

## PCR Idylla mutatieanalyse

<b>Document type:</b>	Laboratoriumgids / LG	<b>Document subtype:</b>	.
<b>Doelgroep:</b>	Labo PO	<b>Subdoelgroep:</b>	.
<b>Auteur:</b>	Elke Wevers	<b>Keurder:</b>	Peter Van Eyken
<b>Geldig van:</b>	22/10/2020	<b>Geldig tot:</b>	22/10/2023
<b>Document-nr:</b>	<a href="#">PO-LG4-0042</a>	<b>Versie-nr:</b>	1.0
<b>Campus:</b>	Alle	<b>Bekrachtiger</b>	Karen Deraedt

### Inhoud

1	Type aanvraagformulier .....	2
2	Uitvoerfrequentie .....	2
3	Antwoordtijd .....	2
4	Afname instructies .....	2
5	Staaltype en minimale hoeveelheid .....	2
6	Transport .....	2
7	Methode .....	3
7.1	Uitvoeren van de test .....	3
7.2	Mutatie test per tumortype: .....	3
7.3	Volgende testen zijn beschikbaar: .....	3
8	Rapportering .....	5

## 1 Type aanvraagformulier

De aanvraag voor PCR Idylla mutatieanalyse dient te gebeuren via het [Aanvraagformulier Farmacodiagnostisch en moleculair onderzoek](#) PO-FOR4-0005

- af te printen op papier via de website (<https://www.zol.be/pathologische-ontleedkunde>)
- of in te vullen via het elektronisch patiëntendossier (EPD) in HIX. Dit formulier is in te vullen, af te printen en af te tekenen door de aanvragende arts (enkel interne artsen ZOL).

## 2 Uitvoerfrequentie

- Iedere werkdag van maandag tot en met vrijdag.

## 3 Antwoordtijd

- De tijd tussen ontvangst van het staal en het rapport van mutatie-analyse bedraagt maximaal 5 werkdagen.
- Bij nood aan intern overleg of bij testen die om technische redenen herhaald moeten worden, kan de antwoordtijd oplopen.
- Rapportering van het resultaat gebeurt door de patholoog door middel van een aanvullend verslag.

## 4 Afname instructies

- Conform de richtlijnen van de dienst Pathologische Ontleedkunde.
- Fixatie:
  - Weefsel gefixeerd op 10% gebufferde formaline, de tijd tussen afname en fixatie moet minder dan 1 uur zijn.
  - Gefixeerd materiaal mag verder bewaard worden op kamertemperatuur.
  - Op de recipiënten met neutraal gebufferde formol 4% is een vervaldatum vermeld. Het is de verantwoordelijkheid van de aanvrager om de vervaldatum van het fixatief na te kijken. Gebruik geen vervallen fixatief!
- Fixatieduur: 6-24 uur.
- Exclusiecriteria voor uitvoeren van de mutatie-analyses:
  - Weefsel gefixeerd in ander fixatief dan formaline.
  - Stalen waarin geen carcinoom aanwezig is.

## 5 Staaltipe en minimale hoeveelheid

- Staaltipe:
  - formol gefixeerd en paraffine ingebed (FFPE) tumorweefsel.
  - metastase of primaire tumor, biopsie of resectiespecimen.
- Minimale hoeveelheid:
  - cfr. detectielimiet onder 7. Methode.

## 6 Transport

- Voor richtlijnen over intern transport, zie [Transport van stalen](#).

## 7 Methode

### 7.1 Uitvoeren van de test

- De PCR mutatie-analyses worden uitgevoerd met het toestel Idylla™ van Biocartis.
- Voor het uitvoeren van de test worden 1 of meerdere FFPE coupes van 5µm (of 10µm) opgevangen op een draagglasje of in een epje volgens de richtlijnen van moleculair snijden van Idylla.

### 7.2 Mutatie test per tumortype:

Tumortype	Mutatietest			
	Idylla™ KRAS Mutation Test	Idylla™ NRAS-BRAF Mutation Test	Idylla™ BRAF Mutation Test	Idylla™ EGFR Mutation Test
Gemetastaseerd colorectaal carcinoom	x	x		
Maligne melanoom		x	x	
niet-kleincellig longcarcinoom (NSCLC)				x
Papillair schildkliercarcinoom (PTC)			x	

### 7.3 Volgende testen zijn beschikbaar:

#### o Idylla™ KRAS Mutation Test

- De Idylla™ KRAS Mutation Test is een CE-IVD gelabelde test die mutaties detecteert in codon 12, 13, 59, 61, 117 en 146 van het KRAS-oncogen. De mutatie wordt opgespoord door middel van een geavanceerde moleculaire real-time PCR-gebaseerde techniek van Biocartis NV. De Idylla™ KRAS Mutation Test detecteert mutaties in exon 2, 3 en 4 van het *KRAS*-oncogen. De test bestaat uit vijf allel-specifieke multiplex PCR-reacties, die ontworpen zijn voor het specifiek amplificeren van de *KRAS*-gensequenties met een mutatie in codon 12, 13, 59, 61, 117 en 146. Tegelijkertijd wordt een geconserveerd fragment in het intron 4/exon 5 junctionele gebied van het *KRAS*-gen geamplificeerd. Deze PCR-reactie dient als een staalverwerkingscontrole waarbij wordt gekeken naar adequate uitvoering van het volledige proces van staal tot resultaat en is aanwezig in elk van de vijf multiplexen. Bovendien is deze controlereactie een maat voor de hoeveelheid amplificeerbaar DNA in het staal en wordt ze gebruikt bij de analyse van de mutatiestatus van het staal. De Idylla™ KRAS Mutation Test is gebruiksklaar en bevat de benodigde reagentia voor het uitvoeren van de staalbereiding en real-time PCR-amplificatie en -detectie, beginnend met de plaatsing van FFPE weefselcoupes.
- De **detectielimiet** voor de Idylla™ KRAS Mutation Test is  $\leq 5\%$  voor alle KRAS mutaties.

#### o Idylla™ NRAS-BRAF Mutation Test

- De Idylla™ NRAS-BRAF Mutation Test is een CE-IVD gelabelde test die mutaties detecteert in codon 12, 13, 59, 61, 117 en 146 van het NRAS-oncogen en in codon 600 van het BRAF-oncogen. De mutatie wordt opgespoord door middel van een geavanceerde moleculaire real-time PCR-gebaseerde techniek van Biocartis NV. De test bestaat uit vijf allel-specifieke multiplex PCR-reacties die ontworpen zijn voor het specifiek amplificeren van NRAS- en BRAF-gensequenties met een mutatie. Geconserveerde gebieden van het NRAS-gene (NRAS-Totaal genoemd) en het BRAF-gen (BRAF-Totaal) worden tegelijkertijd geamplificeerd. Deze PCR-reacties dienen als staalverwerkingscontroles waarbij wordt gekeken naar adequate uitvoering van het volledige proces van staal tot resultaat. Bovendien zijn deze controlereacties een maat voor de hoeveelheid amplificeerbaar DNA in het staal en worden ze gebruikt in de analyse van de mutatiestatus van het staal. De NRAS-BRAF Cartridges zijn gebruiksklaar en bevatten de nodige reagentia voor het uitvoeren van staalbereiding en realtime PCR-amplificatie en -detectie, beginnend met de plaatsing van FFPE-weefselcoupes.
- De **detectielimiet** voor Idylla™ NRAS-BRAF Mutation Test is
  - $\leq 5\%$  voor NRAS mutaties in codon 12 en 61 en BRAF mutaties in codon 600;
  - $\leq 10\%$  voor NRAS mutaties in codon 13,59, 117;
  - $\leq 15\%$  voor NRAS mutaties in codon 146.

o **Idylla™ BRAF Mutation Test**

- De Idylla™ BRAF Mutation Test is een CE-IVD gelabelde test die de V600E/E2/D- en V600K/R/M-mutaties detecteert in codon 600 van het BRAF-gen. De mutatie wordt opgespoord door middel van een geavanceerde moleculaire real-time PCR-gebaseerde techniek van Biocartis NV. De test bestaat uit drie allelspecifieke duplex PCR-reacties, die zijn ontworpen voor het specifiek versterken van het BRAF-wildtype, BRAF T1799>A- en BRAF G1798>A-mutaties, elk gecombineerd met een endogeen controlegen dat dient als verwerkingscontrole voor het staal. Bij deze controle wordt gekeken naar adequate uitvoering van het volledige proces van staal tot resultaat. De BRAF-Tests zijn gereed voor gebruik en bevatten de noodzakelijke reagentia voor het uitvoeren van staalbereiding en real-time PCR-detectie, te beginnen met de plaatsing van FFPE-weefselsecties.
- De detectielimiet voor de Idylla™ BRAF single mutatie analyse is 1%.

o **Idylla™ EGFR Mutation Test**

- De Idylla™ EGFR Mutation Test is een CE-IVD gelabelde test die bedoeld is voor de kwalitatieve detectie van mutaties van exon 18 (G719A/C/S), exon 20 (T790M, S768I), exon 21 (L858R, L861Q), deleties van exon 19 en inserties van exon 20 van het EGFR-gen. De EGFR Test-Cartridges zijn gebruiksklaar en bevatten de benodigde reagentia voor het uitvoeren van de staalbereiding en realtime PCR-amplificatie en -detectie, beginnend met het plaatsen van FFPE-weefselcoupes. De Idylla™ EGFR-specifieke software analyseert automatisch de verkregen PCR-gegevens. De testprocedure en gegevensanalyse zijn gevalideerd voor gebruik met FFPE-stalen.
- De detectielimiet voor Idylla™ EGFR Mutation Test is
  - o  $\leq 5\%$  voor mutaties in exons 19, 20 en 21 van het EGFR-oncogen;
  - o  $\leq 10\%$  voor mutaties in exon 18 van het EGFR-oncogen.
- **AANDACHT!** Aanvraag van de Idylla™ EGFR Mutation Test op NSCLC is steeds in overleg met de patholoog.

## 8 Rapportering

De dienst Pathologische Ontleedkunde verwerkt de resultaten van de mutatieanalyse in het rapport dat via het LIS systeem gegenereerd en gevalideerd wordt.

Volgende resultaten kunnen bekomen worden:

<b>KRAS</b>	<b>NRAS</b>	<b>BRAF</b>	<b>EGFR</b>
KRAS Wild Type. Geen mutatie in exon 2, 3 en 4	NRAS Wild Type. Geen mutatie in exon 2, 3 en 4	Mutatie V600E/D gedetecteerd in BRAF codon 600 HGVS nucleotide nomenclatuur:c.1799T>A; c1799_1800delinsAA/c.1799_1800delinsA C HGVS eiwit nomenclatuur:p.Val600Glu/p.Val600Asp	Deletie van exon 19: geen mutatie gedetecteerd
Mutatie G12V gedetecteerd in KRAS codon 12 HGVS nucleotide nomenclatuur: c.35G>T HGVS eiwit nomenclatuur: p.Gly12Val	Mutatie G12D gedetecteerd in NRAS codon 12 HGVS nucleotide nomenclatuur:c.35G>A HGVS eiwit nomenclatuur:p.Gly12Asp	Mutatie V600K/R gedetecteerd in BRAF codon 600 HGVS nucleotide nomenclatuur:c.1798_1799delinsAA/c.1798_1799delinsAG HGVS eiwit nomenclatuur:p.Val600Lys/p.Val600Arg	Deletie van exon 19: mutatie gedetecteerd
Mutatie G12S gedetecteerd in KRAS codon 12 HGVS nucleotide nomenclatuur: c.34G>A HGVS eiwit nomenclatuur: p.Gly12Ser	Mutatie G12C gedetecteerd in NRAS codon 12 HGVS nucleotide nomenclatuur:c.34G>T HGVS eiwit nomenclatuur:p.Gly12Cys	BRAF Wild Type. Geen mutatie gedetecteerd in BRAF codon 600.	T790M: geen mutatie gedetecteerd
Mutatie G12R gedetecteerd in KRAS codon 12 HGVS nucleotide nomenclatuur: c.34G>C HGVS eiwit nomenclatuur: p.Gly12Arg	Mutatie G12S gedetecteerd in NRAS codon 12 HGVS nucleotide nomenclatuur:c.34G>A HGVS eiwit nomenclatuur:p.Gly12Ser	Ongeldig/Onvoldoende DNA	T790M: mutatie gedetecteerd Protëine HGVS: # Nucleotideverandering: #
Mutatie G12D gedetecteerd in KRAS codon 12 HGVS nucleotide nomenclatuur: c.35G>A HGVS eiwit nomenclatuur: p.Gly12Asp	Mutatie G12A/V gedetecteerd in NRAS codon 12 HGVS nucleotide nomenclatuur:c.35G>C/c.35G>T HGVS eiwit nomenclatuur:p.Gly12Ala/p.Gly12Val		G719A/C/S: geen mutatie gedetecteerd
Mutatie G12C gedetecteerd in KRAS codon	Mutatie G13D gedetecteerd in NRAS		G719A/C/S: mutatie gedetecteerd

12 HGVS nucleotide nomenclatuur: c.34G>T HGVS eiwit nomenclatuur: p.Gly12Cys	codon 13 HGVS nucleotide nomenclatuur:c.38G>A HGVS eiwit nomenclatuur:p.Gly13Asp		Protëine HGVS: # Nucleotideverandering: #
Mutatie G12A gedetecteerd in KRAS codon 12 HGVS nucleotide nomenclatuur: c.35G>C HGVS eiwit nomenclatuur: p.Gly12Ala	Mutatie G13R/V gedetecteerd in NRAS codon 13 HGVS nucleotide nomenclatuur:c.37G>C/c.38G>T HGVS eiwit nomenclatuur:p.Gly13Arg/p.Gly13Val		Insertie van exon 20: geen mutatie gedetecteerd
Mutatie G13D gedetecteerd in KRAS codon 13 HGVS nucleotide nomenclatuur: c.38G>A HGVS eiwit nomenclatuur: p.Gly13Asp	Mutatie A59T gedetecteerd in NRAS codon 59 HGVS nucleotide nomenclatuur:c.175G>A HGVS eiwit nomenclatuur:p.Ala59Thr		Insertie van exon 20: mutatie gedetecteerd
Mutatie A59T/E/G gedetecteerd in KRAS codon 59 HGVS nucleotide nomenclatuur: c.175G>A/c.176C>A/c.176C>G HGVS eiwit nomenclatuur: p.Ala59Thr/p.Ala59Glu/p.Al59Gly	Mutatie Q61K gedetecteerd in NRAS codon 61 HGVS nucleotide nomenclatuur:c.181C>A HGVS eiwit nomenclatuur:p.Gln61Lys		L861Q: geen mutatie gedetecteerd
Mutatie Q61R/L gedetecteerd in KRAS codon 61 HGVS nucleotide nomenclatuur: c.182A>G/c.182A>T HGVS eiwit nomenclatuur: p.Gln61Arg/p.Gln61Leu	Mutatie Q61R gedetecteerd in NRAS codon 61 HGVS nucleotide nomenclatuur:c.182A>G HGVS eiwit nomenclatuur:p.Gln61Arg		L861Q: mutatie gedetecteerd Protëine HGVS: # Nucleotideverandering: #
Mutatie Q61K gedetecteerd in KRAS codon 61 HGVS nucleotide nomenclatuur: c.181C>A;c.180_181TC>AA HGVS eiwit nomenclatuur: p.Gln61Lys	Mutatie Q61L gedetecteerd in NRAS codon 61 HGVS nucleotide nomenclatuur:c.182A>T HGVS eiwit nomenclatuur:p.Gln61Leu		L858R: geen mutatie gedetecteerd
Mutatie Q61H gedetecteerd in KRAS codon 61 HGVS nucleotide nomenclatuur: c.183A>C;c.183A>T HGVS eiwit nomenclatuur: p.Gln61His	Mutatie Q61H gedetecteerd in NRAS codon 61 HGVS nucleotide nomenclatuur:c.183A>C;c.183A>T HGVS eiwit nomenclatuur:p.Gln61His		L858R: mutatie gedetecteerd Protëine HGVS: # Nucleotideverandering: #

Mutatie K117N gedetecteerd in KRAS codon 117 HGVS nucleotide nomenclatuur: c.351A>C;c.351A>T HGVS eiwit nomenclatuur: p.Lys117Asn	Mutatie K117N gedetecteerd in NRAS codon 117 HGVS nucleotide nomenclatuur: c.351G>C;c.351G>T HGVS eiwit nomenclatuur:p.Lys117Asn		S768I: geen mutatie gedetecteerd
Mutatie A146P/T/V gedetecteerd in KRAS codon 146 HGVS nucleotide nomenclatuur: c.436G>C/c.436G>A/c.437C>T HGVS eiwit nomenclatuur: p.Ala146Pro/p.Ala146Thr/p.Ala146Va	Mutatie A146T/V gedetecteerd in NRAS codon 146 HGVS nucleotide nomenclatuur: c.436G>A/c.437C>T HGVS eiwit nomenclatuur:p. Ala146Thr/Val		S768I: mutatie gedetecteerd Protëine HGVS: # Nucleotideverandering: #
Ongeldig/Onvoldoende DNA	Ongeldig/Onvoldoende DNA		

De mutatie-analyses zijn geaccrediteerd conform ISO15189:2012 BELAC 515-MED.

**Revisie overzicht**

dd-mm-jjjj	Creatie document	V. Naam
------------	------------------	---------