping.

1. Fixation:

Fixation of the specimen with only **10% neutral-buffered formalin**, for a period of 24–72 hours, allows preservation of nucleic acids. Other fixatives may lead to false negative results and are **not** accepted (e.g. Bouin, B5, AZF, Holland's or strong acid decalcification procedures). Under fixation or over fixation can lead to suboptimal results.

2. Microtome Section Preparation:

Ribonucleases (RNases), which is present ubiquitously (eg. normal human skin), can destroy nucleic acids. Careful preparation and clean material are necessary to avoid cross contamination and RNases. Disposable material and smooth tip tweezers cleaned with an ANTI-RNase product (eg. RNase Away™) are encouraged.

- 1) Wear gloves and change them frequently, especially between specimens
- 2) Change the microtome blade for each case
- 3) Use clean instruments to transfer the sections (i.e. sterile needle to transfer the scrolls into clean 1.5 ml Eppendorf tubes)
- 4) Use hot plate or a clean water bath (for unstained slides)
- 5) All material (tube, slides) must be adequately labelled (two patient identifiers)

3. Specimen Preparation:

Specimen type	Requirements
Scrolls FFPE*	<p>≥ 10% of tumor cell content (TCC) in the whole cut surface is required. TCC is the number of viable nucleated tumor cells in proportion to the total number of cells.</p> <p>1) 10 scrolls at 5-µm (minimum 5 scrolls) in a labelled 1.5 ml Eppendorf tube</p> <p>2) 1 H&E slide</p>
Unstained Slides FFPE	<p>Required for microdissection when TCC <10%</p> <p>1) 6 unstained labelled slides at 5-µm thickness, uncharged and unbaked</p> <p>2) 1 H&E slide, pointed for tumor area if tumor content < 10%</p>

*FFPE: Formalin-fixed paraffin-embedded. When the tumor cell content (TCC) ≥ 10%, scrolls are preferred.

AmpliSeq Focus Panel – Test Information

Indications for ordering

This test allows the detection of genomic abnormalities with a diagnosis, prognosis or predictive role in diverse solid tumours (e.g. lung, lower GI, melanoma).

Test Methodology

The *AmpliSeq Focus Panel* is a targeted next generation sequencing assay for analysis of hotspot regions in 52 genes with known relevance to solid tumours. The panel enables the simultaneous analysis of genes associated with several most common cancers (e.g. lung, colon). The DNA and RNA analysis can detect multiple alterations including: (i) single nucleotide variants (SNVs), (ii) small insertion / deletions (indels), (iii) copy number gains and (iv) gene fusions in RNA samples. See below for gene list. For more information on the hotspot regions tested, please contact the laboratory.

Gene List

DNA (hotspot variations and *amplifications)				
AKT1	EGFR*	FGFR4*	JAK3	MYCN*
ALK*	ERBB2*	GNA11	KIT*	NRAS
AR*	ERBB3	GNAQ	KRAS*	PDGFRA*
BRAF*	ERBB4	HRAS	MAP2K1	PIK3CA*
CCND1*	ESR1	IDH1	MAP2K2	RAF1
CDK4*	FGFR1*	IDH2	MET*	RET
CDK6*	FGFR2*	JAK1	MTOR	ROS1
CTNNB1	FGFR3*	JAK2	MYC*	SMO
DDR2				

RNA (fusions)				
ABL1	EGFR	ETV5	NTRK1	PPARG
ALK	ERBB2	FGFR1	NTRK2	RAF1
AKT3	ERG	FGFR2	NTRK3	RET
AXL	ETV1	FGFR3	PDGFRA	ROS1
BRAF	ETV4	MET		

Test Interpretation

Only variants with a recognized clinical significance, diagnostic, prognostic or predictive are reported (Tier I and II; PMID: 27993330). Additional results are available upon request.

Note: This test does not detect large deletions.

Type of specimens accepted

- Tumour cell content $\geq 10\%$ is required. This information is mandatory to assess the validity of the test.
- Specimen (cytology or histology), frozen or formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) are accepted.
- For FFPE: only SCROLLS or UNSTAINED SLIDES are accepted.
- Unstained slides: a minimum of 5 sections of 5 μm thickness non-baked and uncharged, with 1 H&E slide (tumour area should be outlined with permanent marker if macrodissection is needed).

The full procedure is detailed in the document Preparation and Shipping Guidelines.

Limitations

Results must be interpreted in the **context of clinical, radiological and histological findings**. If results obtained do not match other clinical or laboratory findings, or if you have novel relevant information, please contact the laboratory as soon as possible for updated interpretation.

Results may be compromised if the recommended procedures (tissue fixation and preparation) have not been followed.

A negative (wild type) result does not fully rule out the presence of an alteration but may be linked with limits of detection of this assay (i.e. insufficient % of tumour cell content or poor fixation).

Rare polymorphisms may be present that could lead to false-negative or false-positive results.

Turnaround time: 10 working days

Revised & approved by Dr. Gomez 23-10-26



BRCA Tumour Panel – Sample Preparation and Shipping Guidelines

The quality of the *BRCA Tumour Panel* result depends on the following **critical pre-analytical steps** in order to obtain high-quality nucleic acids. This includes fixation, microtome section preparation, specimen preparation and shipping.

1. Fixation:

Fixation of the specimen with only **10% neutral-buffered formalin**, for a period of 24–72 hours, allows preservation of nucleic acids. Other fixatives may lead to false negative results and are not accepted (e.g. Bouin, B5, AZF, Holland's or strong acid decalcification procedures). Under fixation or over fixation can lead to suboptimal results.

2. Microtome Section Preparation:

Ribonucleases (RNases), which is present ubiquitously (e.g. normal human skin), can destroy nucleic acids. Careful preparation and clean material are necessary to avoid cross contamination and RNases. Disposable material and smooth tip tweezers cleaned with an ANTI-RNase product (eg. RNase Away™) are encouraged.

- Wear gloves and change them frequently, especially between specimens
- Change the microtome blade for each case
- Use clean instruments to transfer the sections (i.e. sterile needle to transfer the scrolls into clean 1.5 ml Eppendorf tubes)
- Use hot plate or a clean water bath (for unstained slides)
- All material (tube, slides) must be adequately labelled (two patient identifiers)

3. Specimen Preparation:

<i>Specimen type</i>	<i>Requirements</i>
Scrolls FFPE*	TCC is the number of viable nucleated tumour cells in proportion to the total number of cells. <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 10% of tumour cell content (TCC) in the whole cut surface is required. • 10 scrolls at 10-µm (minimum 5 scrolls) in a 1.5 ml Eppendorf tube with 2 patients' identifiers should be submitted • 1 H&E slide
Unstained Slides FFPE*	Required for macrodissection when overall TCC <10% <ol style="list-style-type: none"> 1) 6 unstained labelled slides at 10-µm thickness, uncharged and unbaked 2) 1 H&E slide, pointed for tumour area if TCC < 10%

(*) FFPE: Formalin-fixed paraffin-embedded.

Revised 23-10-26



BRCA Tumour Panel – Test Information

Indications for ordering

This test detects genomic abnormalities in the *BRCA1* and *BRCA2* genes that may give the patient eligibility for targeted therapy with PARP inhibitors. This test may be ordered for patients with the following tumour types:

- Breast (Triple-negative, HER2-negative, high-risk ER+, gBRCA-positive*)
- Ovarian (High-grade non-mucinous)
- Prostate (Castration-resistant)
- Pancreas (all)

*Patients with a germline *BRCA1/2* pathogenic variant

Test Methodology

The *BRCA Tumour Panel* is a targeted next generation sequencing capture panel for analysis of the entire *BRCA1* and *BRCA2* genes. This test only analyzes DNA and can detect multiple types of alterations including: (i) single nucleotide variants (SNVs), (ii) small insertion/deletions (indels), (iii) copy number variants (deletions and duplications).

Genes Tested

- *BRCA1*
- *BRCA2*

Test Interpretation

Only variants classified as Pathogenic or Likely pathogenic according to modified ACMG criteria are reported (PMID: 25741868, <https://cspec.genome.network/cspec/ui/svi/affiliation/50087>). Additional results are available upon request. This test cannot definitively determine whether a variant is present in the germline or restricted to the tumour.

Specimens accepted

- **Tumour cellularity $\geq 10\%$** is required. This information is mandatory to assess the validity of the test.
- **Scrolls or unstained slides** from Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) specimens (cytology or histology) are accepted
- **FFPE blocks** are NOT accepted
- **Scrolls: Ten scrolls at 10um**
- **Unstained slides:** 5 unstained labelled slides of 10 μm thickness, unbaked and uncharged, with 1 H&E slide (tumour area should be outlined with permanent marker if macrodissection is needed).
- The full procedure is detailed in the document "*Sample Preparation and Shipping Guidelines*".

Limitations

Results must be interpreted in the context of clinical, radiological and histological findings. If results obtained do not match other clinical or laboratory findings, or if you have novel relevant information, please contact the laboratory as soon as possible for updated interpretation.

Results may be compromised if the recommended procedures (tissue fixation and preparation) have not been followed. A negative result does not fully rule out the presence of an alteration and may be due to the limitations of this assay (i.e. insufficient % of tumour cell content or poor fixation).

CNV detection cannot be guaranteed if the tumour cellularity is $<40\%$

Turnaround time: 4-6 weeks



Targeted RNASeq Panel – Test Information

Indications for ordering

This test detects translocations/fusions, exon skipping, internal tandem duplications, and sequence variants in select oncogenes (see **Gene list**) that may have diagnostic, prognostic, or therapeutic implications for patients with certain tumour types (see below). This test may be ordered for patients with the following tumour types:

- Sarcomas
- Cholangiocarcinomas
- Brain tumours
- Rare solid tumours
- Certain hematological malignancies

Test Methodology

The *Targeted RNASeq panel* is a targeted next generation sequencing capture panel for analysis of a targeted list of genes, relevant to certain tumour types. This test only analyzes RNA and can detect multiple types of alterations, including (i) translocations/fusions, (ii) internal tandem duplications, (iii) single nucleotide variants (SNVs) and small insertion/deletions (indels), (iv) alterations that cause exon skipping.

Test Interpretation

Only variants with a recognized or predictive diagnostic, prognostic or therapeutic clinical significance are reported (Tier I and II; PMID: 27993330). Additional results are available upon request. This test cannot definitively determine whether a variant is present in the germline or restricted to the tumour.

Specimens accepted

- **Tumour cellularity $\geq 20\%$** is required. This information is mandatory to assess the validity of the test.

Preferentially:

- **Frozen tissue** minimally 30 mg of tissue on dry ice
- **Fresh tissue** on RNA later minimally 30 mg of tissue

If no fresh/frozen tissue is available:

- **FFPE blocks** are NOT accepted
- **Scrolls or unstained slides** from Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) specimens (cytology or histology) are accepted

Scrolls: Ten scrolls at 10um

Unstained slides: 10 unstained labelled slides of 10 μm thickness, unbaked and uncharged, with 1 H&E slide (tumour area should be outlined with permanent marker if macrodissection is needed).

- The full procedure is detailed in the document "*Sample Preparation and Shipping Guidelines*".

Limitations

Results must be interpreted in the context of clinical, radiological and histological findings. If results obtained do not match other clinical or laboratory findings, or if you have novel relevant information, please contact the laboratory as soon as possible for updated interpretation.

Results may be compromised if the recommended procedures (tissue fixation and preparation) have not been followed.

A negative result does not fully rule out the presence of an alteration and may be due to the limitations of this assay (i.e. insufficient % of tumour cell content or poor fixation).

Turnaround time: 15 working days



GENE LIST

Actionable Genes Fusions									
ABL1	ALK	ATF1	AXL	BCL2	BCL6	BCR	BRAF	BRCA1	BRCA2
CBFB	CD74	EGFR	EIF3E	EML4	ERBB2	ERG	ESR1	ETV4	EWSR1
FGFR1	FGFR2	FGFR3	FGFR4	FIP1L1	FLI1	KMT2A	MAST1	MET	MYC
MYH11	NFKB2	NOTCH1	NRG1	NTRK1	NTRK2	NTRK3	PAX8	PDGFRA	PDGFRB
PML	PPARG	PTPRK	QKI	RAF1	RARA	RET	ROS1	RSPO2	RSPO3
RUNX1	TERT	TMPPRSS2							
Clinically Relevant Genes Fusions									
ABCC4	ABI1	ABL2	ACACA	ACE	ACER1	ACKR3	ACSL6	ADD3	AFF1
AFF3	AFF4	AGR3	AHI1	AHRR	AKAP12	AKT3	ANKRD28	AR	ARHGAP20
ARHGAP26	ARNT	ASPSCR1	ASTN2	ATIC	ATP1B4	ATXN1	AUTS2	BACH2	BAG4
BAIAP2L1	BAZ2A	BCAS3	BCAS4	BCL10	BCL11A	BCL11B	BCL2L1	BCL3	BCL9
BCOR	BDNF	BICC1	BIRC3	BIRC6	BRD1	BRD3	BRD4	BRWD3	BTBD18
BTG1	C11orf1	C11orf95	C2CD2L	C3orf27	CAMTA1	CAPRIN1	CARS	CASC5	CASP7
CBFA2T3	CBL	CCAR2	CCDC28A	CCDC6	CCDC88C	CCNB1IP1	CCNB3	CCND1	CCND2
CCND3	CDH11	CDK5RAP2	CDK6	CDX1	CDX2	CEBPA	CEBPB	CEBPD	CEBPE
CEP170B	CEP85L	CHD6	CHIC2	CHMP2B	CHST11	CIC	CIITA	CLP1	CLTC
CLTCL1	CMKLR1	CNBP	CNOT2	CNTRL	COG5	COL1A1	COL1A2	COL6A3	COX6C
CPSF6	CRADD	CREB1	CREB3L1	CREB3L2	CREBBP	CRLF2	CRTC1	CSF1	CSF1R
CTDSP2	CTNNB1	CUX1	DAB2IP	DACH1	DACH2	DDIT3	DDX10	DDX20	DEK
DMRT1	DNAJB1	DNASE2	DPM1	DUSP22	DUX4	EBF1	ECHDC1	EEFSEC	EGR1
EGR2	EGR3	EGR4	EIF4A2	ELF4	ELK4	ELL	ELN	EML1	EP300
EP400	EPC1	EPOR	EPS15	ERBB3	ERC1	ERCC1	ERLIN2	ETS1	ETV1
ETV5	ETV6	EZR	FAM19A2	FCGR2B	FCRL4	FEN1	FEV	FGF8	FGFR10P
FGFR10P2	FGR	FHIT	FLNA	FLT3	FLT3LG	FNBP1	FOSB	FOSL1	FOXO1
FOXO4	FOXP1	FRK	FRYL	FUS	GAS5	GAS7	GATA1	GATAD2A	GIT2
GLI1	GORASP2	GOSR1	GOT1	GPR107	GPR128	GPR34	GRHRP	GRID1	GTF2I
H2AFX	HAS2	HEY1	HHEX	HIP1	HIPK1	HIST1H4I	HLF	HMGA2	HNF1A
HOXA10	HOXA11	HOXA13	HOXA9	HOXC11	HOXC13	HOXD11	HOXD13	HSP90AA1	ID4
IKZF1	IL2	IL21R	IL3	INPP5D	INSR	IQCG	IRF2BP2	IRF4	IRS4
ITK	JAK1	JAK2	JAZF1	KANK1	KAT6A	KAT6B	KDM5A	KIAA1524	KIF5B
KPNB1	KSR1	LASP1	LCK	LCP1	LGR5	LHFP	LHX2	LHX4	LINC00598
LINC00982	LMBRD1	LMO1	LMO2	LNP1	LPP	LPXN	LRMP	LRRC37B	LTBP1
LYL1	LYN	MACROD1	MAFB	MALT1	MAML2	MAPRE1	MAST2	MBNL1	MBTD1
MAF	MDS2	MEAF6	MECOM	MEF2D	MGEA5	MKL1	MKL2	MLF1	MLLT1
MLLT10	MLLT11	MLLT3	MLLT4	MLLT6	MN1	MNX1	MSI2	MSMB	MSN
MTCP1	MTHFD1L	MUC1	MUSK	MUTYH	MYB	MYBL1	MYH9	MYO18A	MYO1F
NAB2	NAPA	NBEAP1	NBR1	NCOA1	NCOA2	NCOA3	NCOA4	NDE1	NF1
NFATC2	NFIB	NGF	NGFR	NIN	NIPBL	NKX2-5	NONO	NOTCH2	NPM1
NR4A3	NR6A1	NSD1	NT5C2	NTF3	NTF4	NUMA1	NUMBL	NUP107	NUP214
NUP98	NUTM1	NUTM2A	NUTM2B	OFD1	OLIG2	OLR1	OMD	P2RY8	PAPPA
PATZ1	PAX3	PAX5	PAX7	PBX1	PCM1	PDE4DIP	PDGFB	PER1	PHF1
PHF23	PHIP	PICALM	PIK3CA	PIM1	PKM	PKN1	PLAG1	POM121	POU2AF1
POU5F1	PPAP2B	PPARGC1A	PPFIBP1	PPP2R1B	PRCC	PRDM16	PRKACA	PRKAR1A	PRKCA
PRKCB	PRKG2	PRRX2	PSIP1	PSMD2	PTPRR	PVT1	RABEP1	RAD51B	RANBP2
RAP1GDS1	RBM15	RBM6	RCOR1	RCSD1	RELA	RHOH	RNF213	RPL22	RPN1
RREB1	RRM1	RTEL1	RUNX1T1	SARNP	SEC31A	SEPT2	SEPT5	SEPT6	SEPT9
SERPINE1	SERPINF1	SET	SETBP1	SFPQ	SH3D19	SH3GL1	SIK3	SLC34A2	SLC45A3
SLCO1B3	SMAP1	SMARCA5	SMARCB1	SNHG5	SORBS2	SORT1	SP3	SPDYE4	SPECC1
SPTBN1	SQSTM1	SRF	SRSF3	SS18	SS18L1	SSBP2	SSX1	SSX2	SSX4
ST6GAL1	STAT5B	STAT6	STRN	SUGP2	SUZ12	SYK	TACC1	TACC2	TACC3
TAF15	TAF6L	TAL1	TAL2	TAOK1	TBX15	TCF12	TCF3	TCL1A	TCTA
TEAD1	TEAD2	TEAD3	TEAD4	TEC	TENM1	TET1	TFE3	TFEB	TFG
TFPT	TFRC	TGFBR3	THADA	THRAP3	TIRAP	TLX1	TLX3	TMEM66	TNFRSF17
TOP1	TOP2B	TP53BP1	TPM3	TPM4	TP63	TRHDE	TRIM24	TRIP11	TRPS1
USP16	USP42	USP6	VGLL3	WASF2	WDR18	WDR70	WHSC1	WHSC1L1	WSB1
WT1	WWTR1	XIAP	YAP1	YTHDF2	YWHAE	ZBTB16	ZC3H7A	ZC3H7B	ZFP64
ZFPM2	ZFYVE19	ZMIZ1	ZMYM2	ZMYND11	ZNF207	ZNF384	ZNF444	ZNF521	ZNF585B
ZNF687	ZNF84								
Genes for variant calling (selected hotspots)									
ACVR1	ALK	BRAF	BCOR	CTNNB1	EGFR	FGFR1	FGFR2	FGFR3	H3-3A
H3-C2	H3-C3	HRAS	IDH1	IDH2	KIT	KRAS	NRAS	PDGFRA	PIK3CA
TP53									
Genes for Internal Tandem Repeats									
BCOR	BRAF	CEBPA	EGFR	FGFR1	FLT3	KIT	WT1		

Revised and approved by Dr. Gomez 2024-05-01

MUHC Glen site E05-5051

1001, boulevard Décarie, ■ Montréal (Québec) ■ H4A 3J1 ■ (514) 934-1934 24900