

Istruzioni d'uso

ver. 2 - 19/04/2022

Biologia Molecolare

Estrazione non compresa

UGT1A1 Real Time (FRET)

REF

AA1628/24A

CE



24 TEST

CND

W010699

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 **AA1628/24A** fornisce il materiale necessario per l'analisi nel DNA genomico umano di quattro varianti alleliche presenti nel promotore del gene UGT1A1 (UDP glucuronosiltransferasi isoforma 1A1): UGT1A1*1, UGT1A1*28, UGT1A1*36 e UGT1A1*37.

Il dispositivo può essere utilizzato nel contesto di personalizzazione della terapia con irinotecano oppure per confermare la diagnosi di sindrome di Gilbert.

Il kit è costituito da un'unica mix (comprensiva di enzima di amplificazione) e si basa sull'amplificazione delle sequenze bersaglio e successiva analisi delle curve di melting.

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

L'enzima UDP glucuronosiltransferasi isoforma 1A1 viene codificato dal gene UGT1A1 e ha la funzione di trasformare metaboliti lipofili in composti idrosolubili che possono quindi essere secreti nelle urine e nella bile. Tra questi metaboliti ci sono la bilirubina, gli steroidi, le tossine e l'irinotecano (nome commerciale Camptosar), un farmaco largamente utilizzato per il trattamento del cancro al colon-retto in stadio avanzato o metastatico che può però causare grave tossicità gastrointestinale (diarrea) ed ematologica (neutropenia).

La trascrizione del gene UGT1A1 è influenzata dalla lunghezza della TATA box nel suo promotore, poiché un aumento del numero delle ripetizioni TA determina una riduzione dell'attività trascrizionale:

- UGT1A1*1** [(TA)₆TAA] è considerato l'allele wild type associato ad una normale attività enzimatica
- la variante **UGT1A1*28** [(TA)₇TAA] contiene un'extra ripetizione timina-adenina che comporta una diminuzione della trascrizione del gene; se presente in omozigosi provoca una riduzione del 70% dell'attività enzimatica che è associata a sindrome di Gilbert (una forma lieve di iperbilirubinemia) e ad una maggior predisposizione agli effetti tossici dell'irinotecano
- la variante allelica **UGT1A1*37** [(TA)₈TAA], caratterizzata da 8 ripetizioni TA, è associata ad una ridotta attività enzimatica paragonabile a quella osservata in presenza dell'allele *28
- al contrario, la variante **UGT1A1*36** [(TA)₅TAA] con sole 5 ripetizioni TA è associata ad un'aumentata attività enzimatica che riduce il rischio di sviluppare effetti tossici in seguito a terapia con irinotecano.

Le varianti *36 e *37 sono quasi esclusivamente presenti nella popolazione africana mentre la variante *28 è principalmente diffusa tra la popolazione afro-americana e caucasica.

Il documento redatto da AIOM-SIF nel 2019 raccomanda di effettuare l'analisi farmacogenetica UGT1A1 al fine di prevenire reazioni avverse potenzialmente molto gravi all'irinotecano. Nel caso venga rilevata la presenza in omozigosi della variante *28 viene infatti consigliata una riduzione della dose di farmaco somministrato:

Genotipo UGT1A1		Dose consigliata di irinotecano
Wild-type	*1/*1	100%
Eterozigote	*1/28	100%
Omozigote mutato	*28/*28	70%

Ai fini della personalizzazione della terapia, l'allele *36 è assimilabile all'allele *1 mentre l'allele *37 è assimilabile all'allele *28.

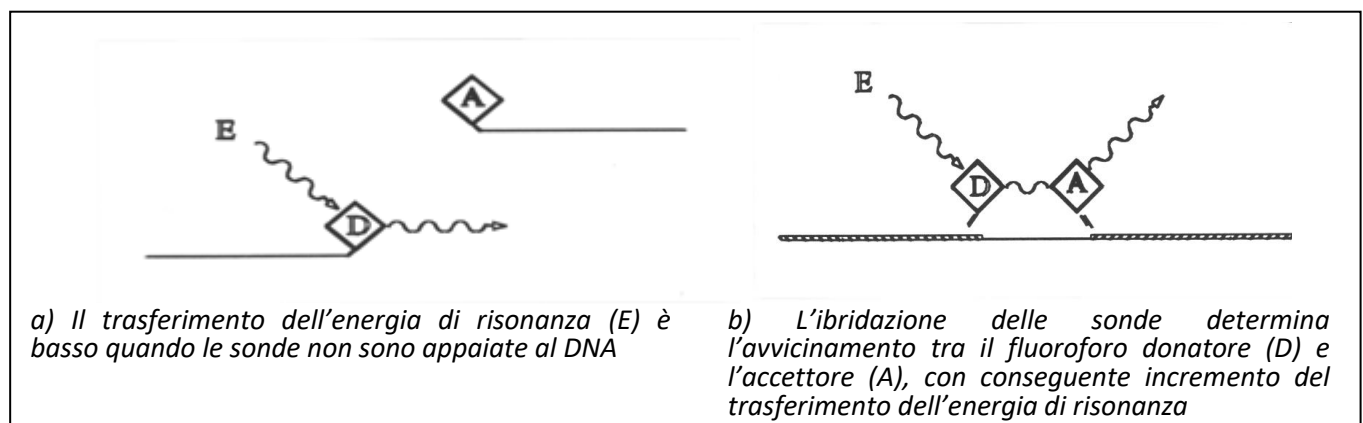
BIBLIOGRAFIA

- AIOM-SIF, Raccomandazioni 2019 per analisi farmaco genetiche
- Barbarino *et al*, Pharmacogenet Genomics 2014; 24(3): 177–183
- Cecchin *et al*, Drug Resist Updat 2018; 39:18-40
- Deal, Medical Genetics Summaries, updated 2018; 1-12
- Shulman *et al*, Cancer 2011; 117(14): 3156–3162
- Takano and Sugiyama, Pharmacogenomics and Personalized Medicine 2017; 10: 61–68
- <https://www.pharmgkb.org/guideline/PA166127626>

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. La sonda in 5' è complementare al filamento di DNA che porta la sequenza mutata $[(TA)_8TAA]$; l'ibridazione tra i due sarà più stabile rispetto al duplex tra la sonda medesima ed il filamento che porta sequenze diverse ($[(TA)_7TAA]$, $[(TA)_6TAA]$, $[(TA)_5TAA]$), con conseguente picco di dissociazione ad una temperatura più elevata. Mediante l'analisi della curva di melting si possono pertanto distinguere le diverse varianti in base alla posizione dei picchi: si osserva un picco singolo (a quattro diverse temperature a seconda della variante considerata) per i campioni omozigoti e un doppio picco per gli eterozigoti.



COMPOSIZIONE DEL PRODOTTO

Conservazione a -25/-15°C



Reagenti	codice NLM	N° vial	Volume/vial
MasterMix UGT1A1 , tappo rosso Soluzione contenente oligonucleotidi, sonde fluorescenti ed enzimi	KA1313-n	1	470 µl
Acqua DNAsi, RNAsi, Proteasi free , tappo trasparente	AZ040-n	1	150 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 la MasterMix in ghiaccio o a +2/+8°C
- Le sonde contenute nella 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 e puntali con filtro monouso
- Strumento per amplificazione Real Time PCR
- Strip o piastre da 0.2 ml per Real Time PCR, trasparenti
- Controllo Positivo eterozigote, monouso (cod. NLM FA165/10)



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 altri sistemi automatici seguire 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 il set-up di PCR effettuato in manuale, procedere come descritto di seguito:

Reagente	Volume per campione
MasterMix UGT1A1	13 μl
Acqua DNAsi, RNasi, Proteasi free	3 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

CFX Real Time PCR (Biorad)



Per l'utilizzo dello strumento, scaricare il manuale d'uso (cod. NLM **DX007**) dal sito www.nlm.it.

IMPOSTAZIONE DEL PROFILO TERMICO

Impostare *Sample Volume*: 20 µl

Inserire il seguente profilo termico:

- 1 95,0° C for 2:00
- 2 95,0° C for 0:20
- 3 60,0° C for 0:20 + Plate Read
- 4 72,0° C for 0:10
- 5 **GOTO 2, 49 more times**
- 6 95,0° C for 1:00
- 7 30,0° C for 3:00
- 8 Melt Curve 30,0 to 60,0° C, increment 0,3° C for 0:05 + Plate Read

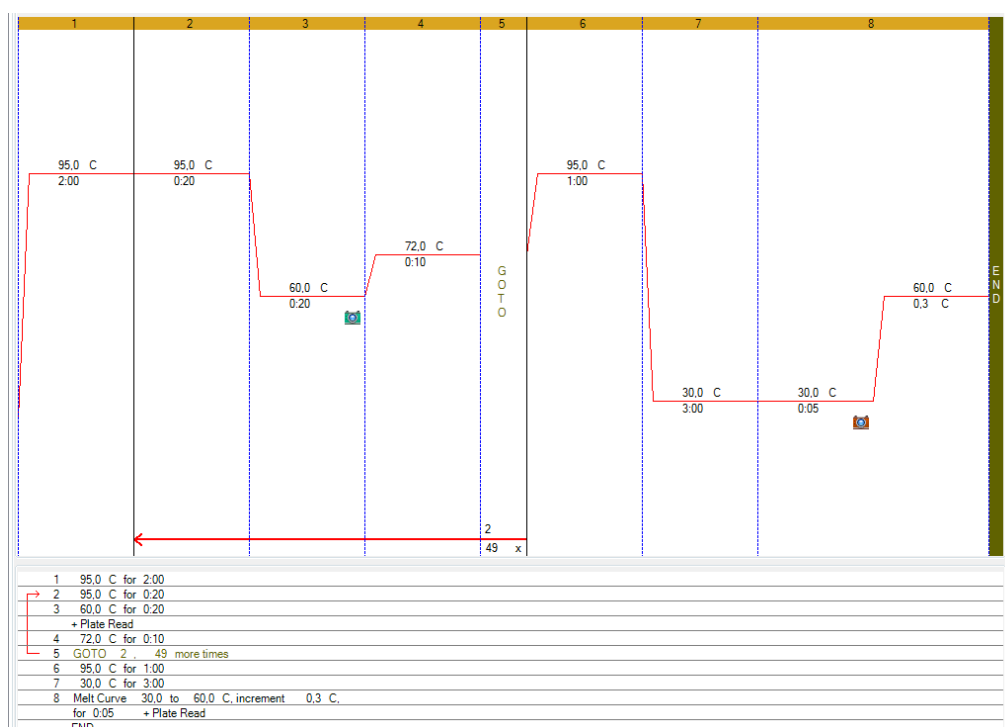


Figura 1. Riproduzione del profilo termico, così come visualizzato nel programma dello strumento.

SETUP DELLA PIASTRA

Impostare la piastra come indicato di seguito:

- Scan mode → SYBR/FAM only
- Select Fluorophores → FAM
- Selezionare *Target Name* ed inserire la descrizione riportata nella tabella sottostante:

Target	Fluoroforo
UGT1A1	FAM

- Per i campioni da analizzare selezionare *Sample Type* → Unknown
- Per i Controlli Positivi selezionare *Sample Type* → Positive Control
Sample name → ctrl1-28 oppure ctrl36-37
- Per i Controlli Negativi (No Template Control) selezionare *Sample Type* → NTC



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.



Target		Tm
UGT1A1*36	[(TA) ₅ TAA]	39°C ±1,5
UGT1A1*1	[(TA) ₆ TAA]	43,5°C ±1,5
UGT1A1*28	[(TA) ₇ TAA]	47°C ±1,5
UGT1A1*37	[(TA) ₈ TAA]	51,5°C ±1,5

In presenza di due picchi il campione deve essere considerato eterozigote.

Importante: si consiglia di valutare anche il dato grezzo in modo da escludere eventuali picchi aspecifici.

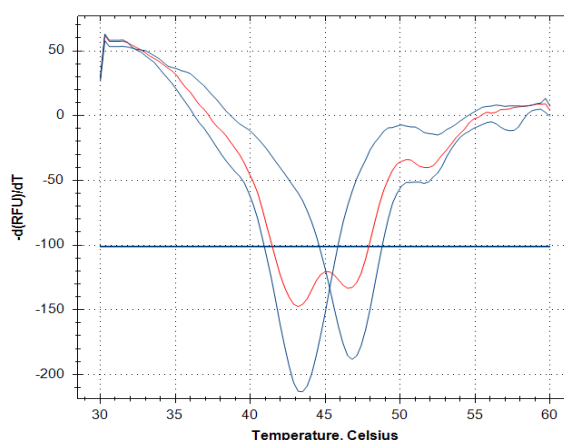
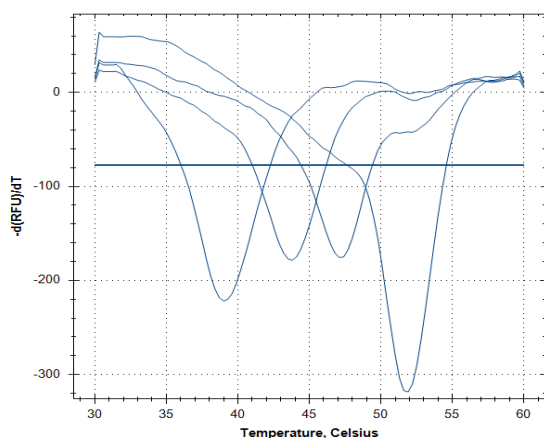


Per l'interpretazione automatica dei risultati e la generazione del report, utilizzare il programma **Real-PHARMA** seguendo il manuale cod. NLM **DO041**.

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 sulla Tm dei picchi
- Non considerare i picchi che cadono al di fuori del range indicato
- 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.



Picchi associati ai quattro polimorfismi UGT1A1*1, UGT1A1*28, UGT1A1*36 e UGT1A1*37
Campioni omozigoti UGT1A1*1 e UGT1A1*28 (blu);
campione eterozigote UGT1A1*1/*28 (rosso)

Figura 2. Esempio di campioni omozigoti ed eterozigoti analizzati con la MasterMix UGT1A1

POSSIBILI PROBLEMI

Campioni eterozigoti UGT1A1*1/*28 e UGT1A1*1/*36

E' possibile che campioni eterozigoti *1/*28 o *1/*36 mostrino un doppio picco poco definito o sbilanciato (campione in rosso, Figura 3). La scarsa qualità del risultato potrebbe essere causata dall'utilizzo di un campione di sangue non fresco oppure di un estratto di DNA congelato e scongelato molte volte.

Si consiglia quindi di utilizzare sempre sangue ed estratti di DNA freschi (ossia non congelati e scongelati un numero elevato di volte) e di valutare sempre il dato grezzo prima di attribuire il genotipo al campione.

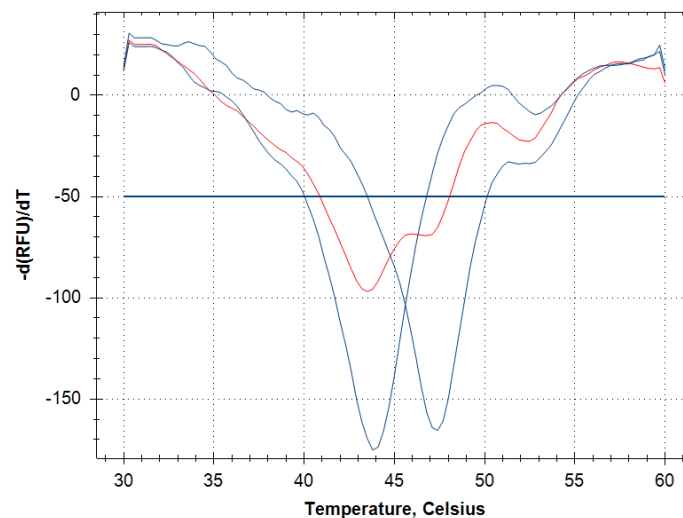


Figura 3. Campioni omozigoti UGT1A1*1 e UGT1A1*28 (blu); campione eterozigote *1/*28 (rosso)

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del kit, espressa come la quantità minima di marcatore bersaglio che può essere esattamente rilevata, è pari a 1 ng/µl di DNA (equivalente a 4 ng per reazione).

Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica del kit è stata valutata analizzando 36 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 è stata determinata testando 36 campioni a genotipo noto. Non sono stati ottenuti risultati falsi positivi, pertanto la specificità del kit è pari al 100%.

Riproducibilità

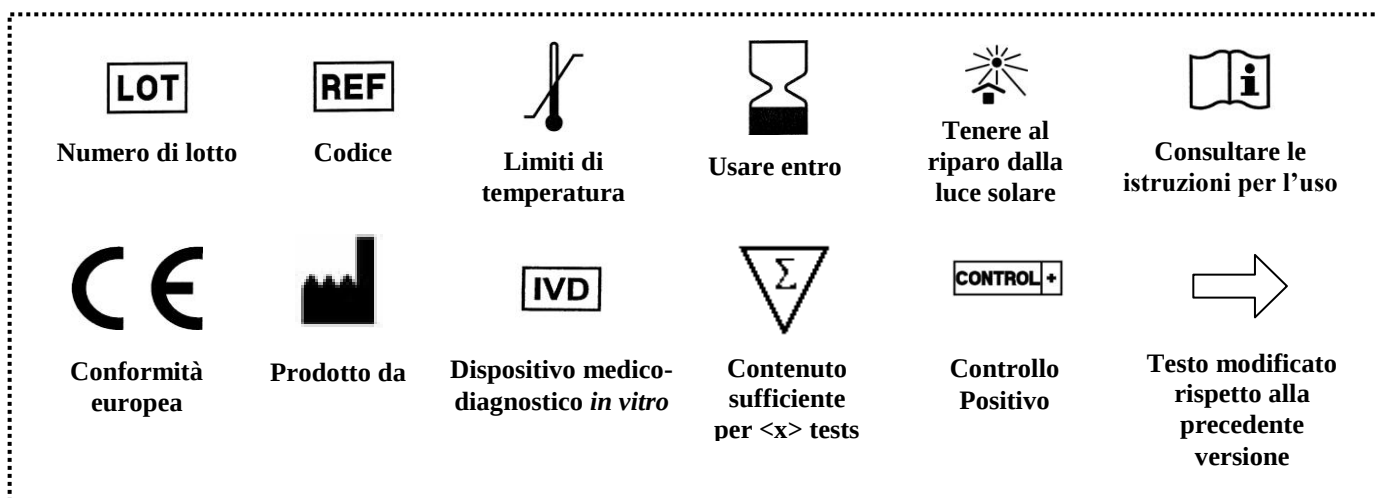
Riproducibilità intrasaggio

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

Riproducibilità intersaggio

La riproducibilità intersaggio è stata valutata analizzando campioni a diverso genotipo in 3 diverse sedute.

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



Instructions for Use

ver. 2 - 19/04/2022

Molecular Biology

Extraction not included

UGT1A1 Real Time (FRET)



AA1628/24A



24 TEST

GMDN

60126



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 **AA1628/24A** device provides the material for the analysis in human genomic DNA samples of four allelic variants present in the UGT1A1 (UDP-glucuronosyltransferase 1A1 isoform) gene promoter: UGT1A1*1, UGT1A1*28, UGT1A1*36 e UGT1A1*37.

The device is useful before to start a therapy with irinotecan or to confirm the diagnosis of Gilbert's syndrome.

The device is composed by one mix (including amplification enzyme) and it is based on amplification of the target sequences and analysis of melting curves.

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

Irinotecan (brand name Camptosar) is a drug widely used in the treatment of advanced or metastatic colorectal cancer. Irinotecan therapy is associated with a high incidence of toxicity, including severe neutropenia and diarrhea. Irinotecan is inactivated by a UDP-glucuronosyltransferase (UGT) enzyme encoded by the UGT1A1 gene that transforms lipophilic metabolites (such as bilirubin, steroids, toxins, and drugs) into water-soluble metabolites that can be excreted from the body.

UGT1A1 gene transcriptional activity is affected by the length of the TATA box in the promoter, because a larger number of TA repeats results in reduced transcriptional activity:

- UGT1A1*1** [(TA)₆TAA] is the wild type allele associated with normal enzyme activity
- UGT1A1*28** [(TA)₇TAA] variant contains an extra thymine-adenine (TA) repeat associated with a decrease of transcriptional activity of the gene; the presence of two copies of this variant results in about a 70% decrease that is associated with Gilbert's syndrome (a mild form of conjugated hyperbilirubinemia) and predisposition to severe toxicity of irinotecan
- UGT1A1*37** [(TA)₈TAA] characterized by 8 TA repetitions, it is associated with a reduced enzymatic activity comparable to that observed in the presence of the allele * 28
- UGT1A1*36** [(TA)₅TAA] allele, has only 5 TA repeats and is associated with increased promoter activity with reduced risk to develop irinotecan toxicity.

*36 e *37 variants occur almost exclusively in African population while *28 allele is commonly found in African-American and Caucasian population.

AIOM-SIF document, presented in 2019, recommend pharmacogenetic analysis of UGT1A1 in order to prevent potentially serious adverse reactions to irinotecan therapy. If the homozygous presence of the variant * 28 is detected, a reduction in the dose of drug administered is in fact recommended:

UGT1A1 Genotype		Recommended irinotecan dose
Wild-type	*1/*1	100%
Heterozygous	*1/*28	100%
Mutated homozygous	*28/*28	70%

For the customization of irinotecan therapy, the allele *36 can be interpreted as an *1 allele and allele *37 as an allele *28.

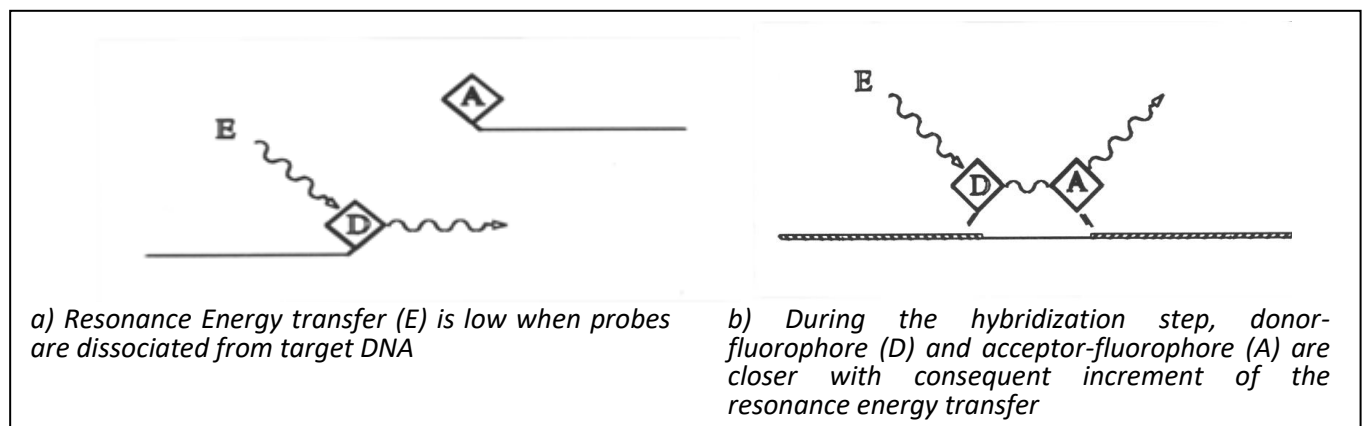
REFERENCES

- AIOM-SIF, Raccomandazioni 2019 per analisi farmaco genetiche
- Barbarino *et al*, Pharmacogenet Genomics 2014; 24(3): 177–183
- Cecchin *et al*, Drug Resist Updat 2018; 39:18-40
- Deal, Medical Genetics Summaries, updated 2018; 1-12
- Shulman *et al*, Cancer 2011; 117(14): 3156–3162
- Takano and Sugiyama, Pharmacogenomics and Personalized Medicine 2017; 10: 61–68
- <https://www.pharmgkb.org/guideline/PA166127626>.

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. The 5' probe is complementary to the [(TA)₈TAA] variant; the hybridization between the two sequences will be more stable than the duplex between the probe itself and the strand with [(TA)₇TAA], [(TA)₆TAA] or [(TA)₅TAA] variants, with consequent peak of dissociation to an higher temperature. Therefore, through the melting curve analysis it is possible to distinguish the four different genotypes based on the peak positions: a 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 UGT1A1 , red cap Solution containing oligonucleotides, fluorescent probes and enzymes	KA1313-n	1	470 µl
DNase, RNase, Protease-free water , transparent cap	AZ040-n	1	150 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, clear
- Real Time PCR instruments
- Heterozygous positive control, single use (cod. NLM FA165/10).



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 the manual PCR set up, proceed as follows:

Reagents	Volume/sample
MasterMix UGT1A1	13 μl
DNase, RNase, Protease-free water	3 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 ANALYSIS

CFX Real Time PCR (Biorad)



For **CFX96 (Biorad)** instrument use, download the Instructions for Use (NLM code **DX007**) from the www.nlm.it.

THERMAL PROFILE

Setting up *Sample Volume*: 20 µl

Enter the following thermal profile:

- 1 95,0° C for 2:00
- 2 95,0° C for 0:20
- 3 60,0° C for 0:20 + Plate Read
- 4 72,0° C for 0:10
- 5 **GOTO 2, 49 more times**
- 6 95,0° C for 1:00
- 7 30,0° C for 3:00
- 8 Melt Curve 30,0 to 60,0° C, increment 0,3° C for 0:05 + Plate Read

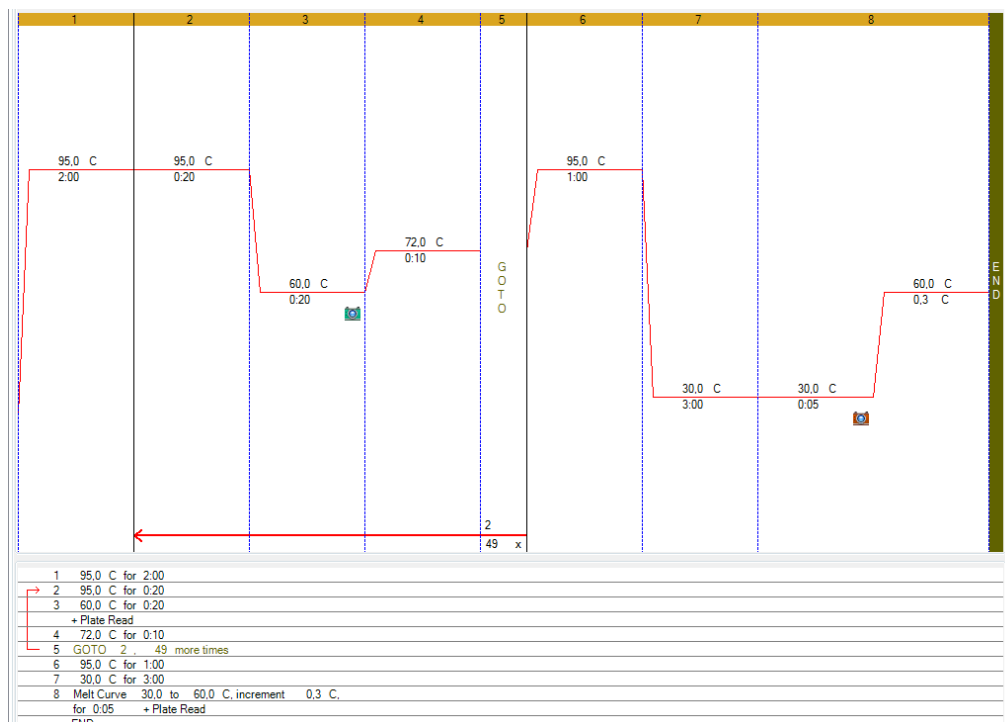


Figure 1. Reproduction of the thermal profile, as displayed in the instrument program.

Plate Setup

- Scan mode → SYBR/FAM only
- Select Fluorophores → FAM
- Select Target Name and enter the description shown in the table below:

Target	Fluoroforo
UGT1A1	FAM

- Select Sample Type → Unknown for the samples to be run
- Select Sample Type → Positive Control for Positive controls
Sample Name → ctrl1-28 or ctrl36-37
- Select Sample Type → NTC for Negative controls (No Template Control)



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.



Target		Tm
UGT1A1*36	[(TA) ₅ TAA]	39°C ±1.5
UGT1A1*1	[(TA) ₆ TAA]	43,5°C ±1.5
UGT1A1*28	[(TA) ₇ TAA]	47°C ±1.5
UGT1A1*37	[(TA) ₈ TAA]	51,5°C ±1.5

If two peaks are present, 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.

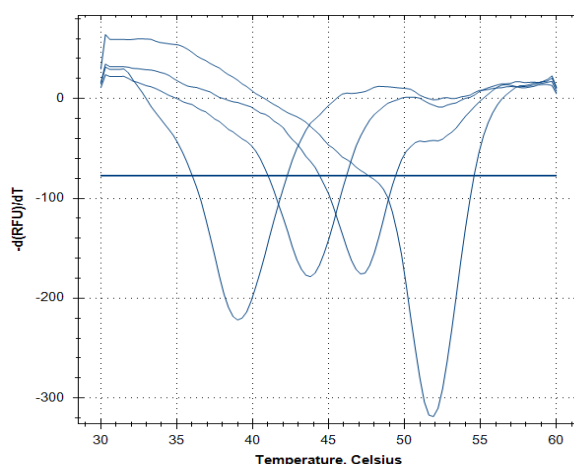


For automatic interpretation of results and report generation, use the **Real-PHARMA** program following the NLM code **DO041** user manual.

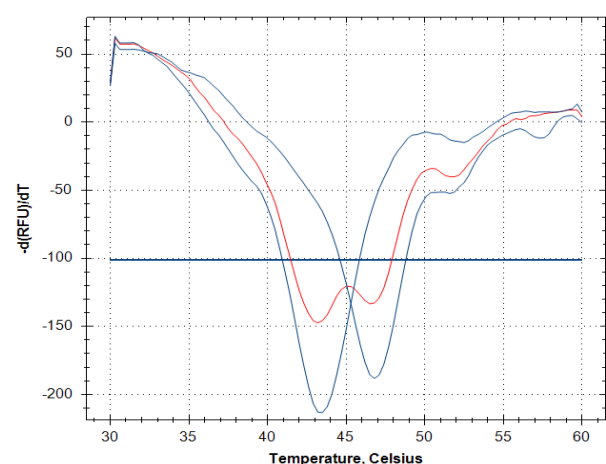
Positive Control inclusion in the run is optional. Non-compliant CP results do not invalidate the run.

Warning

- The amplification curves do not contain useful information for genotyping which is based only on peaks Tm
- Do not consider peaks out of the temperature range
- 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.



Peaks of four UGT variant: *1, *28, *36 and *37



Homozygous sample for UGT1A1*1 e UGT1A1*28 (blue); heterozygous sample UGT1A1*1/*28 (red)

Figure 2. Homozygous and heterozygous samples analyzed with UGT1A1 MasterMix

TROUBLESHOOTING

Heterozygous sample UGT1A1*1/*28 and UGT1A1*1/*36

It's possible that heterozygous samples *1/*28 or *1/*36 share an unbalanced double peak (red sample, Figure 3). This result could be associated with blood or DNA sample of low quality. It is recommended to use sample thawed only few times and to evaluate raw data before to assign the genotype.

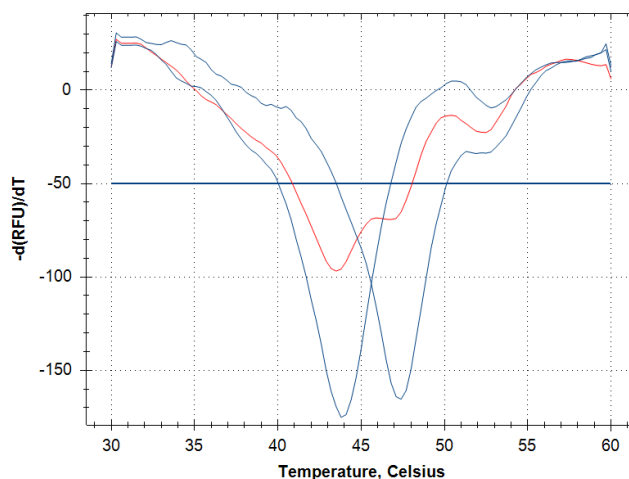


Figure 3. UGT1A1*1 and UGT1A1*28 samples (blue); *1/*28 sample (red)

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of "UGT1A1 Real Time (FRET)" kit, expressed as the minimum quantity of the target that can be detected, is 1 ng/μl of DNA (equivalent to 4 ng/reaction).

Diagnostic Sensitivity

Diagnostic sensitivity of "UGT1A1 Real Time (FRET)" kit was assessed by analyzing 36 DNA samples with different genotypes.

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

Diagnostic Specificity

The specificity "UGT1A1 Real Time (FRET)" kit was determined by analyzing 36 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 samples with different genotype in 3 replicates in the same run.

Inter-assay reproducibility

Inter-assay reproducibility was assessed by analyzing samples with different genotype in 3 different runs.

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

LOT

Lot Number

REF

Catalogue
number



Temperature
Limitation



Use by



Keep away
from sunlight



Consult Instructions
for use



European
Conformity



Manufacturer

IVD

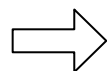
in vitro diagnostic
device



Sufficient for

CONTROL +

Positive
Control



Modified text
compared with
the previous
version