

Istruzioni d'uso

ver. 3 - 20/04/2022

Biologia Molecolare

DPYD Real Time (FRET)

REF

AA1579/48A



48 TEST

CND

W0106010499

CE

IVD



NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.

SEDE LEGALE: Via Cascina Conighetto - UFFICI OPERATIVI: Viale delle Industrie, 3 - 20049 SETTALA (MI), ITALIA

Tel.: (+39) 02/95.24.51 - Fax (+39) 02/95.24.52.37 - (+39) 02/95.24.52.38 WEB: www.nlm.it - E-MAIL: segreteria@nlm.it

Organizzazione con Sistema di gestione qualità certificata ISO 9001 e Sistema di gestione qualità settore medicale certificato ISO 13485
(organismo di certificazione IMQ - Certificazione CSQ).

UTILIZZO

Il kit **AA1579/48A** fornisce il materiale necessario per l'analisi nel DNA genomico umano estratto da sangue intero di cinque varianti alleliche del gene DPYD (diidropirimidina deidrogenasi) che determinano una ridotta attività enzimatica della proteina DPD coinvolta nel catabolismo delle fluoropirimidine:

c.1905+1G>A, c.1679T>G, c.2846A>T, c.1129-5923C>G, c.2194G>A.

Il kit si basa sull'amplificazione delle sequenze bersaglio e successiva analisi delle curve di melting.

Per ciascuna variante viene fornita una mix comprensiva di enzima di amplificazione e di Uracil-DNA Glycosylase (UNG) per prevenire la contaminazione da amplificati.

Il presente dispositivo è stato validato con:

- il kit di estrazione manuale su colonnina (cod. NLM AA1001), il kit di Estrazione DNA da sangue (biglie magnetiche) (cod. NLM AA1319/48) abbinato allo strumento automatico OMNIA LH75 e i più comuni sistemi automatici di estrazione degli acidi nucleici.
- lo strumento CFX Real Time PCR (BioRad).

INTRODUZIONE

Le fluoropirimidine (5-fluorouracile, capecitabina e tegafur) sono una classe di farmaci che vengono utilizzati nel trattamento di molti tipi di tumori solidi. Circa l'85% del 5-fluorouracile somministrato ad un paziente viene inattivato nel fegato dall'enzima diidropirimidina deidrogenasi (DPD), codificato dal gene DPYD. Alcune mutazioni nel gene DPYD sono associate ad alterazioni strutturali dell'enzima che determinano un'inattivazione completa o una riduzione significativa della sua attività con conseguente aumento della concentrazione di farmaco in circolo. Questo può portare a gravi episodi di tossicità che in alcuni casi possono anche risultare fatali.

E' per questo che, al fine di prevenire reazioni avverse potenzialmente molto gravi, è stato stilato nel 2019 da AIOM-SIF il documento *Raccomandazioni per le analisi farmaco genetiche* in cui è prevista l'esecuzione di un test che analizzi 5 mutazioni che hanno dimostrato avere una rilevanza clinica a tutti i pazienti candidati al trattamento con fluoropirimidine:

| HGVS | SNP | Allele | Effetto |
|------------------|------------|---------|------------|
| c.1905+1G>A | rs3918290 | DPYD*2A | IVS14+1G>A |
| c.1679T>G | rs55886062 | DPYD*13 | p.I560S |
| c.2846A>T | rs67376798 | | p.D949V |
| c.1129-5923C>G ^ | rs75017182 | | IVS10 C>G |
| c.2194G>A | rs1801160 | DPYD*6 | p.V732I |

^ La variante c.1129-5923C>G è in perfetto linkage disequilibrium con la variante c.1236G> A (rs56038477) nella popolazione europea.

Nel caso venga rilevata la presenza di una di queste mutazioni viene raccomandata una riduzione della dose di farmaco somministrato o addirittura la sostituzione con un farmaco alternativo:

| Genotipo DYPD | | Dose di fluoropirimidine consigliata |
|------------------|------------|--------------------------------------|
| Wild Type | c.1236GG | 100% |
| | c.1679TT | |
| | c.1905+1GG | |
| | c.2846AA | |
| | c.2194GG | |
| Eterozigote | c.1236GA | 75% |
| | c.1679TG | 50 |
| | c.1905+1GA | |
| | c.2846AT | |
| | c.2194GA | |
| c.1236AA | 50% | |
| Omozigote mutato | c.1679GG | Non somministrare fluoropirimidine |
| | c.1905+1AA | |
| | c.2846TT | |
| | c.2194AA | |

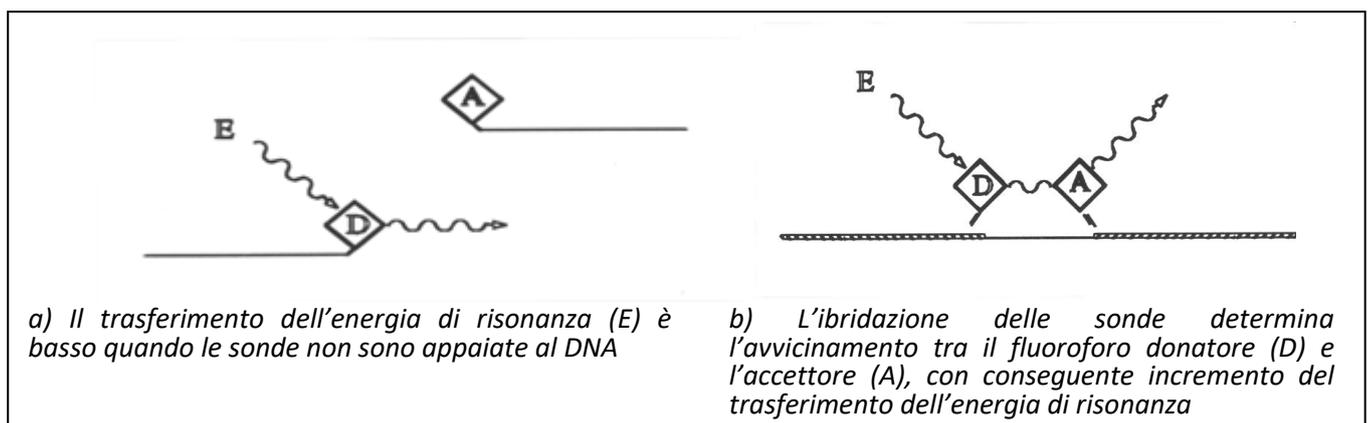
BIBLIOGRAFIA

- Amstutz *et al*, Clin Pharmacol Ther 2018; 103(2): 210–216
- AIOM-SIF, Raccomandazioni 2019 per analisi farmaco genetiche
- Boige *et al*, JAMA Oncol 2016; 2: 655-662
- Del Re *et al*, Pharmacogenomics J 2019; 19: 556-563
- Henricks *et al*, Lancet Oncol 2018;19:1459-1467
- Iachetta, Bonelli *et al*, British Journal of Cancer 2019; 120: 834-839
- Meulendijks *et al*, Cancer Chemotherapy and Pharmacology 2016; 78: 875–880
- Offer *et al*, Cancer Res 2013; 73(6): 1958-1968

PRINCIPIO DEL TEST

Il test si basa sull'amplificazione del DNA e sul Trasferimento di Energia di Risonanza Fluorescente (FRET) che avviene tra due sonde adiacenti e complementari alla regione che comprende la mutazione: una sonda, posizionata in 5', comprende la mutazione di interesse ed è marcata con un fluoroforo donatore; una sonda in 3' porta invece il fluoroforo accettore. Se le due sonde si appaiano alla loro sequenza bersaglio, i due fluorofori vengono a trovarsi in prossimità e, in presenza di una fonte luminosa, si ha quindi il trasferimento di energia dal donatore all'accettore; in assenza del bersaglio invece il trasferimento di energia non avviene.

Le sonde permettono di identificare varianti della sequenza bersaglio mediante la curva di dissociazione (melting curve), in cui l'amplificato viene sottoposto ad una rampa crescente di temperatura con conseguente distacco delle sonde dal DNA. Se la sonda in 5' è complementare al filamento mutato di DNA, l'ibridazione tra i due sarà più stabile rispetto al duplex tra la sonda medesima ed il filamento che non porta la mutazione (single point mismatch), con conseguente picco di dissociazione ad una temperatura più elevata. Mediante l'analisi della curva di melting si possono pertanto distinguere i tre genotipi in base alla posizione dei picchi: singoli a due diverse temperature per i campioni omozigoti e doppio picco per l'eterozigote.



COMPOSIZIONE DEL PRODOTTO

Conservazione a -25/-15°C



| Reagenti | Codice NLM | N° vial | Volume/vial |
|--|------------|---------|-------------|
| Mastermix DPYD*2A , tappo rosso Soluzione contenente oligonucleotidi, sonde fluorescenti ed enzimi | KA1278-n | 1 | 600 µl |
| Mastermix DPYD*13 , tappo verde Soluzione contenente oligonucleotidi, sonde fluorescenti ed enzimi | KA1279-n | 1 | 600 µl |
| Mastermix DPYD D949V , tappo blu Soluzione contenente oligonucleotidi, sonde fluorescenti ed enzimi | KA1280-n | 1 | 600 µl |
| Mastermix DPYD IVS10 , tappo giallo Soluzione contenente oligonucleotidi, sonde fluorescenti ed enzimi | KA1281-n | 1 | 600 µl |
| Mastermix DPYD V732I , tappo viola Soluzione contenente oligonucleotidi, sonde fluorescenti ed enzimi | KA1282-n | 1 | 600 µl |
| Acqua DNase, RNase, Protease free , tappo trasparente | AZ040-n | 1 | 1600 µl |

I volumi dei componenti indicati precedentemente sono riferiti alla pezzatura standard del kit. Confezionamenti ridotti del kit sono disponibili su richiesta per valutazione e/o dimostrazione del prodotto.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

- Tutti i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta se conservati alla temperatura indicata (-25/-15°C)
- Scongellare le Mastermix in ghiaccio o a +2/+8°C
- Le sonde contenute nelle Mastermix sono fotosensibili: evitare l'esposizione prolungata alla luce
- Al termine di ogni seduta riporre i reagenti alla corretta temperatura di conservazione

PRECAUZIONI

- La procedura va eseguita da personale competente, utilizzando le buone pratiche di laboratorio ed i comuni dispositivi di protezione individuale
- Eliminare il materiale monouso utilizzato, i guanti indossati e tutti i reattivi come rifiuti speciali
- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree preposte all'esecuzione del test
- Se vi è esposizione di occhi, cute o mucose alle sostanze utilizzate, lavare abbondantemente con acqua e contattare al più presto un medico
- Non utilizzare reagenti scaduti
- Non mischiare reagenti di lotti diversi
- Tenere i reagenti separati da possibili acidi nucleici contaminanti (campioni e prodotti di amplificazione)
- Evitare ripetuti scongelamenti delle mix
- Si consiglia di eseguire l'analisi in tre zone separate:
 - Zona 1: manipolazione dei campioni ed estrazione; preparazione PCR in automatico
 - Zona 2: preparazione PCR in manuale
 - Zona 3: post PCR (Real Time PCR)
- Non utilizzare il kit se la scatola è danneggiata e contattare il fornitore
- E' opportuno assicurare una temperatura il più possibile costante ed uniforme in laboratorio ed evitare di posizionare gli strumenti in prossimità di fonti di calore/raffreddamento che possano comprometterne il corretto funzionamento

MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

- Estrattore automatico di DNA e relativi consumabili
- Preparatore automatico di PCR e relativi consumabili
- Kit di estrazione del DNA
- Cappa a flusso laminare verticale
- Set dedicato di pipette a volume variabile
- Puntali con filtro monouso
- Strumento per amplificazione Real Time PCR
- Strip o piastre da 0.2 ml per Real Time PCR
- Controllo positivo eterozigote, monouso (cod. NLM FA157/10).



Per la compatibilità con strumentazione diversa da quella indicata, contattare la *Nuclear Laser Medicine srl*.

PROCEDIMENTO

E' possibile utilizzare sangue fresco o conservato a +2/+8°C (per non più di due giorni) oppure conservato a -25/-15°C. Usare solo EDTA o citrato come anticoagulanti (non utilizzare eparina).

ISOLAMENTO DEL DNA

Estrazioni compatibili:

- estrazione manuale (cod. NLM AA1001)
- estrazione con il sistema automatico OMNIA LH75 (abbinato al kit di estrazione cod. NLM AA1319/48) e con i più comuni sistemi automatici di estrazione degli acidi nucleici.

Per l'uso del sistema automatico OMNIA LH75 seguire le indicazioni fornite da *Nuclear Laser Medicine srl*; per l'estrazione con gli altri sistemi automatici seguire invece le indicazioni del fornitore del sistema.

AMPLIFICAZIONE

Attenzione

- L'utilizzo di campioni di sangue o di estratti che abbiano subito ripetuti scongelamenti o un'impropria conservazione può pregiudicare l'esito positivo del test
- Agitare delicatamente le Mastermix prima dell'uso e controllare che non ci siano residui nel tappo
- La concentrazione del DNA estratto da analizzare deve essere di circa 15-60 ng/μl.
- Il Controllo positivo è monouso. Eliminare il materiale rimanente nella provetta.

PCR set-up in manuale

Per ognuna delle cinque Mastermix procedere come descritto di seguito:

| Reagente | Volume per campione |
|-----------------------------------|---------------------|
| Mastermix DPYD | 10 μl |
| Acqua DNase, RNase, Protease-free | 6 μl |
| DNA | 4 μl |

Miscelare bene tra loro i tre reagenti.

Se possibile spinnare le strip o la piastra prima di cominciare l'amplificazione per eliminare la presenza di eventuali bolle.

PCR set-up con sistema automatico

Per la preparazione della PCR con il sistema automatico OMNIA LH75 utilizzare il protocollo fornito dalla *Nuclear Laser Medicine srl*.

IMPOSTAZIONE DEL PROFILO TERMICO E ANALISI DEI RISULTATI

 Per l'utilizzo dello strumento **CFX96 (Biorad)**, scaricare il manuale d'uso cod. NLM **DX007** dal sito www.nlm.it. Per la compatibilità con altri strumenti per Real Time PCR, contattare *Nuclear Laser Medicine srl*.

IMPOSTAZIONE DEL PROFILO TERMICO

Impostare *Sample Volume*: 20 µl

Inserire il seguente profilo termico:

- 1 45,0° C for 5:00
- 2 95,0° C for 2:00
- 3 95,0° C for 0:15
- 4 54,0° C for 0:20 + Plate Read
- 5 72,0° C for 0:10
- 6 **GOTO 3, 39 more times**
- 7 35,0° C for 2:00
- 8 75,0° C for 1:00, Slow Ramp Rate to 0,1°C per second
- 9 25,0° C for 10:00
- 10 Melt Curve 35,0 to 75,0° C, increment 0,5° C for 0:05 + Plate Read

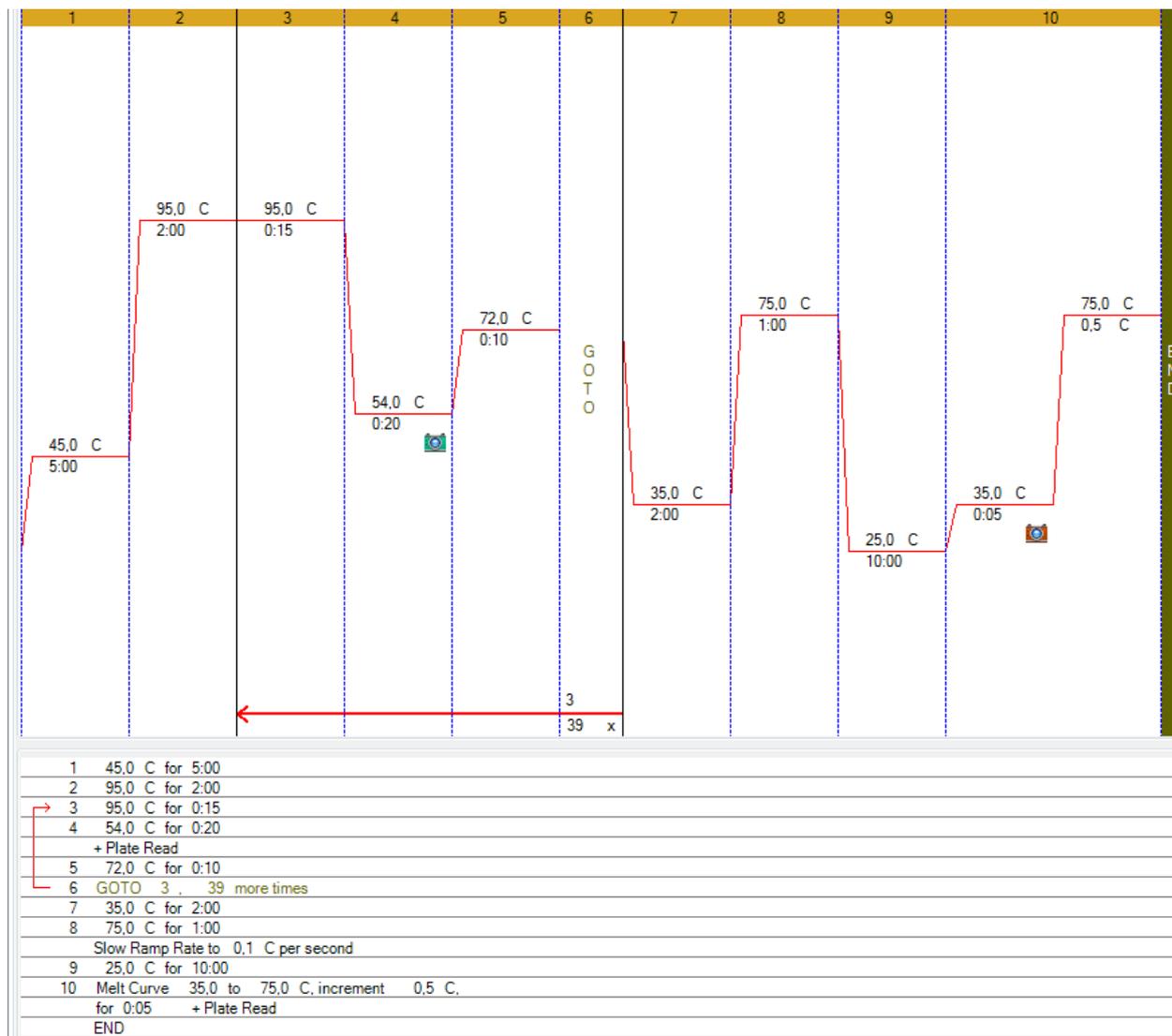


Figura 1. Riproduzione del profilo termico, così come visualizzato nel programma dello strumento.

Setup della piastra

- Per i campioni da analizzare selezionare in *Sample Type* → *Unknown*
- *Select Fluorophores* → FAM
- Selezionare *Target Name* ed inserire la descrizione riportata nella tabella sottostante:

| Target | Fluoroforo |
|------------|------------|
| DPYD*2A | FAM |
| DPYD*13 | |
| DPYD D949V | |
| DPYD IVS10 | |
| DPYD V732I | |

- In caso di inserimento di Controlli positivi selezionare *Sample Type* → *Positive Control*
Sample Name → *ctrl DPYD etero*
- In caso di inserimento di Controlli negativi (No Template Control) selezionare *Sample Type* → *NTC*.
In questo caso può essere utilizzato un *Sample name* a piacere.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Al termine della seduta di lavoro, si apre automaticamente la finestra *Data Analysis*.

- Selezionare la finestra *Melt Curve* in cui vengono visualizzati i grafici della seduta: il grafico a sinistra mostra il dato grezzo della curva di melting mentre il grafico a destra mostra i picchi delle curve di melting (analisi $-d(RFU)/dT$)
- Selezionare *Peak Type* → *Negative*

Lo strumento seleziona automaticamente la threshold (linea blu) che però può essere spostata a piacimento per eliminare il rumore di fondo e/o segnali aspecifici.

Analizzare i picchi di melting per ogni campione, selezionando i singoli pozzetti della piastra.

Attenzione: non considerare i picchi che cadono al di fuori del range indicato.

| Target | Tm | |
|------------|-----------------|--------------|
| | Picco wild type | Picco mutato |
| DPYD*2A | 50.5°C ± 2 | 57.0°C ± 2 |
| DPYD*13 | 59.0°C ± 2 | 52.0°C ± 2 |
| DPYD D949V | 52.0°C ± 2 | 57.0°C ± 2 |
| DPYD IVS10 | 48.5°C ± 2 | 57.5°C ± 2 |
| DPYD V732I | 48.0°C ± 2 | 58.5°C ± 2 |

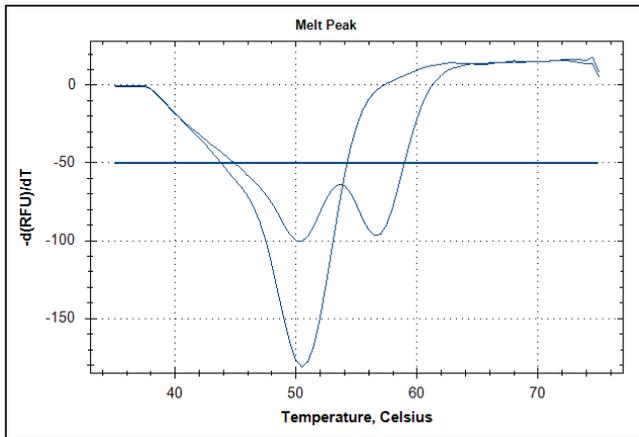
In presenza di entrambi i picchi (wild type e mutato) il campione deve essere considerato eterozigote.

Importante: nel caso in cui, in seguito ad analisi, vengano trovati campioni eterozigoti si consiglia di valutare anche il dato grezzo in modo da escludere l'inclusione di picchi aspecifici.

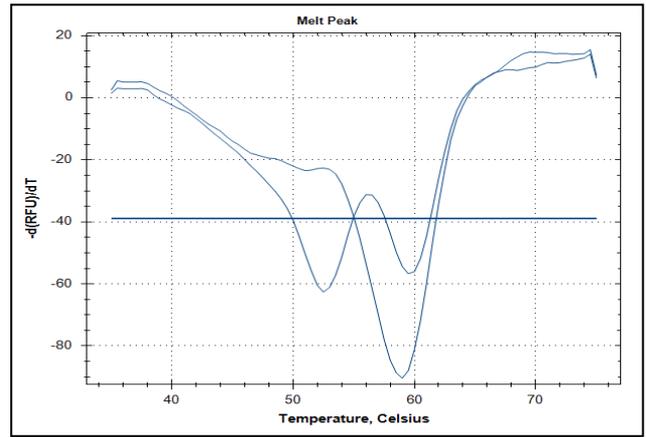
➡ Per l'interpretazione automatica dei risultati e la generazione del report, utilizzare il programma **Real-PHARMA** seguendo il manuale cod. NLM **DO041** o il programma **RealGene**, cod. NLM **DO022**.

L'inserimento del Controllo Positivo nella seduta è facoltativo. La seduta non viene invalidata da un suo risultato non conforme.

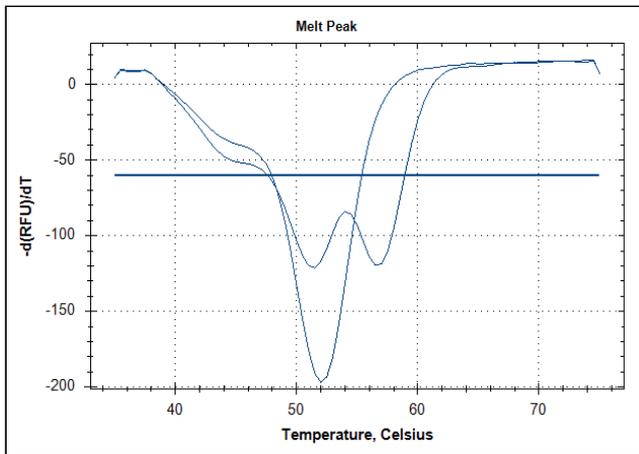
Attenzione: le curve di amplificazione non contengono informazioni utili per la genotipizzazione che si basa solo sulle Tm dei picchi.



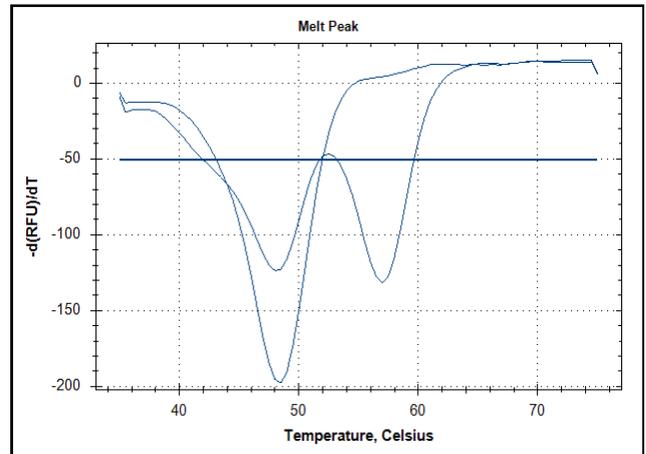
Campione wild type e campione eterozigote analizzati con la mix **DPYD*2A**



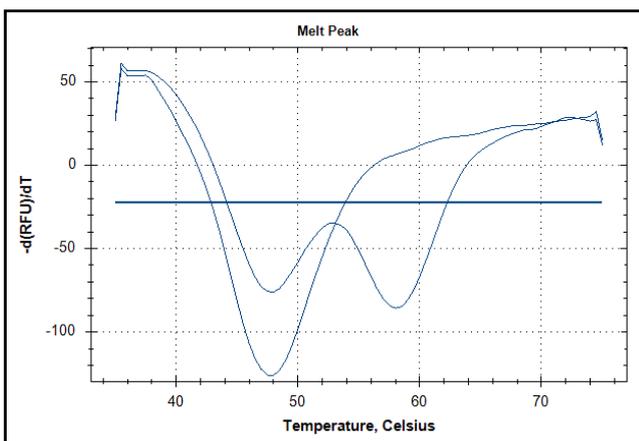
Campione wild type e campione eterozigote analizzati con la mix **DPYD*13**



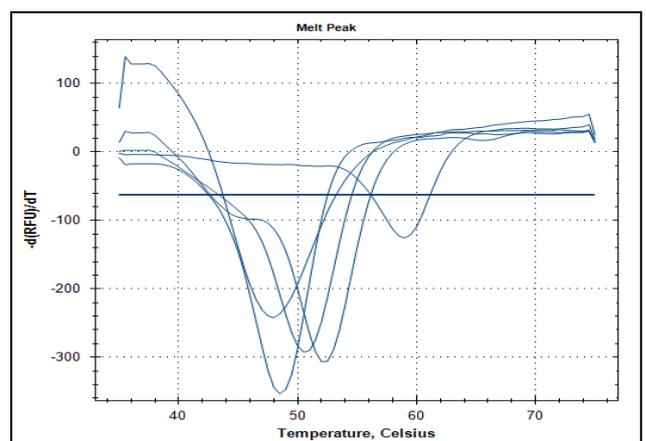
Campione wild type e campione eterozigote analizzati con la mix **DPYD D949V**



Campione wild type e campione eterozigote analizzati con la mix **DPYD IVS10**



Campione wild type e campione eterozigote analizzati con la mix **DPYD V732I**



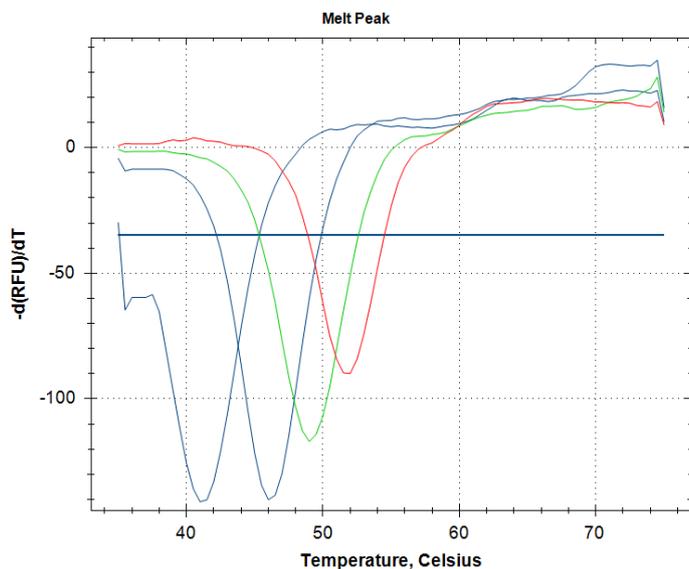
Campione wild type per tutte e cinque le varianti con impostazione di una soglia unica

Figura 2. Esempio di campioni wild type e eterozigoti analizzati con tutte e cinque le Mastermix DPYD

ATTENZIONE

Come per ogni sistema basato su amplificazione e rilevazione degli acidi nucleici, è possibile che la presenza di altre varianti nelle sequenze geniche della regione in cui sono stati disegnati i primer e/o le sonde specifiche possa dare risultati inattesi.

Di seguito sono riportate le T_m di due SNP che cadono all'interno della sequenza complementare alla sonda per la mutazione DPYD*2A e che hanno una frequenza rilevante nella popolazione: rs17376848 e rs3918289



| | T_m |
|----------------|--------|
| Wild type | 52.0°C |
| rs17376848 (G) | 49.0°C |
| rs3918289 (A) | 46.0°C |
| rs3918289 (C) | 41.0°C |

Figura 3. Spostamento del picco wild type (in rosso) in presenza dei polimorfismi rs17376848 (in verde) e rs3918289 (in blu). Risultato ottenuto utilizzando target sintetici.

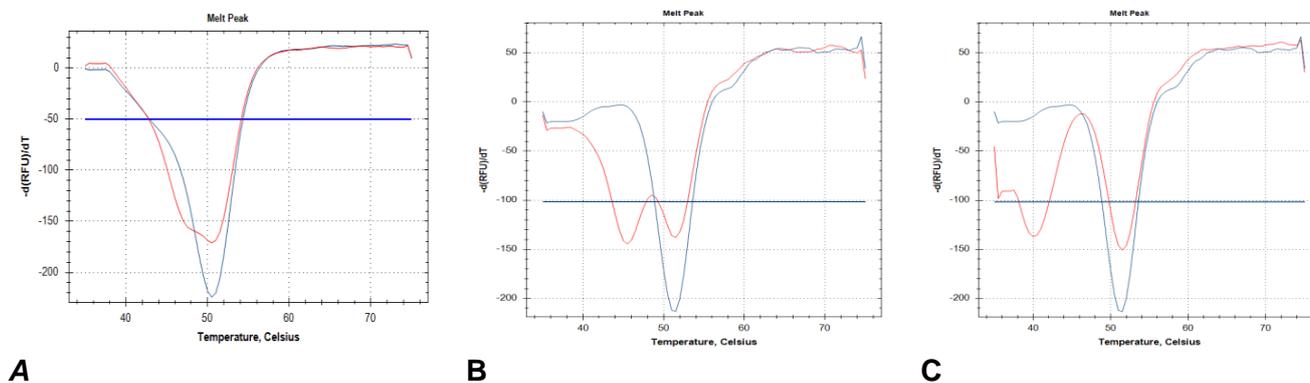


Figura 4. (A) Campione reale eterozigote per il polimorfismo rs17376848 (in rosso) confrontato con un campione WT (in blu); (B) campione sintetico eterozigote per il polimorfismo rs3918289A e (C) campione sintetico eterozigote per il polimorfismo rs3918289C (entrambi in rosso) confrontati con un campione WT (in blu).

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del kit “DPYD Real Time (FRET)”, espressa come la quantità minima di marcatore bersaglio che può essere esattamente rilevata, è stata valutata per tutte e cinque le Mastermix ed è pari a 5 ng/μl di DNA (equivalente a 20 ng per reazione).

Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica del kit “DPYD Real Time (FRET)” è stata valutata analizzando 30 campioni a genotipo noto.

Il kit ha permesso di discriminarli tutti in maniera corretta, pertanto la sensibilità diagnostica del dispositivo è pari al 100%.

Specificità diagnostica

La specificità del kit “DPYD Real Time (FRET)” è stata determinata testando 30 campioni a genotipo noto. Non sono stati ottenuti risultati falsi positivi, pertanto la specificità del kit è pari al 100%.

Riproducibilità

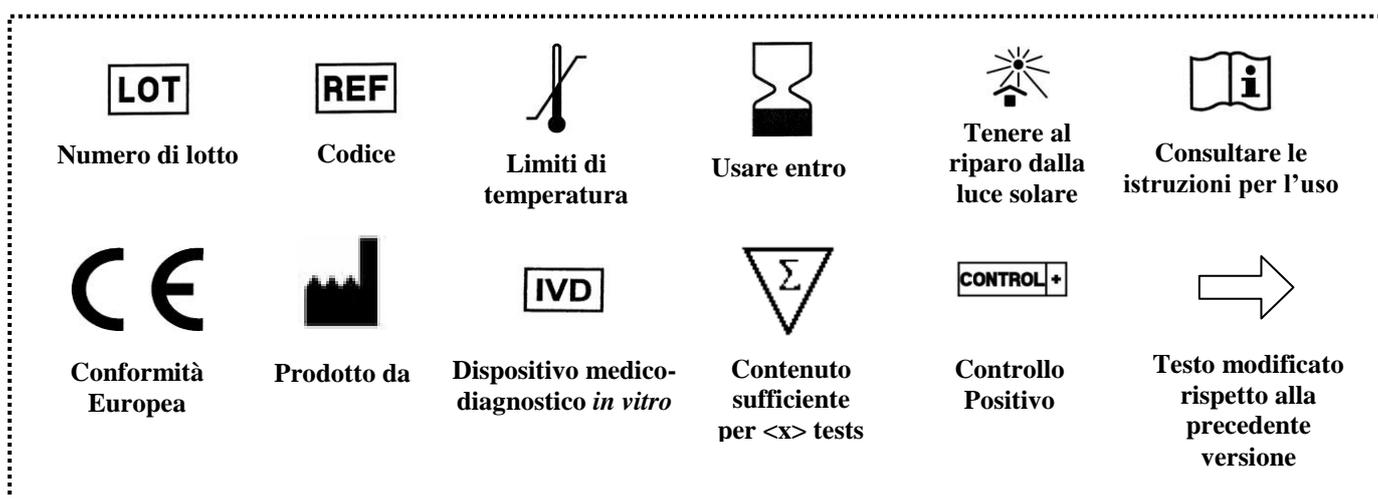
Riproducibilità intrasaggio

La riproducibilità intrasaggio è stata valutata testando 3 campioni a diverso genotipo in 4 replicati nella stessa seduta su diversi strumenti.

Riproducibilità intersaggio

La riproducibilità intersaggio è stata valutata analizzando 3 campioni a diverso genotipo in 4 replicati in diverse sedute e su diversi strumenti.

In base ai risultati ottenuti la riproducibilità è del 100%.



Instructions for Use

ver. 3 - 20/04/2022

Molecular Biology

DPYD Real Time (FRET)

REF

AA1579/48A



48 TEST

CE

GMDN

63099

IVD



NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.

HEADQUARTER: Via Cascina Conighetto – BUSINESS OFFICES: Viale delle Industrie, 3 - 20049 SETTALA (MI), ITALY

Phone: (+39) 02/95.24.51 - Fax (+39) 02/95.24.52.37 - (+39) 02/95.24.52.38 WEB: www.nlm.it - E-MAIL: segreteria@nlm.it

ISO 9001 Quality Management System Organization certified and ISO 13485 Medical Sector Quality Management System certified (IMQ certification body - CSQ certification).

INTENDED USE

The **AA1579/48A** device provides the material for the analysis in DNA extracted from human blood samples of five DPYD (dihydropyrimidine dehydrogenase) gene variants that reduce enzymatic activity of the DPD protein involved in the catabolism of fluoropyrimidines:

c.1905+1G>A, c.1679T>G, c.2846A>T, c.1129–5923C>G, c.2194G>A.

The device is based on amplification of the target sequences and analysis of melting curves.

A mix for each variant, including amplification enzyme and Uracil-DNA Glycosylase (UNG) to prevent amplified contamination, is provided.

This device has been validated with:

- manual column based kit (NLM code AA1001), extraction kit for automatic instruments OMNIA LH75 (NLM code AA1319/48) and with the most common automatic nucleic acid extraction systems.
- CFX Real Time PCR (BioRad) instrument.

INTRODUCTION

Fluoropyrimidines (5-fluorouracil, capecitabine and tegafur) are a drugs class used in the treatment of many types of solid tumors. Metabolism of fluoropyrimidines requires DPD protein (dihydropyrimidine dehydrogenase) encoded by DPYD gene. DPD catabolyses 85% of the administered dose of fluoropyrimidines and reduced or absent activity of this enzyme can result in severe and sometimes fatal toxicity.

Functional DPYD gene variants have been found to be associated with reduced or abrogate DPD activity.

Recommendations for pharmacogenetic analysis of DPD and fluoropyrimidines are presented in 2019 from AIOM-SIF in which is recommended a test to analyze 5 mutations with clinical relevance to all patients candidates for treatment with fluoropyrimidines:

| HGVS | SNP | Allele | Effetto |
|------------------|------------|---------|------------|
| c.1905+1G>A | rs3918290 | DPYD*2A | IVS14+1G>A |
| c.1679T>G | rs55886062 | DPYD*13 | p.I560S |
| c.2846A>T | rs67376798 | | p.D949V |
| c.1129–5923C>G ^ | rs75017182 | | IVS10 C>G |
| c.2194G>A | rs1801160 | DPYD*6 | p.V732I |

^ Variant c.1129–5923C>G is in perfect linkage disequilibrium with c.1236G> A (rs56038477) in European population.

Fluoropyrimidines dose omission or reduction were recommended in patients carriers of these variants:

| DPYD Genotype | | Recommended fluoropyrimidines dose |
|---------------|------------|------------------------------------|
| Wild Type | c.1236GG | 100% |
| | c.1679TT | |
| | c.1905+1GG | |
| | c.2846AA | |
| | c.2194GG | |
| Heterozygous | c.1236GA | 75% |
| | c.1679TG | 50 |
| | c.1905+1GA | |
| | c.2846AT | |
| | c.2194GA | 85% |
| Homozygous | c.1236AA | 50% |
| | c.1679GG | No fluoropyrimidines |
| | c.1905+1AA | |
| | c.2846TT | |
| | c.2194AA | 70% |

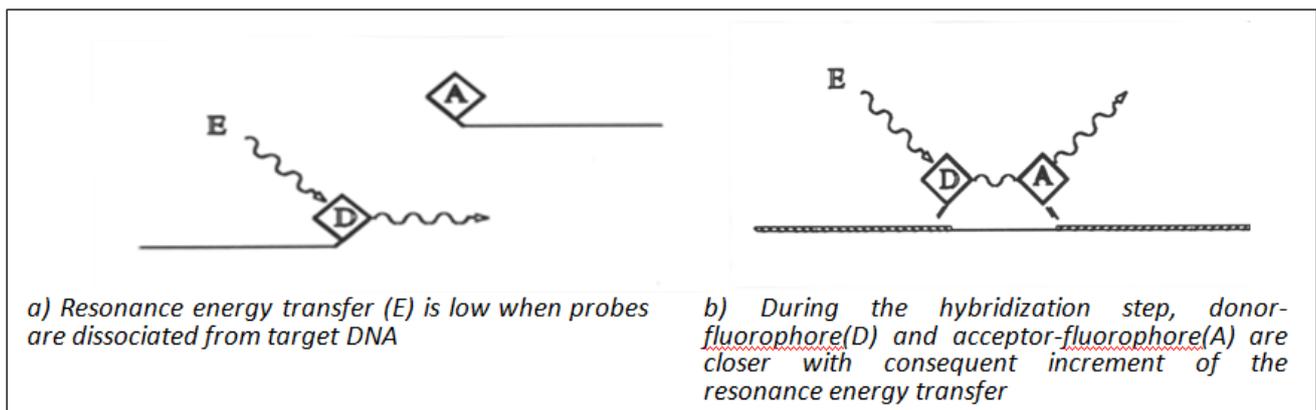
REFERENCES

- Amstutz *et al*, Clin Pharmacol Ther 2018; 103(2): 210–216
- AIOM-SIF, Raccomandazioni 2019 per analisi farmaco genetiche
- Boige *et al*, JAMA Oncol 2016; 2: 655-662
- Del Re *et al*, Pharmacogenomics J 2019; 19: 556-563
- Henricks *et al*, Lancet Oncol 2018;19:1459-1467
- Iachetta, Bonelli *et al*, British Journal of Cancer 2019; 120: 834-839
- Meulendijks *et al*, Cancer Chemotherapy and Pharmacology 2016; 78: 875–880
- Offer *et al*, Cancer Res 2013; 73(6): 1958-1968

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

The assay is based on DNA amplification and Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) that occurs between two adjacent probes complementary to the region that includes the mutation: a 5' probe includes the mutation of interest and it is labeled with a donor fluorophore; instead a 3' probe carries the acceptor fluorophore. If the two probes appear in their target sequence, the two fluorophores come to be in proximity and, in the presence of a light source, energy is therefore transferred from the donor to the acceptor; in the absence of the target, energy transfer does not take place.

The probes allow to identify variants of the target sequence by means of the dissociation curve (melting curve); the amplicon is subjected to a rising temperature ramp with consequent detachment of the probes from the DNA. If the 5' probe is complementary to the mutated DNA strand, the hybridization between the two sequence will be more stable than the duplex between the probe itself and the strand that is not mutated (single point mismatch), with consequent peak of dissociation to an higher temperature. Therefore, through the melting curve analysis it is possible to distinguish the three genotypes based on the peak positions: two single peak with different temperatures for the homozygous samples and double peak for the heterozygote.



PRODUCT COMPOSITION

Store at -25/-15°C



| Reagents | NLM code | N° vial | Volume/vial |
|--|----------|---------|-------------|
| Mastermix DPYD*2A , red cap Solution containing oligonucleotides, fluorescent probes and enzymes | KA1278-n | 1 | 600 µl |
| Mastermix DPYD*13 , green cap Solution containing oligonucleotides, fluorescent probes and enzymes | KA1279-n | 1 | 600 µl |
| Mastermix DPYD D949V , blue cap Solution containing oligonucleotides, fluorescent probes and enzymes | KA1280-n | 1 | 600 µl |
| Mastermix DPYD IVS10 , yellow cap Solution containing oligonucleotides, fluorescent probes and enzymes | KA1281-n | 1 | 600 µl |
| Mastermix DPYD V732I , purple cap Solution containing oligonucleotides, fluorescent probes and enzymes | KA1282-n | 1 | 600 µl |
| DNase, RNase, Protease-free water , transparent cap | AZ040-n | 1 | 1600 µl |

The amount of reagents indicated in the table is referred to the standard size of the kit.
Reduced packaging is available on request for evaluation and/or demonstration of the product.

STABILITY AND STORAGE

- All the reagents are stable up to the expiry date indicated on the label when stored at the correct temperature (-25/-15°C)
- Thaw Mastermix on ice or at +2/+8°C
- Probes in the Mastermix are photosensitive: avoid prolonged exposure to light
- At the end of each assay, store reagents at their correct storage temperature.

PRECAUTIONS

- Only professional and opportunely trained personnel should use this kit. Handle this product according to established Good Laboratory Practices and universal precautions; wear personal protective apparel
- Discard the used disposable material, worn gloves and all reagents as special waste
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics in areas where reagents or specimens are handled
- If eyes, skin or mucous membrane exposure occurs, immediately wash the area with copious amount of water. Seek medical advice
- Don't use components beyond the expiration date
- Don't mix reagents from different lots
- Keep reagents separated to avoid possible contamination (samples and amplification products)
- Avoid repeated freezing and thawing of the mixes
- It is recommended to make analysis in three different areas:
 - Area 1: samples handling and extraction; automatic PCR setup
 - Area 2: manual PCR setup
 - Area 3: post PCR (Real Time PCR)
- Don't use the device if the box is damaged; contact the supplier
- It is advisable to have constant and uniform laboratory temperature, avoid to place the instruments near heating/cooling sources that may compromise the correct work.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Automatic DNA Extractor and disposables
- Workstation for PCR set-up and disposables
- Vertical downflow airbox
- DNA extraction kit
- Dedicated adjustable volume pipettes set
- Aerosol-resistant pipettes tips
- 0,2 ml PCR strips or plates
- Real Time PCR instruments
- Heterozygous positive control, single use (cod. NLM FA157/10).



For compatibility with instruments other than that indicated, contact *Nuclear Laser Medicine srl*.

PROCEDURE

Use fresh or correctly stored +2/+8°C (for up to 2 days) or -25/-15°C for longer period blood samples. Use only EDTA or citrate as anticoagulants (do not use heparin).

DNA EXTRACTION

- Manual isolation kit (NLM code AA1001)
- extraction kit (NLM code AA1319/48) for OMNIA LH75 automatic system and the most common automatic nucleic acid extraction systems.

For the use of OMNIA LH75 automatic system, follow the instructions provided by *Nuclear Laser Medicine srl*; for the extraction with other automatic systems, follow the supplier indications.

AMPLIFICATION

Warning

- Avoid using blood samples after repeated freeze/thaw cycles or not correctly stored in order to prevent bad assay results
- Before use, gently shake the Mastermix and check the absence of residues in the cap
- Extracted DNA concentration must be about 15-60 ng/μl.
- The Positive Control is for single use only. Discard the remaining material in the tube.

manual PCR setup

For each of the five Mastermixes, proceed as follows:

| Reagents | Volume/sample |
|-----------------------------------|---------------|
| Mastermix DPYD | 10 μl |
| DNase, RNase, Protease-free water | 6 μl |
| DNA | 4 μl |

Mix well the three reagents together

If possible, spin strips or plate before amplification to eliminate the presence of bubbles.

PCR setup with automatic system

For PCR set up with the automatic OMNIA LH75 system, use the protocol provided by *Nuclear Laser Medicine srl*.

THERMAL PROFILE SETTING AND RESULTS ANALISYS

 For **CFX96 (Biorad)** instrument use, download the Instructions for Use (NLM code **DX007**) from the www.nlm.it. For compatibility with other Real Time PCR instruments, contact *Nuclear Laser Medicine srl*.

THERMAL PROFILE

Setting up *Sample Volume*: 20 µl
Enter the following thermal profile:

- 1 45,0° C for 5:00
- 2 95,0° C for 2:00
- 3 95,0° C for 0:15
- 4 54,0° C for 0:20 + Plate Read
- 5 72,0° C for 0:10
- 6 **GOTO 3, 39 more times**
- 7 35,0° C for 2:00
- 8 75,0° C for 1:00, Slow Ramp Rate to 0,1°C per second
- 9 25,0° C for 10:00
- 10 Melt Curve 35,0 to 75,0° C, increment 0,5° C for 0:05 + Plate Read

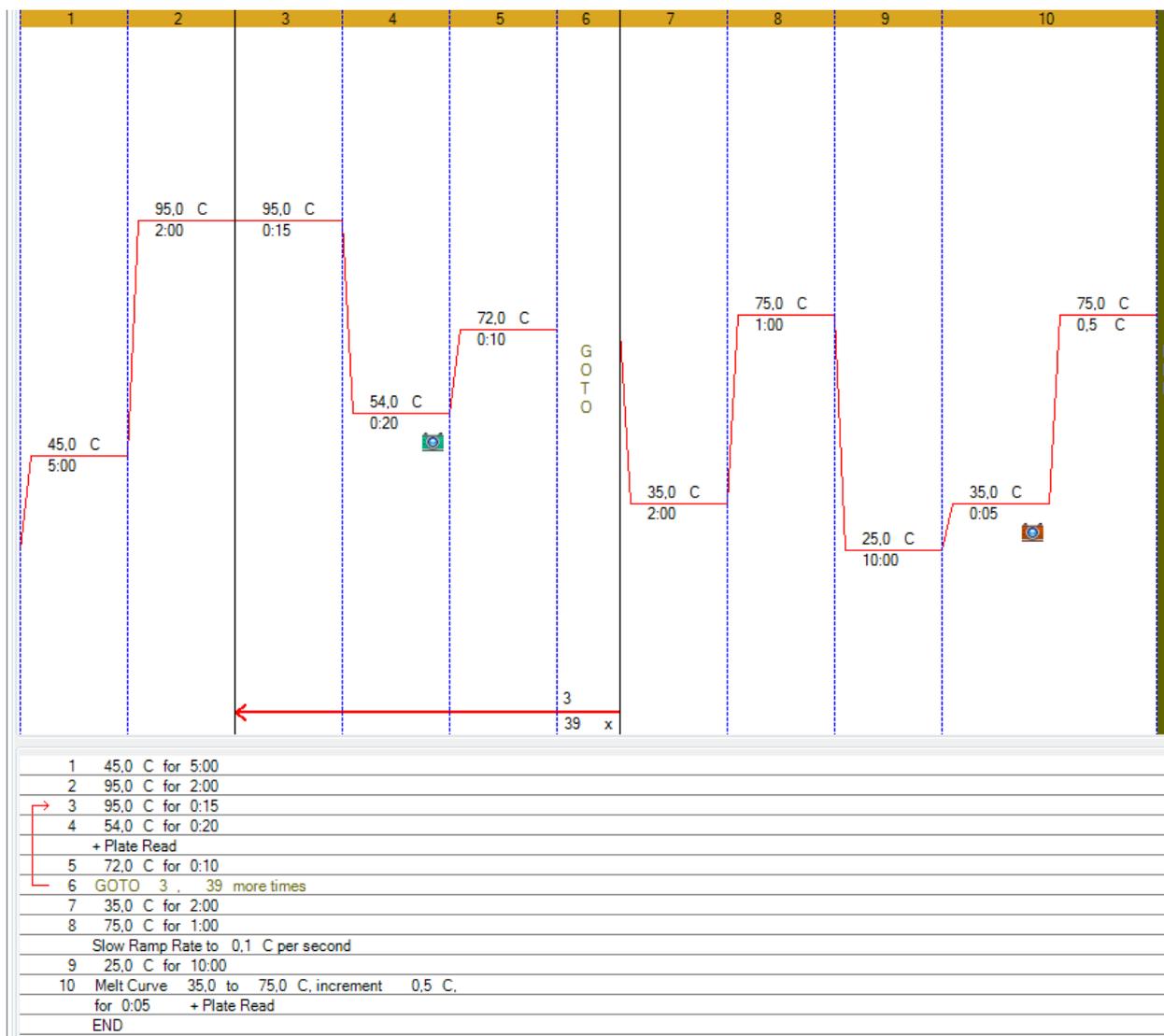


Figure 1. Reproduction of the thermal profile, as displayed in the instrument program.

Plate Setup

- Select *Sample Type* → *Unknown* for the samples to be run
- Select *Fluorophores* → FAM
- Select *Target Name* and enter the description shown in the table below:

| Target | Fluorophore |
|------------|-------------|
| DPYD*2A | FAM |
| DPYD*13 | |
| DPYD D949V | |
| DPYD IVS10 | |
| DPYD V732I | |

- For Positive controls, select: - *Sample Type* → *Positive Control*
- *Sample Name* → *ctrl DPYD etero*
- For Negative controls (No Template Control), select *Sample Type* → *NTC* (*Sample name* of your choosing)

INTERPRETATION OF RESULTS

At the end of the run, the *Data Analysis* window opens automatically.

- Select the *Melt Curve* window: the graph on the left shows the raw data of the melting curve while the graph on the right shows the peaks of the melting curves (analysis -d (RFU)/dT)
- Set up *Peak Type* → *Negative*

The instrument automatically selects the threshold (blue line): move it at will to eliminate background noise and/or non-specific signals

For each sample, analyze the melting peaks selecting the individual wells on the plate.

Warning: Do not consider peaks out of the temperature range.

| Target | T _m | |
|------------|----------------|------------|
| | Wild tipe | Mutant |
| DPYD*2A | 50.5°C ± 2 | 57.0°C ± 2 |
| DPYD*13 | 59.0°C ± 2 | 52.0°C ± 2 |
| DPYD D949V | 52.0°C ± 2 | 57.0°C ± 2 |
| DPYD IVS10 | 48.5°C ± 2 | 57.5°C ± 2 |
| DPYD V732I | 48.0°C ± 2 | 58.5°C ± 2 |

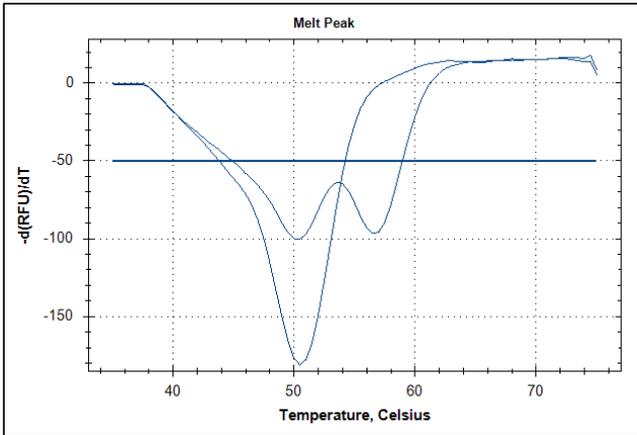
If both peaks are present (wild type and mutant), sample should be considered heterozygous.

Important: if heterozygous samples are found, evaluate the raw data in order to exclude the inclusion of non-specific peaks.

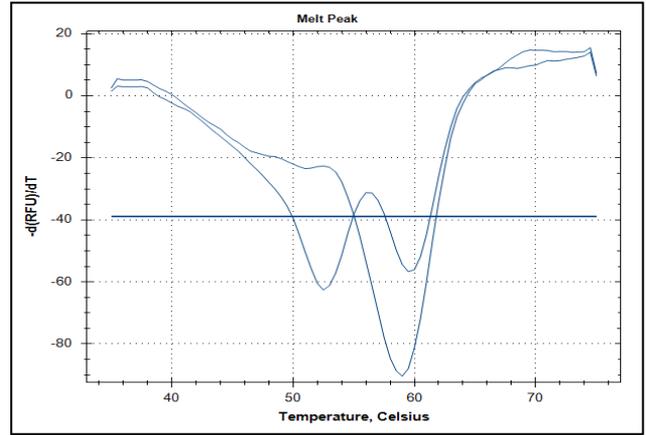
⇒ For automatic interpretation of results and report generation, use the **Real-PHARMA** software following the NLM code **DO041** user manual or RealGene software, NLM **DO022** code.

The Positive Control inclusion in the run is optional. Non-compliant CP results do not invalidate the run.

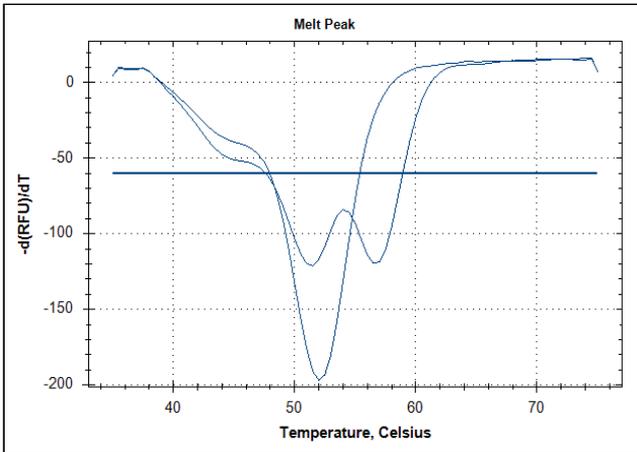
Warning: the amplification curves do not contain useful information for genotyping which is based only on peaks T_m.



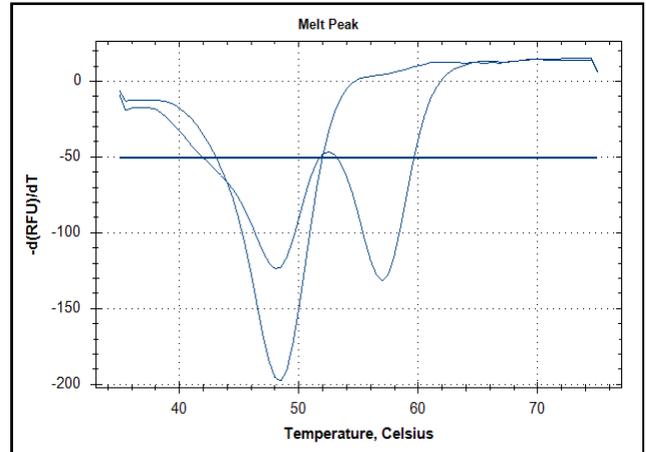
Wild type and heterozygous samples analyzed with **DPYD*2A** mix



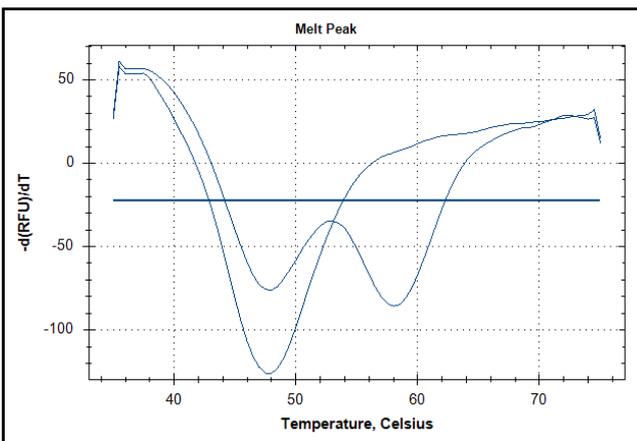
Wild type and heterozygous samples analyzed with **DPYD*13** mix



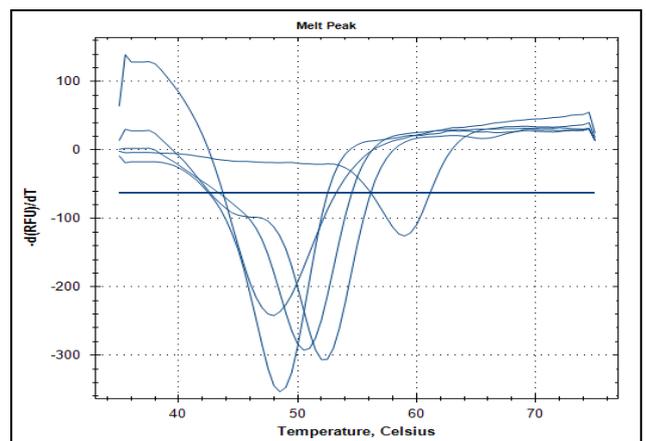
Wild type and heterozygous samples analyzed with **DPYD D949V** mix



Wild type and heterozygous samples analyzed with **DPYD IVS10** mix



Wild type and heterozygous samples analyzed with **DPYD V732I** mix



Wild type sample for all five variants and threshold selection

Figure 2. Wild type and heterozigous samples analyzed with DPYD Mastermixes

WARNING

As every system based on amplification and detection of nucleic acids, it is possible to have unexpected results in the presence of genetic mutation in the primer and/or probe specific target regions.

Figure 3 share the T_m of rs17376848 and rs3918289 SNPs that are close to DPYD*2A mutation and which have a relevant frequency in the population:

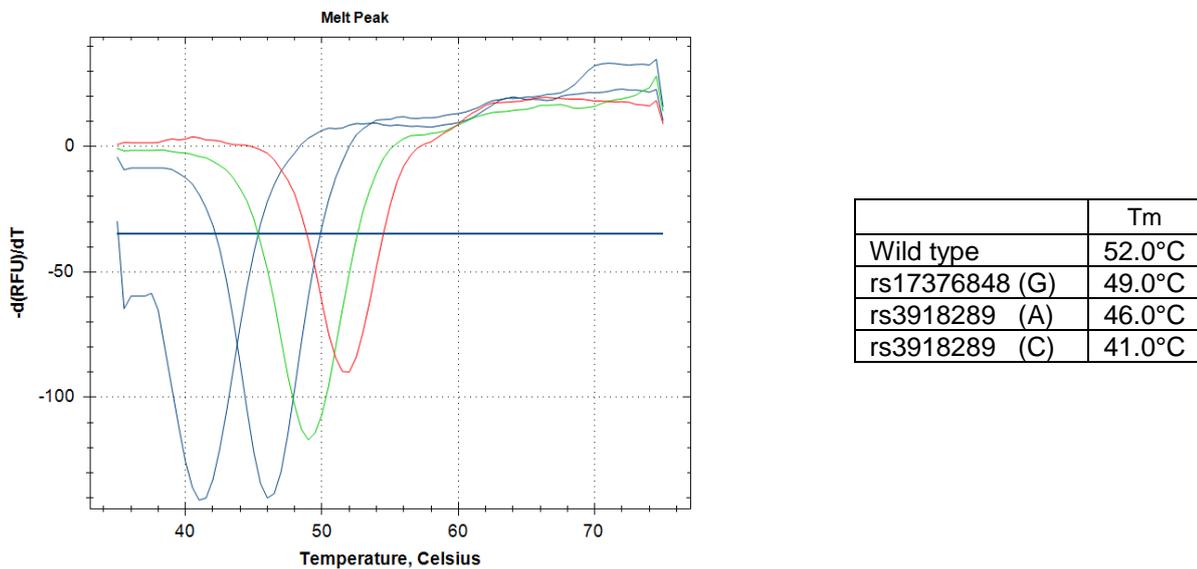


Figure 3. Shift of wild type peak (red) in presence of SNPs rs17376848 (green) e rs3918289 (blue). Result obtained using synthetic targets.

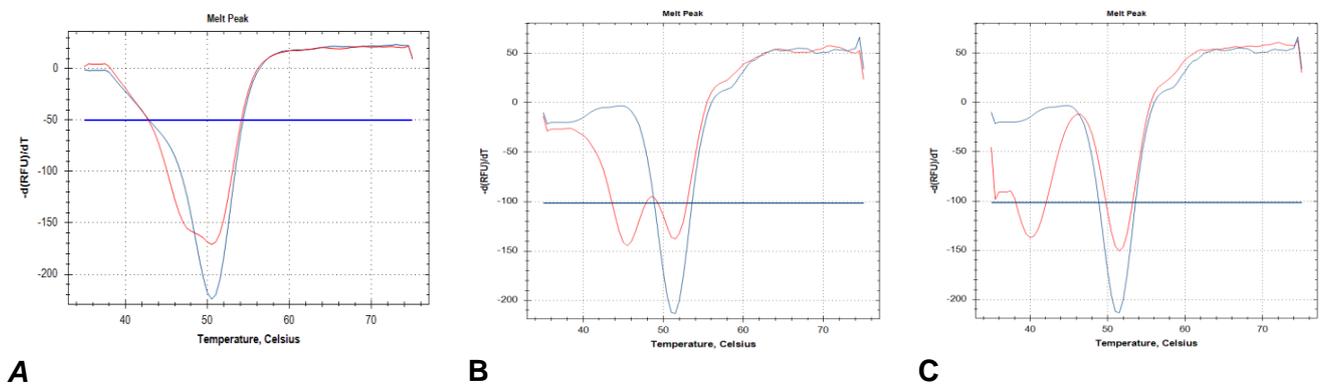


Figure 4. (A) Heterozygous sample for SNPs rs17376848 (red) compared with wild type (blue); (B) synthetic samples heterozygous for SNPs rs3918289A and (C) rs3918289C (red) compared with wild type (blue).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of "DPYD Real time (FRET)" kit, expressed as the minimum quantity of the target that can be detected, is 5 ng/µl of DNA (equivalent to 20 ng/reaction).

Diagnostic Sensitivity

Diagnostic sensitivity of "DPYD Real Time (FRET)" kit was assessed by analyzing 30 DNA samples with different genotypes.

All samples were correctly genotyped, resulting in a diagnostic sensitivity of 100%.

Diagnostic Specificity

The specificity "DPYD Real Time (FRET)" kit was determined by analyzing 30 DNA samples with different genotypes. No false positive results were obtained.

In agreement with these data the specificity of the kit is 100%.

Reproducibility

Intra-assay reproducibility

Intra-assay reproducibility was assessed by analyzing 3 samples of different genotype in 4 replicates in the same run and on different instruments.

Inter-assay reproducibility

Inter-assay reproducibility was assessed by analyzing 3 samples of different genotype in 4 replicates in different run and on different instruments.

On the basis of the results obtained the reproducibility is 100%.

