

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien
Zellkultur & Verbrauchsmaterial
Diagnostik & molekulare Diagnostik
Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten! See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart siehe unsere Liefer- und Versandbedingungen

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien T. +43(0)1 489 3961-0 F. +43(0)1 489 3961-7 <u>mail@szabo-scandic.com</u> www.szabo-scandic.com



DPYD (5 gene mutations)

Determination of the DPYD gene polymorphisms in Real Time PCR

REV ST.RT-104-ENITA.1

REF RT-104 - 24 tests

Instructions For Use

INTENDED USE/PURPOSE

The **DPYD** (5 gene mutations) kit is a qualitative in vitro nucleic acid amplification test for the detection of the 5 polymorphisms of the DPYD (Dihydropyrimidine dehydrogenase) gene involved in the metabolism of 5-fluorouracil, the most widely used fluoropyrimidine drug, from genomic DNA extracted from peripheral whole blood samples collected in EDTA.

This genetic test allows the identification of the allelic variants for the specific polymorphisms associated with predisposition to the toxicity against fluoropyrimidines drugs. This kit is for diagnostic research use only (RUO) and not for in vivo use.

List of detectable polymorphisms:

Allele Variant	Reference SNP	HGVS	AA Variation
DPYD*2A	rs3918290	c.1905+1G>A	VS14+1G>A
\	rs75017182	c.1129-5923C>G	IVS10C>G
DPYD*13	rs55886062	c.1679T>G	c.1679T>G
\	rs67376798	c.2846A>T	p.D949V
DPYD*6	rs1801160	c.2194G>A	p.V732I

The analysis of the results is made by an instrument of Real Time PCR, composed by a thermal cycler with a system of fluorescence detection.

CONTENT

The kit contains reagents enough to perform 24 amplification tests:

	Quantity	Descrizione
R1	2 x 540 μl	Amplification mMix dNTPs, Tris-HCl, KCl, MgCl ₂ , Taq Polymerase, Nuclease-free water, ROX
R2	2 x 110 μl	DPYD probe mix 1 c.1905+1G>A primers, c.1905+1G>A WT Probe (FAM), c.1905+1G>A MUT Probe (VIC/HEX), c.1129-5923C>G primers, c.1129-5923C>G WT Probe (Texas Red), c.1129-5923C>G MUT Probe (Cy5), Nuclease-free water
R3	2 x 110 μl	DPYD probe mix 2 c.2846A>T primers, c.2846A>T WT Probe (FAM), c.2846A>T MUT Probe (VIC/HEX), c.1679T>G primers, c.1679T>G WT Probe (Texas Red), c.1679T>G MUT Probe (Cy5), Nuclease-free water
R4	2 x 110 μl	DPYD probe mix 3 c.2194G>A primers, c.2194G>A WT Probe (FAM), c.2194G>A MUT Probe (Cy5)
R5	2 x 35 μl	Positive control DPYD Wild-Type Cloned DNA corresponding to Wild-Type of 5 gene mutations DPYD
R6	2 x 35 μl	Positive Control DPYD Mutated Cloned DNA corresponding to Mutated of 5 gene mutations DPYD
R7	2 x 30 μl	Negative control

MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

Disposable latex powder-free gloves or similar material; Benchtop microcentrifuge (12,000 - 14,000 rpm); Micropipettes and Sterile tips with aerosol filter;

Vortex:

Suitable plasticware (microplates with optical adhesive cover or optical microtubes);

Thermoshaker for 1.5ml conical tubes

Magnetic rack for 1.5ml conical tubes

Reagents

The **DPYD** (5 gene mutations) kit was developed to be used with the following extraction method:

Manual Extraction

Ref. 51304/51306

QIAmp DNA mini kit. The kit allows the manual DNA extraction from Human samples. The kit contains sufficient reagents to perform DNA extraction for 50/250 samples. (QIAGEN)

Automatic extraction

Ref. OP02001. CloNext Blood DNA Extraction Kit The kit allows the automatic DNA extraction from Human samples. The kit contains reagents for 48 samples.

ELITe InGenius®SYSTEM

ELITe InGenius® (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030)

- For automatic sample analysis with the instrument «ELITe InGenius[®]» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) the following generic products are required:
 - The extraction cartridges «ELITe InGenius[®] SP 200» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200)
 - The consumables for extraction of nucleic acids from biological samples «ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT032CS),
 - The box for tips waste «ELITe InGenius[®] Waste Box» (ELITechGroup S.p.A, ref. F2102-000),
 - The cassettes for amplification of nucleic acids «ELITe InGenius® PCR Cassette» (ELITechGroup S.p.A, ref. INT035PCR),

• The filter tips for the single noozle pipettor «300 µL Filter Tips Axygen» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, ref. TF-350-L-R-S).

The equipment should be regularly maintained, in accordance with the manufacturer's instructions, and calibrated to ensure an optimal performance.

Instruments

The DPYD (5 gene mutations) kit was developed and validated to be used with the following instruments:

Extraction System

• CloNext 12 or CloNext 24 (ref. OP01018/OP01019)

Robotic Workstation for the automatic purification of the nucleic acids.

Real Time PCR

- 7500 Fast from Lifetechnologies
- CFX96 Real Time PCR System from Bio-Rad
- Rotor-Gene Q MDx from QIAGEN

Sample to Result System

- ELITe InGenius®SYSTEM (Ref. INT030)
 - Fully automated device for extraction and purification of nucleic acids, amplification and detection of the target by Real Time PCR and interpretation of the result (ELITechGroup S.p.A.)

Please ensure that the instruments have been installed, calibrated, checked and maintained according to the manufacturers' instructions and recommendations.

SAMPLES

The **DPYD (5 gene mutations)** system must be used with extracted DNA from the following biological samples: **peripheral whole Blood collected in EDTA**. Collected samples must be shipped and stored at +2 - +8°C and used within 3 days from the collected data. Store the sample at -20°C if it is used after 3 days.

PRECAUTIONS FOR USE

- This kit is for diagnostic research use only (RUO) and not for in vivo use.
- Carefully read this Instruction For Use before using the kit.
- If required, Clonit offers the necessary technical support for the correct use of the kit.
- In compliance with Good Laboratory Practice, define three separate laboratory's areas for: DNA extraction, PCR reaction mix preparation; manipulation
 of controls provided with the kit. Each area must have dedicated pipettes and laminar flow hood.
- Periodically wipe the working area with 0,5% hypochlorite.
- Wear protective clothing such as laboratory coats and disposable gloves while assaying samples.
- Use powder-free gloves. Do not leave fingerprints on optical caps. Do not write on caps as this may cause an interference with fluorescent detection.
- Avoid any contact between hands and eyes or nose during specimen collection and testing.
- Materials containing or potentially containing infectious agents must always be manipulated in a separated microbiological safety room under a Biohazard biological hood. Waste should be discarded according to local law.
- Never pipette solutions by mouth.
- Use calibrated and regularly checked pipettes and instrumentation only.
- Avoid the air bubbles during the master mix dispensing. Eliminate them before starting amplification.
- Wash hands carefully after handling samples and reagents.
- Do not eat, drink or smoke in the area where specimens and kit reagents are handled.
- Provided reagents are not infectious and hazardous for the health (see Material Safety data Sheet MSDS).
- The ELITE InGenius[®] PCR Cassettes must be handled in such a way to reduce as much as possible amplification product diffusion into the environment in order to avoid sample and reagent contamination.

LIMITS OF THE METHOD

The extreme sensitivity of gene amplification may cause false positives due to cross-contamination between samples and/or controls. Therefore, you should:

- physically separate all the products and reagents used for amplification reactions from those used for other reactions, as well as from post-amplification products
- use tips with filters to prevent cross-contamination between samples
- use disposable gloves and change them frequently
- carefully open test tubes to prevent aerosol formation
- close every test tube before opening another one

As with any diagnostic test, the results obtained with this product must be interpreted taking into consideration all the clinical data and other laboratory tests available for the patient

As with any diagnostic test, there is a residual risk of obtaining invalid, false positives or false negatives results with this product.

Patient Drug treatment may interfere with the final result of the molecular biology analysis. The proper functioning of the amplification mix depends on the correct collection, transportation, storage and preparation of a biological sample.

WARNINGS

- Read carefully the instructions for use before using this test.
- Use only DNA extracted from peripheral whole blood collected in EDTA
- Do not mix reagents from different lots.
- Thaw and carefully mix the reagents of the kit before use.
- The PCR mix has to be freshly prepared every time.

After reconstitution, the amplification master mix must be used in one time (12 reactions). Repeated thawing and freezing of reagents (more than twice) should be avoided, as this might affect the performance of the assay. The reagents should be frozen in aliquots, if they are to be used intermittently.

- Do not use beyond the expiration date which appears on the package label.
- Do not use the product when stored at temperatures other than those indicated on the labels or described in this Instructions For Use.
- In case of spillage of the kit contents, please refer to the specific Material Safety Data Sheet (MSDS, available on request).
- In case of damaged package, contact the technical support before using the kit.
- In case of any serious incident that has occurred in relation, a notice shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

STORAGE AND STABILITY

Store the product **DPYD (5 gene mutations)** kit at -20°C.

The DPYD (5 gene mutations) kit is shipped on dry ice. The kit components should be frozen.

If one or more components are not frozen upon receipt or if the tubes have been compromised during transport, contact Clonit srl for assistance. An intact and well stored product has a stability of 12 months from the date of production. Do not use beyond the expiration date which appears on the package label.

Repeat thawing and freezing of reagents (more than twice) should be avoided, as this might affect the performance of the assay. The reagents should be frozen in aliquots, if they are to be used intermittently.

ANALYTICAL PROCEDURE

Manual Extraction Ref. 51304/51306 - QIAmp DNA mini kit (QIAGEN).

Follow the instructions inside the kit QIAmp DNA Mini Kit. Elute the sample in 50 μ l of buffer AE.

Samples are now ready for amplification or storage at -20°C.

Automatic extraction

Ref. OP02001. CloNext Blood DNA Extraction Kit.

Follow the instructions inside the kit CloNext Blood DNA Extraction Kit. Select the protocol starting from 200 µl of samples with the elution of 50 µl. Samples are now ready for amplification or storage at -20°C.

OPERATING PROCEDURE FOR ELITE InGenius®SYSTEM

Before starting the session, referring to the instrument documentation, it is necessary to:

- switch on the ELITe InGenius® and select the login mode "OPEN",
- verify that the amplification controls for DPYD mix 1 (Positive control DPYD Wild-Type, Positive Control DPYD Mutated and Negative Control) were run in association with the amplification reagent lot to be used and that they are approved and valid (Status). If there are not amplification controls approved or valid, run them as described in the following paragraphs;
- verify that the amplification controls for DPYD mix 2 (Positive control DPYD Wild-Type, Positive Control DPYD Mutated and Negative Control) were run in association with the amplification reagent lot to be used and that they are approved and valid (Status). If there are not amplification controls approved or valid, run them as described in the following paragraphs;
- verify that the amplification controls for DPYD mix 3 (Positive control DPYD Wild-Type, Positive Control DPYD Mutated and Negative Control) were run in association with the amplification reagent lot to be used and that they are approved and valid (Status). If there are not amplification
- were run in association with the amplification reagent for to be used and that they are approved the valid (ottac). It diver use that any controls approved or valid, run them as described in the following paragraphs; Choose the type of run, following the instructions on the Graphical User Interface (GUI) for the session setup and using the Assay Protocols provided by ELITechGroup S.p.A. These IVD protocols were specifically validated with the ELITE InGenius® instrument and the cited matrix. The Assay protocol available for sample testing with the DPYD (5 gene mutations) Kit product is described in the table below.

Name	Matrix	Report	Characteristics
Clonit DPYD Mix1_Open_200_200_00	Whole Blood	wildt/no/	Extraction Input Volume: 200 µL Extraction Elute Volume: 200 µL
Clonit DPYD Mix2_Open_200_200_00		heterozygote/ Mutated	Sonication: NO Dilution Factor: 1
Clonit DPYD Mix3_Open_200_200_00			Sample PCR input volume: 5 µL

The DPYD (5 gene mutations) kit product, in association with the ELITe InGenius® system, can be used in order to perform:

- Integrated run (Extract + PCR),

Amplification run, (PCR only),

Amplification Positive Control DPYD WildType, Positive Control DPYD Mutated and Negative Control run (PCR only).

All the parameters needed for the session are included in the Assay protocol available on the instrument and are automatically recalled when the Assay protocol is selected.

INTEGRATED RUN (EXTRACT + PCR),

To setup an integrated run, carry out the following steps as per the GUI:

- 1. Thaw the Amplification Mix and the DPYD probe mix 1 tube and prepare the PCR master mix by carefully mixing the necessary volume for the number of controls to be tested, as reported in the "Preparation of the PCR mix" section. Prepare the Master Mix in a 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005).
- Thaw the Amplification Mix and the DPYD probe mix 2 tube and prepare the PCR master mix by carefully mixing the necessary volume for 2. the number of controls to be tested, as reported in the "Preparation of the PCR mix" section. Prepare the Master Mix in a 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005).
- 3. Thaw the Amplification Mix and the DPYD probe mix 3 tube and prepare the PCR master mix by carefully mixing the necessary volume for the number of controls to be tested, as reported in the "Preparation of the PCR mix" section. Prepare the Master Mix in a 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005).
- Select "Perform Run" from the "Home" screen. 4.
- Ensure that the "Extraction Input Volume" is 200 µL and the Extracted Elute Volume is 200 µL. 5.
- For each Track of interest fill in the "SampleID" (SID) by typing or by scanning the sample barcode. 6.
- 7.
- 8.
- Select the Assay protocol to be used in the "Assay" column Ensure that the "Protocol" displayed is: "Extract + PCR". Select the sample loading position in the "Sample Position" column: 9.
- if a primary tube is used, select "Primary Tube",
- if a secondary tube is used, select "Extraction Tube".10. Click "Next" to continue the setup.
- 11. Load the master mix prepared in step 1 on the "Inventory Block" selected by following the GUI instruction. Click "Next" button to continue the setup.
- 12. Load and check the Tip Racks in the "Inventory Area" selected by following the GUI instruction. Click "Next" button to continue the setup.
- Load the "PCR Cassettes", the "ELITe InGenius® SP 200" extraction cartridges, all the required consumables and the samples to be extracted, 13. following the GUI instruction. Click "Next" to continue the setup.
- 14. Close the instrument door.
- 15. Press "Start" to start the run.

After process completion, the ELITe InGenius® system allows users to view, approve, store the results and to print and save the report.

AMPLIFICATION RUN (PCR ONLY)

To set up the amplification run carry out the following steps as per GUI:

- Thaw the Amplification Mix and the DPYD probe mix 1 tube and prepare the PCR master mix by carefully mixing the necessary volume for 1. the number of controls to be tested, as reported in the "Preparation of the PCR mix" section. Prepare the Master Mix in a 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005).
- Thaw the Amplification Mix and the DPYD probe mix 2 tube and prepare the PCR master mix by carefully mixing the necessary volume for 2. the number of controls to be tested, as reported in the "Preparation of the PCR mix" section. Prepare the Master Mix in a 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005).
- 3. Thaw the Amplification Mix and the DPYD probe mix 3 tube and prepare the PCR master mix by carefully mixing the necessary volume for the number of controls to be tested, as reported in the "Preparation of the PCR mix" section. Prepare the Master Mix in a 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005).
- Select "Perform Run" from the "Home" screen. 4.
- 5. Even if no extraction will be carried out, ensure that the Extraction Input Volume is 200 µL and the Extracted Elute Volume is 200 µL.
- For each Track of interest fill in the "SampleID" (SID) by typing or by scanning the sample barcode. 6.
- Select the Assay protocol to be used in the "Assay" column 7.
- 8. Select "PCR Only" in the "Protocol" column.

- Ensure the sample loading position in the "Sample Position" column is "Elution Tube (bottom row)". Click "Next" to continue the setup. 9.
- 10. Load the master mix prepared in step 1 on the "Inventory Block" selected by following the GUI instruction. Click "Next" button to continue the setup. Load and check the Tip Racks in the "Inventory Area" selected by following the GUI instruction. Click "Next" to continue the setup.
- 11. Load the "PCR Cassette" and the extracted Nucleic Acid samples following the GUI instruction. Click "Next" to continue the setup.
- 12. Close the instrument door.
- 13. Press "Start" to start the run.

After process completion, the ELITe InGenius® system allows users to view, approve, store the results and to print and save the report.

AMPLIFICATION RUN FOR POSITIVE CONTROL WILD TYPE, POSITIVE CONTROL MUTATED AND NEGATIVE CONTROL

Before analysis of any sample, it is mandatory to generate and to approve the amplification controls for the amplification reagent lot that will be used in testina:

as amplification Positive Controls for DPYD mix 1, use the Positive Control DPYD WildType and Positive Control Mutated (provided with this kit)in association with Assay Protocol Clonit DPYD Mix1_Open_PC_00,

- as amplification Negative Control, use the negative control tube (provided with this kit) in

association with Assay Protocol Clonit DPYD Mix1 Open NC 00.

as amplification Positive Controls for DPYD mix 2, use the Positive Control DPYD WildType and Positive Control Mutated (provided with this kit)in association with Assay Protocol Clonit DPYD Mix2_Open_PC_00,

- as amplification Negative Control, use the negative control tube (provided with this kit) in

association with Assay Protocol Clonit DPYD Mix2_Open_NC_00.

as amplification Positive Controls for DPYD mix 3, use the Positive Control DPYD WildType and Positive Control Mutated (provided with this kit)in association with Assay Protocol Clonit DPYD Mix3_Open_NC_00,

- as amplification **Negative Control**, use the negative control tube (provided with this kit) in association with Assay Protocol Clonit DPYD Mix3_Open_NC_00.

To setup the amplification run for amplification controls carry out the following steps as per GUI:

- Thaw the Amplification Mix and the DPYD probe mix 1 tube and prepare the PCR master mix by carefully mixing the necessary volume for 1. the number of controls to be tested, as reported in the "Preparation of the PCR mix" section. Prepare the Master Mix in a 2 mL Sarstedt tube (Ref 72694005)
- Thaw the Amplification Mix and the DPYD probe mix 2 tube and prepare the PCR master mix by carefully mixing the necessary volume for 2. the number of controls to be tested, as reported in the "Preparation of the PCR mix" section. Prepare the Master Mix in a 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005).
- Thaw the Amplification Mix and the DPYD probe mix 3 tube and prepare the PCR master mix by carefully mixing the necessary volume for 3. the number of controls to be tested, as reported in the "Preparation of the PCR mix" section. Prepare the Master Mix in a 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005).
- Select "Perform Run" from the "Home" screen. 4.
- Thaw the Positive Control DPYD Wild Type tube, the Positive Control DPYD Mutated tube and the negative control tube for the session. 5.

6. Transfer at least 10 µl of each control to an "Elution tube" for each mix, provided with the ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set.

- In the Track of interest, select the Assay protocol to be used in the "Assay" column. 7.
- For DPYD mix 1 the Positive Control DPYD 2A WT IVS10 WT and the Positive Control DPYD 2A MUT IVS10 MUT, select the Assay Protocol 8. Clonit DPYD Mix1_Open_PC_00 in the "Assay" column and fill in the lot number and expiry date
- 9. For the Negative Control, select the Assay Protocol Clonit DPYD Mix1_Open_NC_00 in the "Assay" column and fill in the lot number and expiry
- For the Negative Control, select the Assay Protocol Clonit DPYD Mix1_Open_NC_00 in the "Assay" column and fill in the lot number and expiry date of the molecular biology grade water. Click "Next" to continue the setup. For **DPYD mix 2** the Positive Control DPYD 13 WT D949V WT and the Positive Control DPYD 13 MUT D949V MUT, select the Assay Protocol Clonit DPYD Mix2_Open_PC_00 in the "Assay" column and fill in the lot number and expiry date 10.
- For the Negative Control, select the Assay Protocol Clonit DPYD Mix2_Open_NC_00 in the "Assay" column and fill in the lot number and expiry date of the molecular biology grade water. Click "Next" to continue the setup. For **DPYD mix 3** the Positive Control DPYD 6 WT and the Positive Control DPYD 6 MUT, select the Assay Protocol DPYD Mix3_Open_PC_00 in 11.
- 12. the "Assay" column and fill in the lot number and expiry date
- For the Negative Control, select the Assay Protocol DPYD Mix3_Open_NC_00 in the "Assay" column and fill in the lot number and expiry date 13. of the molecular biology grade water. Click "Next" to continue the setup.
- 14. Load the master mix prepared in step 1 on the "Inventory Block" selected by following the GUI instruction. Click "Next" button to continue the setup.
- 15. Load and check the Tip Racks in the "Inventory Area" selected by following the GUI instruction. Click "Next" to continue the setup.
- 16. Load the "PCR Cassettes", the Wild type control tube, Mutated Control and the Negative Control tube following the GUI instruction. Click "Next" to continue the setup.
- Close the instrument door. 17.

18. Press "Start" to start the run.

After process completion, the ELITe InGenius[®] system allows users to view, approve, store the results and to print and save the report.

Review and approval of results

At the end of the run, the "Results Display" screen is automatically shown. In this screen, the sample/control results and the run information are shown. From this screen it is possible to approve the results, print or save the reports ("Sample Report" or "Track Report"). Refer to the ELITE InGenius® instrument user's manual for more details.

The ELITe InGenius® system generates the results with the product **DPYD (5 gene mutations) kit** through the following procedure:

- Validation of amplification Positive Control and Negative Control results,
- Validation of sample results,
- Sample result reporting.

The amplification Wild Type Control, Mutated Control and Negative Control results, specific for the amplification reagent lot, will expire after 15 days. The results of Wild Type Control, Mutated Control and Negative Control amplification runs are used by the instrument software to setup the "Control Charts" monitoring the amplification step performances. Refer to the instrument user's manual for more details.

When the Wild Type control or Mutated control or Negative Control result does not meet the acceptance criteria, the "not passed" message is shown on the "Controls" screen and it is not possible to approve it. In this case, the amplification Wild Type Control or Mutated Control or Negative Control reaction has to be repeated.

When the Wild Type Control and/or Mutated Control and/or Negative Control is run together with samples to be tested and its result is invalid, the entire session is invalid. In this case, the amplification of all samples must be repeated too.

For each sample, the assay result is automatically interpreted by the system as established by the ELITe InGenius® software algorithm and the Assay protocol parameters.

The sample results are stored in the database and can be exported as "Sample Report" and "Track Report".

Sample Result Reporting

The sample results are stored in the database and can be viewed as "Sample Report" and "Track Report".

The "Sample Report" shows the details of a sample run sorted by Sample ID (SID).

The "Track Report" shows the details of a sample run track by track.

The "Sample Report" and "Track Report" can be printed and signed by authorized personnel.

SOFTWARE SETTING Life Technologies 7500 / 7500 fast

Turn the instrument and the computer on and open the control software. Click on "Advance Setup": by default the software will shows the page "experiment properties". Write in the "experiment name" the file name, choose the type of instrument (7500 or 7500fast), the type of reaction (quantitation standard curve), the type of reagents used (Taqman®Reagents) and the analysis reaction time (Standard ≈ 2 hours to complete a run). Open the page named "page setup" (sheet Define Target and Samples). In the window Define Targets set:

DPY mix 1		DPYD mix 2			DPYD mix 3				
Target	Reporter	Quencher	Target	Reporter	Quencher		Target	Reporter	Quencher
c.1905+1G>A WT:	FAM	NFQ-MGB	c.2846A>T WT	FAM	None		c.2194G>A WT	FAM	None
c.1905+1G>A MUT:	VIC	NFQ-MGB	c.2846A>T MUT	VIC	None		c.2194G>A MUT	Cy5	None
c.1129-5923C>G WT	Texas Red	None	c.1679T>G WT	Texas Red	None				
c.1129-5923C>G MUT	Cy5	None	c.1679T>G MUT	Cy5	None				

Set the samples' name in the window "Define Samples".

In the same page "plate setup" select the tab "Assign Target and Samples". On the screen you will see the microplate draft.

Select an area of the plate where the DPYD mix 1 controls will be placed: select wells of the plate and set the targets (c.1905+1G>A WT and MUT and c.1129-5923C>G WT and MUT). Select "Assign target to selected wells" in the blank, the "task Standard (S)" for DPYD pmix 1 targets. Select an area of the plate where the DPYD mix 2 controls will be placed: select wells of the plate and set the targets (c.2846A>T WT and MUT and c.1679T>G WT and MUT). Select "Assign target to selected wells" in the blank, the "task Standard (S)" for DPYD mix 2 targets. Select an area of the plate where the DPYD mix 3 controls will be placed: select wells of the plate and set the targets (c.2194G>A WT and MUT).

Select "Assign target to selected wells" in the blank, the "task Standard (S)" for DPYD mix 3 targets. Choose an area in the plate where negative control will be placed: select "Assign target to selected wells" in the blank, the "task Negative (N)" for each mixes (DPYD probe mix 1/ DPYD probe mix 2/ DPYD probe mix 3).

Select an area of the plate where samples will be placed: select for every sample three wells of the plate:

Well 1: DPYD mix 1 target (c.1905+1G>A and c.1129-5923C>G)

Well 2: DPYD mix 2 target (c.2846A>T and c.1679T>G)

Well 3: DPYD mix 3 target (c.2194G>A)

Link every well to a sample, through the window "Assign samples to selected wells". For each sample, select in the blank "Assign targets to selected wells" the "task UnKnown (U)" for the targets. Set None as passive reference.

Open "**Run Method**" (sheet **Graphic View**) and set the thermal cycling as follows, with the "collect data" in annealing/extension phase:

opo		
<u>cycles</u>	denaturation	annealing/extension
1	50°C 2 min	
1	95°C 10 min	
40	95° C 15 sec	60° C 1 min

In the window "Reaction volume plate per well" set a volume of 25 μ l.

After having prepared the plate, and correctly inserted in the instrument, press the button "Start Run".

CFX 96 Real Time PCR

Turn the instrument and the computer on and start the control software. In the principal screen will appear the window "Startup wizard": select "CFX96" and press "ok". In the next window select "create new" and set the thermal protocol and the reaction volume (25µl), with the "collect data" in annealing/extension phase:

		J			
cycl	es	denatu	uration	annealing/	extension
1		50° C	2 min		
1		95°C	10 min		
40)	95° C	15 sec	60° C	1 min

Save the protocol and click the next button. The software will open in default the sheet "plate". Click "create new", select "Fluorophores button" to choose fluorophores (FAM, VIC/Hex, Texas Red and CY5). Select the locations where they were positioned the controls of each Mix and choose the "Sample Type" Positive Control. Click "Load" check boxes to load fluorophores and Type or select Target Name.

Mix	Control Name	Target	Reporter
	Desitive control DRVD Wild Type	c.1905+1G>A	FAM
DRVD mix 1	Positive control DFTD wild-Type	c.1129-5923C>G	Texas Red
	Pacitive central DRVD Mutated	c.1905+1G>A	VIC/HEX
	Positive control DPTD Mutated	c.1129-5923C>G	Cy5
	Pacitive central DRVD Wild Tune	c.1679T>G	Texas Red
DRVD mix 2	Positive control DPTD wild-Type	c.2846A>T	FAM
DFTD IIIX 2	Positive control DRVD Mutated	c.1679T>G	Cy5
	Positive control DPTD Mutated	c.2846A>T	VIC/HEX
DPYD mix 3	Positive control DPYD Wild-Type	c.2194G>A	FAM
	Positive control DPYD Mutated	c.2194G>A	Су5

Select the location where you placed the Negative Control for each mix. Choose the "Sample Type" NTC. Click "Load" check boxes to load fluorophores and Type or select Target Name. Select the location of each sample in each mix and enter the name or code of the patient. Choose the "Sample Type" Unknown. Click "Load" check boxes to load fluorophores and Type or select Target Name Save the plate clicking the next button and start the experiment

Rotor-Gene Q MDx

The experiments can be set using the **Quick Start Wizard** or the **Advanced Wizard**, which appears when the software is started. Select the wizard "**Advanced**". As a first step, select the model "**Two Step Reaction**" with a double click in the "**New Run**".

In the next window, select the type of rotor installed on the instrument from the list that appears. Check the "Locking Ring Attached", check the checkbox and then click "Next". Enter the name of the operator and the reaction volume of 25 µl, and then click "Next".

In the next window click on "edit profile". Set the following thermal cycle: ion

<u>cycles</u>	<u>denaturation</u>	annealing/extens
1	50° C 2 min	
1	95°C 10 min	
40	95° C 15 sec	60°C 1 min

Select the annealing / extension from the thermal profile and click on "Acquiring A to cycling." In the next window, select yellow, red and Orange from the available channels and add it to acquiring channel along with the green channel and click "OK". In the next window click on "OK" and then click "Next". Click on the "Edit Gain" and set the Gain for the channels:

Reporter	<u>Gain</u>
Green	5
Yellow	5
Red	5
Orange	5

To begin the course, click on the button "Start Run". You can save the model before you begin your run by clicking on "Save Template". After clicking on the button "Start Run" window appears "Save As". The stroke can be saved in the desired position by the user. Once the run started, the window "Edit Samples" allows you to set the name of samples and controls in the positions in which they were loaded on the instrument. Select the locations where you placed the controls. Clicking on the box next to "Type" correspondent, in the dropdown menu "Samples" you can select the type of sample

being analysed. Select "Positive control". Select the location where you placed the Negative Control and name it as Negative Control. Clicking on the box next to "Type" correspondent, in the dropdown menu "Samples" you can select the type of sample being analysed. Select "Negative Controls" Select the location of each sample and enter the name or code of the patient. Clicking on the box next to "Type" correspondent, in the dropdown menu "Samples" you can select the type of sample being analysed. Select "UnKnown"

At the end of the operation, click "OK" in the "edit samples" and wait until the end of the race for the analysis (see "Interpretation of Results").

PREPARATION OF THE REACTIONS:

Thaw a tube of

- Amplification mMix
- DPYD probe mix 1
- DPYD probe mix 2
- **DPYD** probe mix 3

Mix carefully by vortex:

175µl of Amplification mMix with 105µl of DPYD probe mix 1

- 175µl of Amplification mMix with 105µl of DPYD probe mix 2
- 175µl of Amplification mMix with 105µl of DPYD probe mix 3

The mixes as produced are sufficient to prepare 12 reactions of each of amplification: 2 positive controls, 1 negative control and 9 samples. For a total number of tests other than 12, prepare a mixture for n + 1 tests, as reported in the following table:

<u>Reagent</u>	Description	<u>Volume for single test (µl)</u>	<u>Reagent</u>	Description	<u>Volume for single test (µl)</u>
R1	Amplification mMix	12,5	R1	Amplification mMix	12,5
R2	DPYD probes Mix 1	7,5	R3	DPYD probes Mix 2	7,5
<u>Reagent</u>	Description	Volume for single test (µl)			
R1	Amplification mMix	12,5			
R4	DPYD probes Mix 3	7,5			

Distribute, in the amplification plate, 20 µl of each prepared mix in chosen positions and already defined on the instrument software. For each mix, distribute in the negative control position **5µ** of solution taken by the **negative control** vial. Distribute, in the defined position for each sample, **5µ** of **corresponding sample** in each mix. Distribute, in the defined positions for the positive controls, **5µl** of **positive control** solution:

<u>Mix</u>	Positive Control
DPYD mix 1	Positive control DPYD WildType and Positive Control DPYD Mutated
DPYD mix 2	Positive control DPYD WildType and Positive Control DPYD Mutated
DPYD mix 3	Positive control DPYD WildType and Positive Control DPYD Mutated

Transfer the plate/tubes in the instrument and push the button "Start Run".

RESULTS ANALYSIS Lifetechnologies 7500 / 7500 Fast <u>∆Ct Analysis</u>

At the end of the PCR run, the software automatically opens the "Analysis" window in the "Amplification plot" page on the menu on the left. The analysis of the results can be performed with the Δ Ct method. For this purpose it is necessary a correct setting of the software. Set the following threshold and remove "auto baseline"

	c.19	05+1G>A	c.1129-5923C>G		
DPYD mix 1	FAM (Wild-type)	VIC/Hex (Mutated)	Texas Red (Wild-type)	Cy5 (Mutated)	
	100.000	100.000	100.000	100.000	
	c.2	846A>T	c.1679T>G		
DPYD mix 2	FAM (Wild-type)	VIC/Hex (Mutated)	Texas Red (Wild-type)	Cy5 (Mutated)	
	100.000	50.000	100.000	70.000	
	c.2	194G>A			
DPVD mix 3	FAM	Cy5			
	(Wild-type)	(Mutated)			
	100.000	70.000			

Export data to Excel and set the formula for Ct values of each sample and control:

- Allele2 Ct (c.1905+1G>A -MUT) Allele1 Ct (c.1905+1G>A -WT)
- Allele2 Ct (c.1129-5923C>G -MUT) Allele1 Ct (c.1129-5923C>G -WT)
- Allele2 Ct (c.2846A>T-MUT) Allele1 Ct (c.2846A>T-WT) Allele2 Ct (c.1679T>G-MUT) Allele1 Ct (c.1679T>G-WT)
- Allele2 Ct (c.2194G>A-MUT) Allele1 Ct (c.2194G>A-WT)

See paragraph "INTERPRETATION OF RESULTS"

CFX96 Real Time PCR System

∆Ct Analysis

The analysis of the results can be performed with the Δ Ct method. For this purpose you need a different setting of analysis and a correct setting of the software: At the end of the PCR, select the tab "Quantitation". Analyzing a fluorophore at a time, select "Baseline Threshold" in the menu "Setting" and set the following values of the Threshold in the "User Defined"

	c.19	05+1G>A	c.1129	-5923C>G	
DPYD mix 1	FAM (Wild-type)		Texas Red (Wild-type)	Cy5 (Mutated)	
	300	300	400	300	
	c.2	846A>T	c.16	79T>G	
DPYD mix 2	FAM (Wild-type)	VIC/Hex (Mutated)	Texas Red (Wild-type)	Cy5 (Mutated)	
	500	500	300	200	
	c.2	194G>A			
DPYD mix 3	FAM (Wild-type)	Cy5 (Mutated)			
	300	300			

You can export the report by clicking on the notepad icon at the top of the screen.

Export data to Excel and set the formula for Ct values of each sample and control:

- Allele2 Ct (c.1905+1G>A -MUT) Allele1 Ct (c.1905+1G>A -WT)
- Allele2 Ct (c.1129-5923C>G -MUT) Allele1 Ct (c.1129-5923C>G -WT)
- Allele2 Ct (c.2846A>T-MUT) Allele1 Ct (c.2846A>T-WT) Allele2 Ct (c.1679T>G-MUT) Allele1 Ct (c.1679T>G-WT)
- Allele2 Ct (c.2194G>A-MUT) Allele1 Ct (c.2194G>A-WT)

See paragraph "INTERPRETATION OF RESULTS"

Rotor-Gene Q MDx

C13910T ACt Analysis

The analysis can be performed with the Δ Ct study of the results. For this purpose you need a different setting of analysis and a correct setting of the software:

DPYD mix 1

At the end of the PCR run open the "Analysis" window.

- Select the "Quantification" sheet and click on "cycling A (green)". Select from the menu "Dynamic Tube" and subsequently "Slope correct".
- Set the correct setting of the threshold in the space provided "CT calculation Threshold".
- Open the "Analysis" window.

 Select the "Quantification" sheet and click on "cycling A (yellow)".
 - Select from the menu "Dynamic Tube" and subsequently "Slope correct".
 - Set the correct setting of the threshold in the space provided "CT calculation Threshold".
- Open the "Analysis" window. Select the "Quantification" sheet and click on "cycling A (Orange)".
 - Select from the menu "Dynamic Tube" and subsequently "Slope correct"
 - Set the correct setting of the threshold in the space provided "CT calculation Threshold".
- Open the "Analysis" window.
 - Select the "Quantification" sheet and click on "cycling A (Red)".
 - Select from the menu "Dynamic Tube" and subsequently "Slope correct".
 - Set the correct setting of the threshold in the space provided "CT calculation Threshold".

	c.1905+1G>A c.1129-5923C>G				
DPYD mix 1	Green - FAM (Wild-type)	Yellow - VIC/Hex (Mutated)	Orange - Texas Red (Wild-type)	Red - Cy5 (Mutated)	
	0,1	0,1	0,05	0,05	

Export data to Excel, save the file as "Excel Analysis Sheet" and enter the following formula for each sample and control:

Yellow Ct (c.1905+1G>A -MUT) - Green Ct (c.1905+1G>A -WT) Red Ct (c.1129-5923C>G -MUT) - Orange Ct (c.1129-5923C>G -WT)

DPYD mix 2

At the end of the PCR run open the "Analysis" window.

- Select the "Quantification" sheet and click on "cycling A (green)".
- Select from the menu "Dynamic Tube" and subsequently "Slope correct"
- Set the correct setting of the threshold in the space provided "CT calculation Threshold".

Open the "Analysis" window.

- Select the "Quantification" sheet and click on "cycling A (yellow)". Select from the menu "Dynamic Tube" and subsequently "Slope correct".
- Set the correct setting of the threshold in the space provided "CT calculation Threshold".
- Open the "Analysis" window.

 - Select the "Quantification" sheet and click on "cycling A (Orange)". Select from the menu "Dynamic Tube" and subsequently "Slope correct".
 - Set the correct setting of the threshold in the space provided "CT calculation Threshold".

Open the "Analysis" window.

- Select the "Quantification" sheet and click on "cycling A (Red)".
- Select from the menu "Dynamic Tube" and subsequently "Slope correct".
- Set the correct setting of the threshold in the space provided "CT calculation Threshold".

	c.2	2846A>T	c.1	.679T>G
DPYD mix 2 (Wild-type)	Yellow - VIC/Hex (Mutated)	Orange - Texas Red (Wild-type)	Red - Cy5 (Mutated)	
	0,05	0,05	0,05	0,05

Export data to Excel, save the file as "Excel Analysis Sheet" and enter the following formula for each sample and control:

Yellow Ct (c.2846A>T -MUT) - Green Ct (c.2846A>T -WT) Red Ct (c.1679T>G -MUT) – Orange Ct (c.1679T>G -WT)

DPYD mix 3

- At the end of the PCR run open the "Analysis" window.

 Select the "Quantification" sheet and click on "cycling A (green)".
 - Select from the menu "Dynamic Tube" and subsequently "Slope correct".
 - Set the correct setting of the threshold in the space provided "CT calculation Threshold".

Open the "Analysis" window.

- Select the "Quantification" sheet and click on "cycling A (Red)".
- Select from the menu "Dynamic Tube" and subsequently "Slope correct".
- Set the correct setting of the threshold in the space provided "CT calculation Threshold".

	c.219	94G>A
DPYD mix 3	Green - FAM (Wild-type)	Red - Cy5 (Mutated)
	0.05	0.1

Export data to Excel, save the file as "Excel Analysis Sheet" and enter the following formula for each sample and control:

See paragraph "INTERPRETATION OF RESULTS"

INTERPRETATION OF RESULTS

The use of positive and negative controls in each amplification session allows to verify the correct functioning of the amplification mixes and the absence of any contamination. The instrument software is able to analyze the fluorescence emitted by the specific probes for Wild-Type (FAM-Texas-Red) and by the Mutated (VIC/HEX-Cy5) alleles.

∆Ct Analysis

The genotype of the sample being analyzed can be identified on the basis of the Δ Ct between the Ct values of the Wild Type and Mutated allele signals, as reported in the following table:

Genotype	∆Ct (Ct Mutated - Ct Wild Type)
Wild Type	∆Ct > 2
Mutated	∆Ct < - 2
Heterozygous	-2 > ∆Ct < 2

Ct values of the allele-specific probes for the assay positive controls (Wild Type and Mutated) are used to validate the assay. Make sure that all positive controls are amplified with Ct values \leq 35.

If the result of the allele-specific amplification of each control has a Ct > 35 or undetermined the session cannot be considered valid and must be repeated. In the amplification of each sample to be analyzed, the Ct values of the allele-specific probes are used to validate the assay from the extraction process up to the stage of detection.

Make sure that the fluorescence emitted by the allele-specific amplification of the sample, as identified after analysis, has a $Ct \le 35$.

Sample	Wild Type Allele (FAM - TexasRed)	Mutated Allele (VIC/HEX – Cy5)	Assay and Genotype
Wild Type	Ct ≤ 35	Not relevant	Valid
Mutated	Not relevant	Ct ≤ 35	Valid
Heterozygous	Ct ≤ 35	Ct ≤ 35	Valid

If a sample has a Ct > 35 means that there are problems in the extraction phase or in the amplification and therefore a correct genotype cannot be assigned. Repeat the analysis.

Sample	Wild Type Allele (FAM - TexasRed)	Mutated Allele (VIC/HEX – Cy5)	Assay and Genotype
Wild Type	Ct > 35	Not relevant	Not Valid
Mutated	Not relevant	Ct > 35	Not Valid
Heterozygous	Ct > 35	Ct > 35	Not Valid

PERFORMANCE EVALUATION

Diagnostic Accuracy:

For the purposes of this evaluation the Diagnostic Accuracy is considered as the ability of the method to determine the correct genotype of the analyzed samples. The analysis was performed on samples with different genotypes, extracted from peripheral blood collected in EDTA and previously tested with another established method.

Obtained results show a diagnostic accuracy of 100%.

Traceability versus controls material

DPYD (5 gene mutations) was checked versus DPYD-Multiplex Set gDNA (SID-000110)

Analytical Specificity:

The analytical specificity of the test is guaranteed by the use of specific primers and probes for the amplification and detection of 5 mutations of DPYD gene. The alignment of the chosen regions for specific primers hybridization with available sequences in specialized databases demonstrated their conservation and the complete specificity for the analyzed targets.

INTERFERENCES:

Verify that DNA extracted from the sample doesn not contain nucleoproteins and haemoglobin, in order to exclude possible inhibition of PCR reactions. The interference due to contaminants can be highlighted through spectrophotometric analysis at 260 nm (maximum absorbtion of Nucleic Acids) and 280 nm (maximum absorbtion of Proteins). A pure DNA might have a rate of approximately 1.8.

QUALITY CONTROL

As a run quality control, it is recommended to include in each extraction, amplification and detection session a sample with known genotype that has already been tested before or reference material with known genotype.

In accordance with the Clonit srl ISO EN 13485 Certified quality Management System, each lot of DPYD (5 gene mutations) kit is tested against predetermined specification to ensure consistent product quality.

BIBLIOGRAPHY

DPYD genotype-guided dose individualisation of fluoropyrimidine therapy in patients with cancer:a prospective safety analysis Linda M Henricks*, Carin A T C Lunenburg*, Femke M de Man*, Didier Meulendijks, Geert W J Frederix, Emma Kienhuis, Geert-Jan Creemers, Arnold Baars, Vincent O Dezentjé, Alexander L T Imholz, Frank J F Jeurissen, Johanna E A Portielje, Rob L H Jansen, Paul Hamberg, Albert J ten Tije, Helga J Droogendijk, Miriam Koopman, Peter Nieboer, Marlène H W van de Poel, Caroline M P W Mandigers, Hilde Rosing, Jos H Beijnen, Erik van Werkhoven, André B P van Kuilenburg, Ron H N van Schaik, Ron H J Mathijssen, Jesse J Swen, Hans Gelderblom, Annemieke Cats, Henk-Jan Guchelaar, Jan H M Schellens. Lancet Oncol 2018; 19: 1459-67

DPYD Genotyping to Predict Adverse Events Following Treatment With Flourouracil-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients With Stage III Colon Cancer A Secondary Analysis of the PETACC-8 Randomized Clinical Trial

Valérie Boige, MD, PhD; Marc Vincent, PhD; Philippe Alexandre, MS; Sabine Teipar, MD, PhD; Stefania Landolfi, MD; Karine Le Malicot, MS; Richard Greil, MD; Pieter Jan Cuyle, MD; Mette Yilmaz, MD; Roger Faroux, MD; Axel Matzdorff; Ramon Salazar, MD, PhD; Come Lepage, MD, PhD; Julien Taieb, MD, PhD; Pierre Laurent-Puig, MD, PhD. JAMA Oncol. doi:10.1001/jamaoncol.2015.5392 Published online January 21, 2016.

DPYD*6 plays an important role in fluoropyrimidine toxicity in addition to DPYD*2A and c.2846A>T: a comprehensive analysis in 1254 patients Marzia Del Re 1, Saverio Cinieri2, Angela Michelucci3, Stefano Salvadori4, Fotios Loupakis5, Marta Schirripa5, Chiara Cremolini6, Stefania Crucitta1, Cecilia Barbara7, Angelo Di Leo8, Tiziana Pia Latiano9, Filippo Pietrantonio10, Samantha Di Donato8, Paolo Simi3, Alessandro Passardi11, Filippo De Braud10, Giuseppe Altavilla12, Claudio Zamagni13, Roberto Bordonaro14, Alfredo Butera15, Evaristo Maiello9, Carmine Pinto16, Alfredo Falcone6, Valentina Mazzotti17, Riccardo Morganti17, Romano Danesi1. The Pharmacogenomics Journal (2019) 19:556-563

The clinical relevance of multiple DPYD polymorphisms on patients candidate for fluoropyrimidine based-chemotherapy. An Italian case-control study Francesco Iachetta1, Candida Bonelli1, Alessandra Romagnani1, Raffaella Zamponi2, Lorenzo Tofani3, Enrico Farnetti2, Davide Nicoli2, Angela Damato1, Maria Banzi1, Bruno Casali2 and Carmine Pinto1. British Journal of Cancer (2019) 120:834-839

Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics for predicting fluoropyrimidine-related toxicity in the randomised, phase III adjuvant TOSCA trial in high-risk colon cancer patients. A Ruzzo*,1,23, F Graziano*,2,23, Fabio Galli3, Francesca Galli3, E Rulli3, S Lonardi4, M Ronzoni5, B Massidda6, V Zagonel4, N Pella7, C Mucciarini8, R Labianca9, M T Ionta6, I Bagaloni1, E Veltri10, P Sozzi11, S Barni12, V Ricci5, L Foltran13, M Nicolini14, E Biondi15, A Bramati16, D Turci17, S Lazzarelli18, C Verusio19, F Bergamo4, A Sobrero20, L Frontini21, M Menghi22 and M Magnani1. British Journal of Cancer (2017) 117, 1269-1277

Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing: 2017 Update. Ursula Amstutz1, Linda M. Henricks2, Steven M. Offer3, Julia Barbarino4, Jan H.M. Schellens2,5, Jesse J. Swen6, Teri E. Klein4, Howard L. McLeod7, Kelly E. Caudle8, Robert B. Diasio3,9 and Matthias Schwab10,11,12 Clinical Pharmacology & Therapeutics | Volume 103 Number 2 | February 2018

TECHNICAL ASSISTANCE

For any question and support please contact our Technical support:

e-mail: info@clonit.it phone: +39 02 56814413





DPYD (5 gene mutations)

Determinazione dei polimorfismi del gene DPYD mediante Real Time PCR

REV ST.RT-104-ENITA.1

REF RT-104 -24 tests

Istruzioni per l'uso

FINALITA' E SCOPO D'USO

Il kit **DPYD (5 gene mutations)** è un test qualitativo di amplificazione di acidi nucleici in vitro per la rilevazione dei 5 polimorfismi del gene DPYD (Diidropirimidina deidrogenasi) coinvolto nel metabolismo del 5-fluorouracile, il farmaco della famiglia delle fluoropirimidine più utilizzato, da DNA genomico estratto da campioni di sangue intero periferico.

Questo test genetico permette l'identificazione delle varianti alleliche per gli specifici polimorfismi associati alla predisposizione alla tossicità nei confronti dei farmaci della famiglia delle fluoropirimidine. Questo kit è per utilizzo ai soli fini di ricerca (RUO) diagnostica e non per utilizzo in vivo.

Elenco dei polimorfismi rilevabili:

Allele Variant	Reference SNP	HGVS	AA Variation
DPYD*2A	rs3918290	c.1905+1G>A	VS14+1G>A
\	rs75017182	c.1129-5923C>G	IVS10C>G
DPYD*13	rs55886062	c.1679T>G	c.1679T>G
\	rs67376798	c.2846A>T	p.D949V
DPYD*6	rs1801160	c.2194G>A	p.V732I

L'analisi dei risultati viene effettuata tramite uno strumento di Real Time PCR, composto da un Thermal Cycler provvisto di un sistema di rilevamento della fluorescenza.

COMPOSIZIONE

Il sistema contiene reagenti sufficienti per l'esecuzione di 24 test.

	Quantity	Descrizione
R1	2 x 540 μl	Amplification mMix dNTPs, Tris-HCl, KCl, MgCl ₂ , Taq Polymerase, Nuclease-free water, ROX
R2	2 x 110 µl	DPYD probe mix 1 c.1905+1G>A primers, c.1905+1G>A WT Probe (FAM), c.1905+1G>A MUT Probe (VIC/HEX), c.1129-5923C>G primers, c.1129-5923C>G WT Probe (Texas Red), c.1129-5923C>G MUT Probe (Cy5), Nuclease-free water
R3	2 x 110 μl	DPYD probe mix 2 c.2846A>T primers, c.2846A>T WT Probe (FAM), c.2846A>T MUT Probe (VIC/HEX), c.1679T>G primers, c.1679T>G WT Probe (Texas Red), c.1679T>G MUT Probe (Cy5), Nuclease-free water
R4	2 x 110 μl	DPYD probe mix 3 c.2194G>A primers, c.2194G>A WT Probe (FAM), c.2194G>A MUT Probe (Cy5)
R5	2 x 35 μl	Positive control DPYD Wild-Type DNA clonato corrispondente al controllo Wild-Type delle 5 mutazioni del gene del DPYD
R6	2 x 35 μl	Positive Control DPYD Mutated DNA clonato corrispondente al controllo Wild-Type delle 5 mutazioni del gene del DPYD
R7	2 x 30 μl	Negative control

MATERIALE E STRUMENTAZIONE NECESSARIA MA NON FORNITA

Guanti senza polvere monouso in lattice o simili;

Microcentrifuga da banco;

Micropipette e puntali sterili con filtro incorporato per la prevenzione di aerosol;

Vortex;

Materiale plastico monouso adatto allo scopo (Micropiastra e pellicole ottiche adesive o microprovette ottiche);

Termoblocco agitatore per provette da 1.5ml

<u>Reagenti</u>

Il kit DPYD (5 gene mutations) è stato sviluppato per essere utilizzato con i seguenti metodi di estrazione:

Estrazione Manuale

Ref. 51304/51306

QIAmp DNA mini kit. Il Sistema consente l'estrazione manuale di DNA dai campioni umani in esame. Il kit contiene reagenti utili per 50/250 estrazioni (QIAGEN).

Estrazione Automatica

Ref. OP02001. CloNext Blood DNA Extraction Kit. Il kit permette l'estrazione automatica del DNA da campioni umani. Il kit contiene reagenti utili per 48 estrazioni.

ELITe InGenius[®]SYSTEM

ELITe InGenius® (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030).

Ref. INT030 ELITe InGenius (ELITechGroup S.p.A). Per l'esecuzione automatica dei test con lo strumento **«ELITe InGenius»** sono inoltre richiesti iseguenti prodotti generici:

- cartucce di estrazione «ELITe InGenius® SP 200» (ELITechGroup S.p.A., codice INT032SP200),
- materiali di consumo per estrazione da campioni biologici «ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set» (ELITechGroup S.p.A., codice INT032CS),
 cartucce di amplificazione «ELITe InGenius® PCR Cassette» (ELITechGroup S.p.A., codice INT035PCR),
- cartucce of amplificatione «ELTPE Ingenius@ PCR Cassette» (ELTPErioroup S.p.A., codice INTOSPER)
 puntali «300 µL Filter Tip Axygen» (Axygen BioScience Inc., CA, codice TF-350-L-R-S),
- raccoglitore **«ELITE InGenius® Waste Box»** (ELITechGroup S.p.A., codice F2102-000).

– La corretta estrazione degli acidi nucleici può essere eseguita utilizzando sistemi di estrazione alternativi e seguendo le istruzioni del produttore. L'idoneità di nuove procedure di estrazione, per i campioni utilizzabili con il kit DPYD (5 gene mutations), deve essere validata dall'utente finale.

STRUMENTAZIONE

Il kit DPYD (5 gene mutations) è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con i seguenti strumenti:

Estrazione Automatica

• *Ref. OP01018/OP01019. CloNext 12 or CloNext 24.* Robotic Workstation per la purificazione automatica degli acidi nucleici fino a 12/24 campioni simultaneamente

Real Time PCR

- 7500 / 7500 Fast from Lifetechnologies
- CFX96 Real Time PCR System from Bio-Rad
- Rotor-Gene Q MDx fornito da QIAGEN

Strumento integrato

• ELITe InGenius®SYSTEM (Ref. INT030)

Dispositivo completamente automatizzato per estrazione e purificazione di acidi nucleici, amplificazione e rilevazione del target mediante Real Time PCR e interpretazione del risultato (ELITechGroup S.p.A.)

Assicurarsi che gli strumenti siano stati correttamente installati, calibrati e controllati con la manutenzione tecnica appropriata in accordo con le istruzioni del produttore.

CAMPIONI

Il prodotto **DPYD (5 gene mutations)** è progettato per essere utilizzato con DNA estratto dai seguenti campioni biologici: **Sangue intero periferico raccolto in EDTA**. I campioni raccolti devono essere trasportati e conservati a +2-+8°C ed utilizzati entro 3 giorni dalla data del prelievo. Conservare il campione a -20°C se utilizzato dopo 3 giorni.

PRECAUZIONI D'USO

- Questo kit è per l'utilizzo ai soli fini di ricerca (RUO) diagnostica e non per uso in vivo.

- Leggere attentamente queste istruzioni per l'uso prima di utilizzare il kit.
- Se richiesto, Clonit offre il supporto tecnico necessario per il corretto utilizzo del kit.
- In conformità con la Buona Pratica di Laboratorio, definire tre aree separate del laboratorio per: estrazione del DNA, preparazione della miscela di reazione PCR; manipolazione dei comandi forniti con il kit. Ogni area deve avere pipette dedicate e cappa a flusso laminare.
- Pulire periodicamente l'area di lavoro con ipoclorito allo 0,5%.
- Indossare indumenti protettivi come camici da laboratorio e guanti monouso durante l'analisi dei campioni.
- Utilizzare guanti senza polvere. Non lasciare impronte sui tappi ottici. Non scrivere sui tappi in quanto ciò potrebbe causare un'interferenza con il rilevamento fluorescente.
- Evitare qualsiasi contatto tra le mani e gli occhi o il naso durante la raccolta e l'analisi dei campioni.
- I materiali contenenti o potenzialmente contenenti agenti infettivi devono essere sempre manipolati in una stanza di sicurezza microbiologica separata sotto una cappa biologica a rischio biologico. I rifiuti devono essere smaltiti secondo la legge locale.
- Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.
- Utilizzare esclusivamente pipette e strumenti calibrati e regolarmente controllati.
- Evitare le bolle d'aria durante l'erogazione della master mix. Eliminarli prima di iniziare l'amplificazione.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo aver maneggiato campioni e reagenti.
- Non mangiare, bere o fumare nell'area in cui vengono manipolati i campioni ei reagenti del kit.
- I reagenti forniti non sono infettivi e pericolosi per la salute (vedere la scheda di sicurezza del materiale MSDS).
- Le cartucce di amplificazione (PCR Cassettes) di ELITe InGenius[®] devono essere manipolate in modo da non disperdere nell'ambiente i prodotti di amplificazione per evitare la possibilità di contaminazioni

LIMITI DEL METODO

L'estrema sensibilità dell'amplificazione genica può causare falsi positivi a causa della contaminazione incrociata tra campioni e/o controlli. Pertanto, si consiglia di:

- separare fisicamente tutti i prodotti ei reagenti utilizzati per le reazioni di amplificazione da quelli utilizzati per le altre reazioni, nonché dai prodotti di post-amplificazione;
- utilizzare puntali con filtri per prevenire la contaminazione incrociata tra i campioni;
- usare guanti monouso e cambiarli frequentemente;
- aprire accuratamente le provette per evitare la formazione di aerosol;
- chiudere ogni provetta prima di aprirne un'altra.

Come per qualsiasi dispositivo diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati tenendo in considerazione tutti i dati clinici e gli altri test di laboratorio disponibili per il paziente.

- Come con qualsiasi dispositivo diagnostico, con questo prodotto esiste un rischio residuo di ottenere risultati non validi, falsi positivi o falsi negativi.
- Il trattamento farmacologico può interferire con il risultato finale dell'analisi di biologia molecolare.

Il corretto funzionamento della miscela di amplificazione dipende dalla corretta raccolta, corretto trasporto, corretta conservazione e corretta preparazione di un campione biologico. I risultati ottenuti utilizzando il prodotto devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e laboratoristici legati al paziente. Come per qualunque altro dispositivo diagnostico, esiste un rischio residuo di ottenere risultati non validi che non può essere eliminato o ridotto ulteriormente.

AVVERTENZE

- Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di utilizzare questo test.
- Utilizzare solo DNA estratto da sangue EDTA
- Non mischiare reagenti di lotti diversi.
- Scongelare e mescolare accuratamente i reagenti del kit prima dell'uso.

- La miscela PCR deve essere preparata fresca ogni volta.

Dopo la ricostituzione, la miscela di amplificazione deve essere utilizzata in una sola volta (12 reazioni). Evitare di ripetere lo scongelamento e il congelamento dei reagenti (più di due volte), poiché ciò potrebbe influire sulle prestazioni del test.

I reagenti devono essere congelati in aliquote, se devono essere utilizzati in modo intermittente.

- Non utilizzare oltre la data di scadenza che appare sull'etichetta della confezione.
- Non utilizzare il prodotto se conservato a temperature diverse da quelle indicate sulle etichette o descritte nelle presenti Istruzioni per l'uso.
- In caso di fuoriuscita del contenuto del kit, fare riferimento alla specifica Scheda di Sicurezza del Materiale (MSDS, disponibile su richiesta).
- In caso di pacco danneggiato, contattare il supporto tecnico prima di utilizzare il kit.

- In caso di incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo, deve essere notificato un avviso al produttore e all'autorità

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare il prodotto DPYD (5 gene mutations) a -20°C.

Il kit DPYD (5 gene mutations) viene spedito in ghiaccio secco. I componenti del kit dovrebbero arrivare congelati. Se uno o più componenti non sono congelati al ricevimento, o se le provette sono stati compromessi durante il trasporto, contattare Clonit srl per l'assistenza.

Il prodotto integro e correttamente conservato ha una stabilità di 12 mesi dalla data di produzione. Non utilizzare oltre la data di scadenza riportata sulla scatola. Il congelamento e scongelamento dei reagenti più di due volte dovrebbe essere evitati, in quanto questo potrebbe influire sulle prestazioni del test. I reagenti devono essere congelati in aliquote, se devono essere utilizzati in modo intermittente.

PROCEDURA ANALITICA Estrazione Manuale

Ref. 51304/51306 - QIAmp DNA mini kit (QIAGEN).

Seguire le istruzioni riportate nel kit *QIAmp DNA mini kit*. Eluire il campione in 50 μ l di buffer AE.

Estrazione Automatica

Ref. OP02001. CloNext Blood DNA Extraction Kit

Seguire le istruzioni riportate nel kit CloNext Blood DNA Extraction Kit. Selezionare il protocollo da 200µl di campione. Eluire il campione 50 µl. Il campione così preparato può essere utilizzato subito oppure conservato a -20°C

PROTOCOLLO OPERATIVO PER IL SISTEMA ELITE InGenius®

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario

- accendere ELITe InGenius[®] e accedere al sistema con la modalità "**OPEN**";
- verificare che i controlli di amplificazione per DPYD mix 1 (Controllo Positivo DPYD Wild-Type, Controllo Positivo DPYD Mutato e
 Controllo Negativo) siano ottenuti in associazione al lotto di reagente di amplificazione che si intende usare e che i risultati siano presenti, approvati e non scaduti (Status). Se non sono presenti risultati dei controlli di amplificazione approvati e validi, generare gli stessi.
- verificare che i controlli di amplificazione per DPYD mix 2 (Controllo Positivo DPYD Wild-Type, Controllo Positivo DPYD Mutato e Controllo Negativo) siano ottenuti in associazione al lotto di reagente di amplificazione che si intende usare e che i risultati siano presenti, approvati e non scaduti (Status). Se non sono presenti risultati dei controlli di amplificazione approvati e validi, generare gli stessi.
- verificare che i controlli di amplificazione per DPYD mix 3 (Controllo Positivo DPYD Wild-Type, Controllo Positivo DPYD Mutato e Controllo Negativo) siano ottenuti in associazione al lotto di reagente di amplificazione che si intende usare e che i risultati siano presenti, approvati e non scaduti (Status). Se non sono presenti risultati dei controlli di amplificazione approvati e validi, generare gli stessi.
- Scegliere il tipo di corsa, seguendo le istruzioni della Graphical User Interface (GUI) per impostare la sessione e utilizzando i protocolli del saggio forniti da ELITechGroup S.p.A..
- L'Assay Protocol del saggio per l'analisi dei campioni clinici disponibile per il prodotto DPYD (5 gene mutations) è descritto nella tabella seguente:

Name	Matrix	Report	Characteristics
Clonit DPYD Mix1_Open_200_200_00		wildtune (Extraction Input Volume: 200 µL Extraction Elute Volume: 200 µL Laborad Castral VO
Clonit DPYD Mix2_Open_200_200_00	Whole Blood	wildtype/ Internal Control: NO heterozygote/ Sonication: NO Mutated Dilution Factor: 1	Sonication: NO Dilution Factor: 1
Clonit DPYD Mix3_Open_200_200_00			Sample PCR input volume: 5 µL

Il kit DPYD (5 gene mutations) in associazione al sistema ELITe InGenius® può essere utilizzato per eseguire:

- Corsa integrata (Extract + PCR),
- Corsa di amplificazione (PCR only),
- Corsa di Amplificazione Controllo Positivo DPYD Wild-Type, Controllo Positivo DPYD Mutato e Controllo Negativo (PCR only).
- Tutti i parametri necessari per l'esecuzione della sessione sono inclusi nell'Assay Protocol del saggio disponibile sullo strumento e sono richiamati automaticamente quando si seleziona l'Assay Protocol del saggio.

CORSA INTEGRATA (EXTRACT + PCR)

- Per impostare la corsa integrata seguire le seguenti indicazioni come da GUI
 - Scongelare la provetta di Amplification Mix e di DPYD probe mix 1 e preparare la master mix di PCR miscelando accuratamente i volumi richiesti per il numero dei campioni da analizzare, come descritto nella sezione "C) Preparazione della PCR mix". Traferire la master mix preparata in una provetta Sarstedt da 2 mL (Ref. 72694005).
 - Scongelare la provetta di Amplification Mix e di DPYD probe mix 2 e preparare la master mix di PCR miscelando accuratamente i volumi richiesti per il numero dei campioni da analizzare, come descritto nella sezione "C) Preparazione della PCR mix". Traferire la master mix preparata in una provetta Sarstedt da 2 mL (Ref. 72694005).
 - Scongelare la provetta di Amplification Mix e di DPYD probe mix 3 e preparare la master mix di PCR miscelando accuratamente i volumi richiesti per il numero dei campioni da analizzare, come descritto nella sezione "C) Preparazione della PCR mix". Traferire la master mix preparata in una provetta Sarstedt da 2 mL (Ref. 72694005).
 - 4. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
 - 5. Assicurarsi che l'Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che l'Extracted Elute Volume" sia impostato a 200 µL.
 - 6. Per ogni "Track" di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
 - 7. Selezionare l'Assay Protocol del test da utilizzare nella colonna "Assay"
 - 8. Assicurarsi che il "Protocol" visualizzato sia: "Extract + PCR".
 - Selezionare la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position": se è utilizzato la provetta primaria, selezionare "Primary Tube", se è utilizzato una provetta secondaria, selezionare "Extraction Tube".
 - 10. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
 - 11. Caricare PCR mix preparata nel punto 1 nell'Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI.
 - Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
 - 12. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'Inventory Area seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
 - 13. Caricare le "PCR Cassette", le cartucce di estrazione "ELITE InGenius® SP 200", tutti i consumabili e i campioni da estrarre, seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
 - 14. Chiudere lo sportello dello strumento.
 - 15. Premere "Start" per avviare la corsa.

Dopo il completamento della sessione, l'ELITe InGenius[®] permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto

CORSA DI AMPLIFICAZIONE (PCR ONLY)

Per impostare la corsa di amplificazione seguire le seguenti indicazioni come da GUI:

- Scongelare la provetta di Amplification Mix e di DPYD probe mix 1 e preparare la master mix di PCR miscelando accuratamente i volumi richiesti per il numero dei campioni da analizzare, come descritto nella sezione "C) Preparazione della PCR mix". Traferire la master mix preparata in una provetta Sarstedt da 2 mL (Ref. 72694005).
- Scongelare la provetta di Amplification Mix e di DPYD probe mix 2 e preparare la master mix di PCR miscelando accuratamente i volumi richiesti per il numero dei campioni da analizzare, come descritto nella sezione "C) Preparazione della PCR mix". Traferire la master mix preparata in una provetta Sarstedt da 2 mL (Ref. 72694005).
- 3. Scongelare la provetta di Amplification Mix e di **DPYD probe mix 3** e preparare la master mix di PCR miscelando accuratamente i volumi richiesti per il numero dei campioni da analizzare, come descritto nella sezione "C) Preparazione della PCR mix". Traferire la master mix

- preparata in una provetta Sarstedt da 2 mL (Ref. 72694005). 4.
- Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home". Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 200 µL. 5.
- 6. Per ogni Track di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
- Selezionare l'Assay Protocol del test da utilizzare nella colonna "Assay" 7.
- 8. Selezionare "PCR Only" nella colonna "Protocol".
- Assicurarsi che la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position" sia "Elution tube (bottom row)". Fare clic su "Next" 9. per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare PCR mix preparata nel punto 1 nell'Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere 10. con l'operazione successiva.
- 11. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'Inventory Area seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare le "PCR Cassette" e i campioni degli acidi nucleici estratti seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere 12. con l'operazione successiva.
- 13. Chiudere la porta dello strumento.
- 14. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Dopo il completamento della procedura, l'ELITe InGenius® permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

CORSA DI AMPLIFICAZIONE PER CONTROLLO WILD-TYPE, MUTATO e NEGATIVO (PCR ONLY)

- Prima dell'analisi di qualunque campione, è obbligatorio amplificare e approvare i controlli di amplificazione per il lotto di reagenti che verrà usato:
- Come Controllo Positivo di amplificazione per **DPYD mix 1**, usare il Controllo Positivo DPYD Wild Type e il Controllo Positivo DPYD Mutato (forniti con il presente kit) in associazione all'Assay Protocol Clonit DPYD Mix1_Open_PC_00
- Come Controllo Negativo di amplificazione, usare il Controllo Negativo (fornito con il presente kit) in associazione all'Assay Protocol Clonit DPYD Mix1 Open NC 00
- Come Controllo Positivo di amplificazione per DPYD mix 2, usare il Controllo Positivo DPYD Wild Type e il Controllo Positivo DPYD Mutato (forniti con il presente kit) in associazione all'Assay Protocol Clonit DPYD Mix2_Open_PC_00.
- Come Controllo Negativo di amplificazione, usare il Controllo Negativo (fornito con il presente kit) in associazione all'Assay Protocol Clonit DPYD Mix2 Open NC 00
- Come Controllo Positivo di amplificazione per DPYD mix 3, usare il Controllo Positivo DPYD Wild Type e il Controllo Positivo DPYD Mutato (forniti con il presente kit) in associazione all'Assay Protocol Clonit DPYD Mix3_Open_PC_00.
- Come Controllo Negativo di amplificazione, usare il Controllo Negativo (fornito con il presente kit) in associazione all'Assay Protocol Clonit DPYD Mix3 Open NC 00
- Per impostare la corsa di amplificazione, seguire i seguenti step come indicato dalla GUI:
 - Scongelare la provetta di Amplification Mix e di DPYD probe mix 1 e preparare la master mix di PCR miscelando accuratamente i volumi 1. richiesti per il numero dei campioni da analizzare, come descritto nella sezione "C) Preparazione della PCR mix". Traferire la master mix preparata in una provetta Sarstedt da 2 mL (Ref. 72694005).
 - 2. Scongelare la provetta di Amplification Mix e di DPYD probe mix 2 e preparare la master mix di PCR miscelando accuratamente i volumi richiesti per il numero dei campioni da analizzare, come descritto nella sezione "C) Preparazione della PCR mix". Traferire la master mix preparata in una provetta Sarstedt da 2 mL (Ref. 72694005).
 - Scongelare la provetta di Amplification Mix e di DPYD probe mix 3 e preparare la master mix di PCR miscelando accuratamente i volumi 3. richiesti per il numero dei campioni da analizzare, come descritto nella sezione "C) Preparazione della PCR mix". Traferire la master mix preparata in una provetta Sarstedt da 2 mL (Ref. 72694005).
 - . Selezionare "Perform Run" dalla schermata ``Home". 4.
 - Scongelare la provetta del controllo positivo DPYD Wild Type, del controllo positivo DPYD Mutatoe del controllo negativo. 5.
 - Trasferire almeno 10 µl di ciascun controllo in un "Elution tube" fornito con l'ELITe InGenius® SP 200 Consumable Set. 6.
 - 7. A partire dalla "Track" di interesse, selezionare l'Assay Protocol del test da utilizzare nella colonna "Assay".
 - Per DPYD mix 1, per i controlli positive DPYD 2A WT IVS10 WT e DPYD 2A MUT IVS10 MUT, selezionare l'Assay Protocol Clonit Clonit DPYD 8. Mix1_Open_PC_00 nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto e la data di scadenza dei controlli.
 - Per il controllo negativo (bianco di reazione), selezionare l'Assay Protocol del test Clonit DPYD Mix1_Open_NC_00 nella colonna "Assay" e 9. inserire il numero di lotto e la data di scadenza del controllo negativo.
 - Per **DPYD mix 2**, per i controlli positive DPYD 13 WT-D949V WT e DPYD 13 MUT D949V MUT, selezionare l'Assay Protocol Clonit DPYD Mix2_Open_PC_00 nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto e la data di scadenza dei controlli. 10.
 - Per il controllo negativo (bianco di reazione), selezionare l'Assay Protocol del test Clonit DPYD Mix2_Open_NC_00 nella colonna "Assay" e 11. inserire il numero di lotto e la data di scadenza del controllo negativo.
 - Per **DPYD mix 3**, per i controlli positive DPYD 6 WT e DPYD 6 MUT, selezionare l'Assay Protocol Clonit DPYD Mix3_Open_PC_00 nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto e la data di scadenza dei controlli. 12.
 - 13. Per il controllo negativo (bianco di reazione), selezionare l'Assay Protocol del test Clonit DPYD Mix3_Open_NC_00 nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto e la data di scadenza del controllo negativo.
 - 14
 - Fare clic su "Next" per continuare l'impostazione. Caricare PCR mix preparata nel punto 1 nell'Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere 15. con l'operazione successiva.
 - Caricare e controllare i Rack dei puntali nell"Inventory Area" seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione 16. successiva.
 - Caricare le "PCR Cassette", la provetta del Controllo Wild Type, la provetta del Controllo Mutato e la provetta del controllo negativo (bianco di 17. reazione) seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
 - 18. Chiudere la porta dello strumento.
- Premere "Start" per iniziare la corsa
- Dopo il completamento della procedura, l'ELITe InGenius® permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Esame e approvazione dei risultati

Al termine della corsa è visualizzata automaticamente la schermata "Results Display". In questa schermata sono visualizzati i risultati relativi a campione/controllo e le informazioni relative alla corsa. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i rapporti ("Sample Report" o "Track Report"). Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento ELITe InGenius®. Il sistema ELITe InGenius[®] genera i risultati con DPYD (5 gene mutations) attraverso questa procedura:

- Validazione dei risultati di amplificazione del Controllo Wild Type, del Positivo Mutato e del Controllo Negativo,
- Validazione dei risultati del campione,
- Refertazione dei risultati del campione

I risultati dell'amplificazione del Controllo Wild Type, del Controllo Mutato e del Controllo Negativo, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, scadono dopo 15 giorni

I risultati dell'amplificazione Controllo Wild Type, del Controllo Mutato e del Controllo Negativo vengono utilizzati dal software dello strumento per impostare i "grafici di controllo" che monitorano le prestazioni della fase di amplificazione.

Quando il Controllo Wild Type e/o il Controllo Mutato e/o il Controllo Negativo non soddisfa i criteri di accettazione, lo strumento visualizza il messaggio "not passed" nella schermata "Controls" e non è possibile approvarlo.

In questo caso la reazione di amplificazione del Controllo Wild Type e/o del Controllo Mutato e/o del Controllo Negativo deve essere ripetuta.

Se il Controllo Wild Type e/o il Controllo Mutato e/o il Controllo Negativo sono processati insieme ai campioni da analizzare ed il loro risultato non è valido, l'intera sessione non è valida. In questo caso anche l'amplificazione dei campioni deve essere ripetuta.

Per ciascun campione, il risultato del saggio è interpretato automaticamente dal sistema come stabilito dall'algoritmo dell'ELITE InGenius® software e dai parametri dell'Assay Protocol del saggio.

I risultati del campione sono memorizzati nel database e possono essere esportati come "Sample Report" e "Track Report".

Refertazione dei risultati del campione

I risultati del campione sono memorizzati nel database e possono essere visualizzati come "Sample Report" e "Track Report".

Il "Sample Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per i campioni selezionati (SID).

Il "Track Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per i Track selezionati.

I "Sample Report" e "Track Report" possono essere stampati e firmati dal personale autorizzato.

IMPOSTAZIONI DEL SOFTWARE

Lifetechnologies 7500 fast

Accendere lo strumento, il computer ed avviare il software di controllo. Dalla schermata principale del software cliccare sul bottone "Advanced Setup": di default il software vi mostra la pagina "experiment properties". Digitare nella finestra "experiment name" il nome con il quale verrà salvato l'esperimento. Scegliere il tipo di strumento che si utilizza (7500 o 7500fast) scegliere il tipo di esperimento (quantitation-standard curve), il tipo di reagenti utilizzati (Taqman@reagents) ed il tempo di reazione (Standard ~ 2 hours to complete a run). Aprire la pagina "page setup" (sheet Define Target and Samples). Nella finestra "Define Targets" impostare:

DPYD	mix 1		DPYD mix 2 DPYD mix 3					
Target	Reporter	Quencher	Target	Reporter	Quencher	Target	Reporter	Quencher
c.1905+1G>A WT:	FAM	NFQ-MGB	c.2846A>T WT	FAM	None	c.2194G>A WT	FAM	None
c.1905+1G>A MUT:	VIC	NFQ-MGB	c.2846A>T MUT	VIC	None	c.2194G>A MUT	Cy5	None
c.1129-5923C>G WT	Texas Red	None	c.1679T>G WT	Texas Red	None			
c.1129-5923C>G MUT	Cy5	None	c.1679T>G MUT	Cy5	None			

Nella finestra "Define Samples" impostare il nome dei campioni in analisi.

Sempre nella pagina "plate setup" selezionare lo sheet "Assign Target and Samples": comparirà nella vostra schermata la piastra schematizzata.

Scegliere una zona della piastra dove verrà posizionato il controllo positivo per la mix DPYD mix 1: selezionare i pozzetti della piastra ed impostare i target (c.1905+1G>A WT e MUT and.1129-5923C>G WT e MUT). Selezionare nello spazio "Assign target to selected wells" il "task Standard (S)" per il target DPYD mix 1.

Scegliere una zona della piastra dove verrà posizionato il controllo positivo per la mix DPYD mix 2: selezionare i pozzetti della piastra ed impostare i target (c.2846A>T WT e MUT and c.1679T>G WT e MUT). Selezionare nello spazio "Assign target to selected wells" il "task Standard (S)" per il target DPYD mix 2.

Scegliere una zona della piastra dove verrà posizionato il controllo positivo per la mix DPYD mix 3: selezionare i pozzetti della piastra ed impostare i target (c.2194G>A WT e MUT). Selezionare nello spazio "Assign target to selected wells" il "task Standard (S)" per il target DPYD mix 3. Scegliere una zona della piastra dove verranno posizionati i controlli negativi per entrambe le mix: selezionare negli spazi "Assign target to selected wells" il "task Negative (N)" per ogni miscela. Impostare i target di ogni mix (DPYD probe mix 1/ DPYD probe mix 2/ DPYD probe mix 3)

Scegliere una zona della piastra dove verranno posizionati i campioni e selezionare per ciascun campione in analisi 3 pozzetti della piastra: Pozzetto 1: DPYD mix 1 target (c.1905+1G>A e c.1129-5923C>G)

Pozzetto 2: DPYD mix 2 target (c.2846A>T e c.1679T>G)

Pozzetto 3: DPYD mix 3 target (c.2194G>A)

Selezionare per ciascun campione nell'apposito spazio "Assign targets to selected wells" il "task UnKnown (U)" per i target in analisi. Impostare come passive reference None.

Aprire la pagina "Run Method" (sheet Graphic View) ed impostare il ciclo termico corretto, selezionando "collect data" nella fase di annealing/extension:

1 50°C 2 min 1 95°C 10 min	<u>on</u>	ealing/extension	<u>azione</u>	<u>denatu</u>	<u>cicli</u>
1 95°C 10 min			2 min	50°C	1
			10 min	95°C	1
40 95°C 15 sec 60°C 1 min		60°C 1 min	15 sec	95°C	40

Nella finestra "Reaction volume plate per well" impostare il volume di 25 µl. Non appena preparata la piastra, e dopo averla correttamente inserita nello strumento, premere il pulsante "Start Run".

CFX 96 Real Time PCR

Accendere lo strumento, accendere il computer ed avviare il software di controllo. Nella schermata principale del software apparirà "Startup wizard": selezionare "CFX96" e cliccare il bottone "ok". Nella schermata successiva premere "create new" ed impostare il protocollo termico ed I volumi di reazione (25µl):

<u>cicli</u>	denaturazione	annealing/extension
1	50°C2 min	
1	95°C10 min	
40	95°C15 sec	60°C 1 min

Salvare il protocollo termico e cliccare "Next". Il software aprirà automaticamente la pagina "Plate". Premere "create new", premere il bottone "Fluorophores button" per selezionare i fluorofori corretti (FAM, VIC e CY5).

Selezionare i pozzetti contenenti i controlli positivi di ogni mix e scegliere dal menù a tendina "Sample Type": Positive Control Cliccare "Load check boxes" per caricare i fluorofori scelti e scrivere o selezionare il Nome del Target

Mix	Control Name	<u>Target</u>	Reporter
	Desitive central DDVD Wild Tune	c.1905+1G>A	FAM
DRVD mix 1		c.1129-5923C>G	Texas Red
	Desitive central DRVD Mutated	c.1905+1G>A	VIC/HEX
Positiv	POSITIVE CONTOL DEED MULATED	c.1129-5923C>G	Cy5
	Desitive central DRVD Wild Tune	c.1679T>G	Texas Red
		c.2846A>T	FAM
	Positive control DPYD Mutated	c.1679T>G	Cy5
		c.2846A>T	VIC/HEX
DPYD mix 3	Positive control DPYD Wild-Type	c.2194G>A	FAM
	Positive control DPYD Mutated	c.2194G>A	Cy5

Selezionare i pozzetti contenenti il controllo negativo e scegliere dal menù a tendina "Sample Type": NTC. Cliccare "Load check boxes" per caricare i fluorofori scelti e scrivere o selezionare il Nome del Target. Selezionare i pozzetti contenenti i campioni in esame e scegliere dal menù a tendina "Sample Type": Unknown. Cliccare "Load check boxes" per caricare i fluorofori scelti e scrivere o selezionare il Nome del Target. Salvare la piastra cliccando il pulsante "Next" e, non appena preparata la piastra ed averla correttamente inserita nello strumento, premere il pulsante "Start Run".

Rotor-Gene Q MDx

Nuovi esperimenti possono essere impostati utilizzando la procedura guidata di avvio rapido o la procedura guidata avanzata, che appare quando il software viene avviato. Selezionare la procedura guidata "Advanced". Come primo passo, selezionare il modello "Two Step Reaction" con un doppio clic nella finestra "New Run". Nella finestra successiva, selezionare il tipo di rotore montato sullo strumento dalla lista che appare. Controllare il Locking Ring Attached ", spuntare la casella di controllo e quindi fare clic su "Avanti". Inserire il nome dell'operatore e il volume di reazione di 25 µl e fare clic su "Avanti".

Nella finestra successiva fare clic su "edit profile". Impostare ciclo termico seguente:

<u>cicli</u>	denaturazione	annealing/extension
1	50°C2 min	
1	95°C10 min	
40	95°C15 sec	60°C 1 min

Selezionare la fase di annealing/extension dal profilo termico e fare clic su "Acquiring to cycling A".

Nella finestra successiva, selezionare il canale Yellow, il canale Red e il canale Orange da available channel e aggiungerlo a acquiring channel insieme al canale Green e fare clic su "ok".

Nella finestra successiva fare clic su "ok" e poi su "Avanti".

Cliccare sul pulsante "Edit Gain" ed impostare i seguenti valori per i canali interessati:

Reporter	<u>Gain</u>
Green	5
Yellow	5
Red	5
Orange	5

Per avviare la corsa, fare clic sul pulsante "Start Run". E' anche possibile salvare il modello prima di iniziare la corsa facendo clic su "Save Template". Dopo aver fatto clic sul pulsante "**Start Run**", viene visualizzata la finestra "**Save As**". La corsa può essere salvata nella posizione desiderata dell'utente. Una volta che la corsa è iniziata, la finestra "**Edit Samples**" permette di impostare il nome di campioni e controlli nelle posizioni in cui sono stati caricati sullo strumento.

Cliccando sulla casellina "**Type**" corrispondente, nel menu a tendina "**Samples**" è possibile selezionare il tipo di campione che si sta analizzando. Selezionare "**Positive Controls**" Selezionare la posizione dove sono stati posizionati i controlli positivi.

Selezionare la posizione dove è stato posizionato il controllo Negativo e nominarla come Negative Control.

Selezionare la posizione di ogni singolo campione ed inserire il nome od il codice del paziente. Cliccando sulla casellina "Type" corrispondente, nel menu a tendina "Samples" è possibile selezionare il tipo di campione che si sta analizzando. Selezionare "UnKnown" Al termine dell'operazione cliccare "OK" nella finestra "edit samples" e attendere il termine della corsa per l'analisi (vedi interpretazione dei risultati).

ALLESTIMENTO DELLE REAZIONI:

Scongelare una provetta di

- **Amplification mMix**
- DPYD probe mix 1
- **DPYD** probe mix 2
- DPYD probe mix 3

Miscelare accuratamente mediante vortex:

- 175µl of Amplification mMix with 105µl of DPYD probe mix 1
- 175µl of Amplification mMix with 105µl of DPYD probe mix 2
- 175µl of Amplification mMix with 105µl of DPYD probe mix 3

Le miscela così prodotte sono sufficienti per l'esecuzione di 12 reazioni di amplificazione: 2 controllo positivo, 1 controllo negativo e 9 campioni. Per un numero totale di test diverso da 16, preparare una miscela per n+1 test, seguendo i volumi riportati in tabella:

<u>Reagent</u>	Description	<u>Volume for single test (µl)</u>	<u>Reage</u>	<u>nt</u> <u>Description</u>	Volume for single test (µl)
R1	Amplification mMix	12,5	R1	Amplification mMix	12,5
R2	DPYD probes Mix 1	7,5	R3	DPYD probes Mix 2	7,5

<u>Reagent</u>	Description	<u>Volume for single test (µl)</u>
R1	Amplification mMix	12,5
R4	DPYD probes Mix 3	7,5

Dispensare, nella piastra di amplificazione, 20 µl di ciascuna miscela appena ricostituita nelle posizioni prescelte e gia' predisposte sul software dello strumento.

Per ogni miscela, dispensare, nella posizione del controllo negativo, 5 µl di soluzione prelevata dalla vial controllo negativo. Dispensare, nelle posizioni predefinite per ciascun campione, 5 µl del campione corrispondente in ogni miscela. Dispensare, nelle posizioni predisposte per i controlli positivi, **5** μ l di soluzione **positive control**:

<u>Mix</u>	Positive Control
DPYD mix 1	Positive control DPYD WildType and Positive Control DPYD Mutated
DPYD mix 2	Positive control DPYD WildType and Positive Control DPYD Mutated
DPYD mix 3	Positive control DPYD WildType and Positive Control DPYD Mutated

Trasferire la piastra/provette nello strumento e premere il pulsante "Start Run".

ANALIST DET RISULTATI Lifetechnologies 7500 / 7500 Fast

Analisi ACt

L'analisi può essere eseguita con lo studio del \Ct dei risultati ottenuti. A tale scopo è necessario un corretto setting del software: Impostare i seguenti Threshold e rimuovere "Auto Baseline"

	c.190	5+1G>A	c.1129-5923C>G	
DPYD mix 1	FAM VIC/Hex (Wild-type) (Mutated)		Texas Red (Wild-type)	Cy5 (Mutated)
	100.000	100.000	100.000	100.000
	c.28	46A>T	c.1679T>G	
DPYD mix 2	FAM (Wild-type)	VIC/Hex (Mutated)	Texas Red (Wild-type)	Cy5 (Mutated)
	100.000	50.000	100.000	70.000
	~	0.40° A		
	c.21	94G>A		
DPYD mix 3	FAM	Cy5		
	(Wild-type)	(Mutated)		
	100.000	70.000		

Esportare i dati in un foglio excel ed impostare la seguente formula per I valori di Ct di ogni campione e controllo:

- Allele2 Ct (c.1905+1G>A -MUT) Allele1 Ct (c.1905+1G>A -WT)
- Allele2 Ct (c.1129-5923C>G -MUT) Allele1 Ct (c.1129-5923C>G -WT)
- Allele2 Ct (c.2846A>T-MUT) Allele1 Ct (c.2846A>T-WT)
- Allele2 Ct (c.1679T>G-MUT) Allele1 Ct (c.1679T>G-WT) Allele2 Ct (c.2194G>A-MUT) Allele1 Ct (c.2194G>A-WT)

Vedere paragrafo "INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI"

CFX96 Real Time PCR System

Analisi <u>ACt</u> L'analisi può essere eseguita con lo studio del Δ Ct dei risultati ottenuti. A tale scopo è necessario un diverso setting di analisi e un corretto setting del software

Alla fine della reazione di PCR, selezionare lo sheet "Quantitation".

Analizzando un fluoroforo per volta, aprire dal menù "Setting" la voce Baseline Threshold e impostare i seguenti valori di Threshold nella casella "User Defined":

	c.190)5+1G>A	c.1129-5923C>G	
DPYD mix 1	FAM VIC/Hex (Wild-type) (Mutated)		Texas Red (Wild-type)	Cy5 (Mutated)
	300	300	400	300
	c.28	346A>T	c.1679T>G	
DPYD mix 2	FAM (Wild-type)	VIC/Hex (Mutated)	Texas Red (Wild-type)	Cy5 (Mutated)
	500	500	300	200
-				
	c.21	194G>A		
DPYD mix 3	FAM (Wild-type)	Cy5 (Mutated)		

300

È possibile esportare il report cliccando sulla figura block notes posta nella parte superiore dello schermo.

Esportare i dati in un foglio excel ed impostare la seguente formula per ogni campione e controllo:

- Allele2 Ct (c.1905+1G>A -MUT) Allele1 Ct (c.1905+1G>A -WT) Allele2 Ct (c.1129-5923C>G -MUT) Allele1 Ct (c.1129-5923C>G -WT)
- Allele2 Ct (c.2846A>T-MUT) Allele1 Ct (c.2846A>T-WT)
- Allele2 Ct (c.1679T>G-MUT) Allele1 Ct (c.1679T>G-WT)
- Allele2 Ct (c.2194G>A-MUT) Allele1 Ct (c.2194G>A-WT)
- Vedere paragrafo "INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI"

Rotor-Gene Q

Analisi ACt C13910T

L'analisi può essere eseguita con lo studio del Δ Ct dei risultati ottenuti. A tale scopo è necessario un diverso setting di analisi e un corretto setting del software:

DPYD mix 1

Al termine della corsa di PCR aprire la finestra "Analisys".

Selezionare lo sheet "Quantification" e fare doppio clic spuntando la voce "cycling A (green)".

300

- Cliccare il tasto "Dynamic Tube" e successivamente "Slope correct"
- Controllare il corretto settaggio del threshold nell'apposito spazio "CT calculation Threshold"

Al termine della corsa di PCR aprire la finestra "Analisys".

- Selezionare lo sheet "Quantification" e fare doppio clic spuntando la voce "cycling A (Yellow)".
- Cliccare il tasto "Dynamic Tube" e successivamente "Slope correct"
 - Controllare il corretto settaggio del threshold nell'apposito spazio "CT calculation Threshold"
- Al termine della corsa di PCR aprire la finestra "Analisys".
 Selezionare lo sheet "Quantification" e fare doppio clic spuntando la voce "cycling A (Orange)".
 - Cliccare il tasto "Dynamic Tube" e successivamente "Slope correct".
 - Controllare il corretto settaggio del threshold nell'apposito spazio "CT calculation Threshold"

- Al termine della corsa di PCR aprire la finestra "Analisys".
 Selezionare lo sheet "Quantification" e fare doppio clic spuntando la voce "cycling A (Red)".
 - Cliccare il tasto "Dynamic Tube" e successivamente "Slope correct"
 - Controllare il corretto settaggio del threshold nell'apposito spazio "CT calculation Threshold"

	c.19	05+1G>A	c.1129-5923C>G	
DPYD mix 1	Green - FAM (Wild-type)	Yellow - VIC/Hex (Mutated)	Orange - Texas Red (Wild-type)	Red - Cy5 (Mutated)
	0.1	0.1	0.05	0.05

Esportare i dati in un foglio Excel, salvando il file come "Excel Analysis Sheet" ed impostare la seguente formula per ogni campione e controllo: Yellow Ct (c.1905+1G>A -MUT) - Green Ct (c.1905+1G>A -WT) Red Ct (c.1129-5923C>G -MUT) - Orange Ct (c.1129-5923C>G -WT)

DPYD mix 2

Al termine della corsa di PCR aprire la finestra "Analisys".

Selezionare lo sheet "Quantification" e fare doppio clic spuntando la voce "cycling A (green)". Cliccare il tasto "Dynamic Tube" e successivamente "Slope correct".

Controllare il corretto settaggio del threshold nell'apposito spazio "CT calculation - Threshold"

Al termine della corsa di PCR aprire la finestra "Analisys".

Selezionare lo sheet "Quantification" e fare doppio clic spuntando la voce "cycling A (Yellow)".

Cliccare il tasto "Dynamic Tube" e successivamente "Slope correct"

Controllare il corretto settaggio del threshold nell'apposito spazio "CT calculation - Threshold"

Al termine della corsa di PCR aprire la finestra "Analisys".

Selezionare lo sheet "Quantification" e fare doppio clic spuntando la voce "cycling A (Orange)".

Cliccare il tasto "Dynamic Tube" e successivamente "Slope correct"

Controllare il corretto settaggio del threshold nell'apposito spazio "CT calculation - Threshold" Al termine della corsa di PCR aprire la finestra "Analisys".

- Selezionare lo sheet "Quantification" e fare doppio clic spuntando la voce "cycling A (Red)".
- Cliccare il tasto "Dynamic Tube" e successivamente "Slope correct".
- Controllare il corretto settaggio del threshold nell'apposito spazio "CT calculation Threshold"

	c.2	846A>T	c.1679T>G	
DPYD mix 2	Green - FAM (Wild-type)	Yellow - VIC/Hex Orange - Texas Red (Mutated) (Wild-type)		Red - Cy5 (Mutated)
	0,05	0,05	0,05	0,05

Esportare i dati in un foglio Excel, salvando il file come "Excel Analysis Sheet" ed impostare la seguente formula per ogni campione e controllo: Yellow Ct (c.2846A>T -MUT) - Green Ct (c.2846A>T -WT)

Red Ct (c.1679T>G -MUT) - Orange Ct (c.1679T>G -WT)

Al termine della corsa di PCR aprire la finestra "Analisys".

- Selezionare lo sheet "Quantification" e fare doppio clic spuntando la voce "cycling A (green)". Cliccare il tasto "Dynamic Tube" e successivamente "Slope correct".
- Controllare il corretto settaggio del threshold nell'apposito spazio "CT calculation Threshold"
- Al termine della corsa di PCR aprire la finestra "Analisys".
 - Selezionare lo sheet "Quantification" e fare doppio clic spuntando la voce "cycling A (Red)".
- Cliccare il tasto "Dynamic Tube" e successivamente "Slope correct". Controllare il corretto settaggio del threshold nell'apposito spazio "CT calculation Threshold"

•		
	c.21	94G>A
DPYD mix 3	Green - FAM	Red - Cy5
<u></u>	(Wild-type)	(Mutated)
	0,05	0.1

Esportare i dati in un foglio Excel, salvando il file come "Excel Analysis Sheet" ed impostare la seguente formula per ogni campione e controllo: Red Ct (c.2194G>A -MUT) - Green Ct (c.2846A>T -WT)

Vedere paragrafo "INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI"

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

L'utilizzo dei controlli positivi e del controllo negativo all'interno di ogni sessione di amplificazione consente di verificare il corretto funzionamento della miscela e l'assenza di possibili contaminazioni. Il software dello strumento è in grado di analizzare le fluorescenze emesse delle sonde specifiche per DPYD Wild-Type (FAM-Texas Red) e dalle sonde specifiche per DPYD mutato (VIC/HEX-Cy5).

Analisi ∆Ct

Mediante l'analisi ∆Ct è possibile identificare il genotipo corretto del campione in analisi eseguendo la sottrazione del Ct assegnato all'allele Mutato al Ct assegnato all'allele Wild Type.

Il genotipo viene stabilito seguendo la tabella sotto riportata:

Genotipo	∆Ct (Ct Mutato - Ct Wild Type)	
Wild Type	$\Delta Ct > 2$	
Mutato	∆Ct < - 2	
Eterozigote	-2 > ∆Ct < 2	

Nelle reazioni di amplificazione di ciascun controllo positivo (Wild Type e Mutato), i valori di Ct della sonda allele-specifica vengono utilizzati per convalidare la sessione d'analisi

Assicurarsi che la fluorescenza emessa dall'amplificazione dell'allele corretto presenti un Ct < 35.

Se il risultato della reazione di amplificazione allele specifica di ciascun controllo presenta un Ct > 35 o undetermined la sessione non può considerarsi valida e quindi deve essere ripetuta. Nelle reazioni di amplificazione di ciascun campione, i valori di Ct della sonda allele-specifica vengono utilizzati per convalidare la sessione d'analisi a partire dal processo di estrazione sino alla fase di detection. Assicurarsi che la fluorescenza emessa dall'amplificazione allele specifico del campione, identificato dopo l'analisi, presenti un Ct \leq 35.

Campione	Allele Wild Type (FAM - TexasRed)	Allele Mutato (VIC/HEX – Cy5)	Assay e Genotipo
Wild Type	Ct ≤ 35	Non rilevante	Valido
Mutato	Non rilevante	Ct ≤ 35	Valido
Eteroziante	Ct < 35	Ct < 35	Valido

Se un campione presenta un Ct > 35 significa che si sono verificati problemi nella fase di estrazione o nella fase di amplificazione e guindi potrebbe venir assegnato al campione un genotipo errato. Ripetere il campione

Campione	Allele Wild Type (FAM - TexasRed)	Allele Mutato (VIC/HEX – Cy5)	Assay e Genotipo
Wild Type	Ct > 35	Non rilevante	Non Valido
Mutato	Non rilevante	Ct > 35	Non Valido
Eterozigote	Ct > 35	Ct > 35	Non Valido

CARATTERISTICHE FUNZIONALI Accuratezza Diagnostica:

Ai fini della presente valutazione, l'accuratezza diagnostica è definita come la capacità del test di determinare il genotipo corretto dei campioni analizzati. L'analisi è stata effettuata su campioni di DNA con differenti genotipi noti, estratti da sangue intero periferico raccolto in EDTA e testati in precedenza con un altro metodo riconosciuto.

I risultati ottenuti mostrano un'accuratezza diagnostica del 100%.

Tracciabilità verso materiale di controllo

DPYD (5 gene mutations) è stato valutato utilizzando DPYD-Multiplex Set gDNA (SID-000110)

Specificità Analitica:

La specificità del test è garantita dall'utilizzo di primers specifici per il gene del DPYD e da probes disegnati appositamente per le 5 mutazioni di DPYD L'esame di allineamento delle regioni scelte per l'ibridazione dei primers specifici con le sequenze disponibili in banca dati ha dimostrato la loro conservazione, l'assenza di mutazioni significative e la completa specificità per i target analizzati. Campioni riconosciuti come positivi per un determinato genotipo devono essere riconosciuti come tali dal sistema di amplificazione descritto.

Interferenze:

Verificare che nel DNA estratto dal campione di partenza non vi siano presenti mucoproteine ed emoglobina in modo da escludere eventuali inibizioni nella reazione di PCR. L'interferenza dovuta a contaminanti può essere evidenziata mediante l'analisi spettrofotometrica e rapporto dei dati ottenuti a 260 nm (Assorbimento massimo Acidi Nucleici) e 280 nm (Assorbimento massimo Proteine). Un DNA puro dovrebbe avere un rapporto di circa 1.8.

CONTROLLO QUALITA'

Si consiglia inoltre di inserire come controllo di qualità interno di ciascuna sessione di estrazione, amplificazione e rilevamento, un campione a genotipo noto già testato in precedenza o materiale di riferimento a titolo noto.

In conformità con il sistema di gestione della qualità certificato ISO EN 13485 di Clonit srl, ogni lotto di **DPYD (5 gene mutations)** è stato testato contro specifiche predeterminate al fine di garantire una qualità costante del prodotto

BIBLIOGRAFIA

DPYD genotype-guided dose individualisation of fluoropyrimidine therapy in patients with cancer:a prospective safety analysis

Linda M Henricks*, Carin A T C Lunenburg*, Femke M de Man*, Didier Meulendijks, Geert W J Frederix, Emma Kienhuis, Geert-Jan Creemers, Arnold Baars, Vincent O Dezentjé, Alexander L T Imholz, Frank J F Jeurissen, Johanna E A Portielje, Rob L H Jansen, Paul Hamberg, Albert J ten Tije, Helga J Droogendijk, Miriam Koopman, Peter Nieboer, Marlène H W van de Poel, Caroline M P W Mandigers, Hilde Rosing, Jos H Beijnen, Erik van Werkhoven, André B P van Kuilenburg, Ron H N van Schaik, Ron H J Mathijssen, Jesse J Swen, Hans Gelderblom, Annemieke Cats, Henk-Jan Guchelaar, Jan H M Schellens. Lancet Oncol 2018; 19: 1459–67

DPYD Genotyping to Predict Adverse Events Following Treatment With Flourouracil-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients With Stage III Colon Cancer A Secondary Analysis of the PETACC-8 Randomized Clinical Trial

Valérie Boige, MD, PhD; Marc Vincent, PhD; Philippe Alexandre, MS; Sabine Tejpar, MD, PhD; Stefania Landolfi, MD; Karine Le Malicot, MS; Richard Greil, MD; Pieter Jan Cuyle, MD; Mette Yilmaz, MD; Roger Faroux, MD; Axel Matzdorff; Ramon Salazar, MD, PhD; Côme Lepage, MD, PhD; Julien Taieb, MD, PhD; Pierre Laurent-Puig, MD, PhD. JAMA Oncol. doi:10.1001/jamaoncol.2015.5392 Published online January 21, 2016.

DPYD*6 plays an important role in fluoropyrimidine toxicity in addition to DPYD*2A and c.2846A>T: a comprehensive analysis in 1254 patients Marzia Del Re 1, Saverio Cinieri2, Angela Michelucci3, Stefano Salvadori4, Fotios Loupakis5, Marta Schirripa5, Chiara Cremolini6, Stefania Crucitta1, Cecilia Barbara7, Angelo Di Leo8, Tiziana Pia Latiano9, Filippo Pietrantonio10, Samantha Di Donato8, Paolo Simi3, Alessandro Passardi11, Filippo De Braud10, Giuseppe Altavilla12, Claudio Zamagni13, Roberto Bordonaro14, Alfredo Butera15, Evaristo Maiello9, Carmine Pinto16, Alfredo Falcone6, Valentina Mazzotti17, Riccardo Morganti17, Romano Danesi1. The Pharmacogenomics Journal (2019) 19:556–563

The clinical relevance of multiple DPYD polymorphisms on patients candidate for fluoropyrimidine based-chemotherapy. An Italian case-control study *Francesco Iachetta1, Candida Bonelli1, Alessandra Romagnani1, Raffaella Zamponi2, Lorenzo Tofani3, Enrico Farnetti2, Davide Nicoli2, Angela Damato1, Maria Banzi1, Bruno Casali2 and Carmine Pinto1*. British Journal of Cancer (2019) 120:834–839

Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics for predicting fluoropyrimidine-related toxicity in the randomised, phase III adjuvant TOSCA trial in high-risk colon cancer patients. A Ruzzo*,1,23, F Graziano*,2,23, Fabio Galli3, Francesca Galli3, E Rulli3, S Lonardi4, M Ronzoni5, B Massidda6, V Zagonel4, N Pella7, C Mucciarini8, R Labianca9, M T Ionta6, I Bagaloni1, E Veltri10, P Sozzi11, S Barni12, V Ricci5, L Foltran13, M Nicolini14, E Biondi15, A Bramati16, D Turci17, S Lazzarelli18, C Verusio19, F Bergamo4, A Sobrero20, L Frontini21, M Menghi22 and M Magnani1. British Journal of Cancer (2017) 117, 1269–1277

Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing: 2017 Update. Ursula Amstutz1, Linda M. Henricks2, Steven M. Offer3, Julia Barbarino4, Jan H.M. Schellens2,5, Jesse J. Swen6, Teri E. Klein4, Howard L. McLeod7, Kelly E. Caudle8, Robert B. Diasio3,9 and Matthias Schwab10,11,12 Clinical Pharmacology & Therapeutics | Volume 103 Number 2 | February 2018

ASSISTENZA TECNICA

Per ogni domanda o per assistenza contattare il nostro servizio tecnico:

e-mail: info@clonit.it telefono: +39 02 56814413

Legenda dei Simboli Utilizzati Key to symbols used					
REF	Codice del prodotto Catalogue number	X	Limitazioni di temperatura Temperature limitation		
RUO	Solo per uso di ricerca Research Use Only	REV	Revisione Revision		
LOT	Numero di lotto Batch code	i	Leggere le istruzioni d'uso Consult instructions for use		
$\mathbf{\Sigma}$	Data di scadenza Use by	∑∑	Sufficiente per un <n> di test Contains sufficient for <n> tests</n></n>		
***	Fabbricante Manufacturer				



CLONIT S.r.I. Headquarter: Via Varese 20 – 20121 Milano Production Site: Via Umberto Saba 25 – 20081 Abbiategrasso (MI) Tel. + 39. (0)2.56814413 fax. +39. (0)2.56814515 www.clonit.it - info@clonit.it



for Research Use Only

CND W0106010499

ST.RT-104-ENITA.1 Revision 28th October 2024