

Appendix A

Test for aktivitet af dihydropyrimidine dehydrogenase forud for behandling med 5-Fluorouracil- (i.v.), capecitabin- og tegafurholdige præparater

Version 1.0

Bestemmelse af fænotype:

Dihydropyrimidin dehydrogenase (DPD) enzymet omdanner uracil til dihydrouracil, men enzymet omdanner også 5FU til den inaktive metabolit, hvorfor der ved nedsat aktivitet af DPD er øget risiko for toxicitet. Enzymet er primært udtrykt i leveren, men også i perifere monuklære celler (PMC). Til bestemmelse af DPD-aktiviteten har man forskningsmæssigt målt enzymets aktivitet i PMC med radioaktivt mærket substrat og dette opfattes som referencemetoden. Dette biologiske assay er ikke egnet til diagnostik, da det er tids- og arbejdskrævende, samt svært at standardisere. Plasmakoncentrationen af uracil kan udnyttes som endogen markør for DPD-aktiviteten.

Præanalytiske forhold:

Der er beskrevet døgnvariation for plasmakoncentrationen af uracil, som svinger med laveste niveau kl 17 og højeste kl 5:00 fra henholdsvis 8,8 ng/ml til 12,2 ng/ml (1). Jf. den franske anbefaling er døgnvariationen ikke så betydelig at prøvetagningstidspunktet skal standardiseres. Det er ydermere beskrevet at plasma uracil falder i timerne efter et måltid (14,2 ng/ml til 9,2 ng/ml) (2) , hvilket den franske anbefaling ikke forholder sig til. Der foreligger ingen data om døgnrytmevariation hos patienter med kræft. Grænseværdien på 16 ng/ml og 150 ng/ml, er baseret på prøver udtaget uden tids- eller faste restriktioner, hvorfor samme præ-analytiske forhold er hensigtsmæssige. Det anbefalede prøvemateriale er antikoaguleret plasma. Hvis prøven udtages ved stuetemperatur, skal prøvetagningsrøret centrifugeres inden for 1 time og 30 minutter og plasma afpipetteres. Hvis prøverøret tages på køl, skal centrifugering ske indenfor 4 timer, hvorefter plasma afpipetteres (3). Uracil er stabilt i EDTA-plasma ved stuetemperatur i 6 timer og i køleskab 3-6 dage (4). Fryses plasmaet er uracil stabilt ved -20 i 6 måneder og tolererer 3x fryse/tø cykler (5).

Analyse:

Koncentrationen af uracil i plasma kan måles ved **High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)** kombineret med enten detektion med ultraviolet lys (UV) eller massespektrometer (MS). Der

eksisterer ikke kommercielt tilgængelige CE-mærkede assays til plasma uracil måling og materialer til kalibratorer og internkvalitetssikring (dag til dag variation) skal for nuværende fremstilles "in house". Til ekstern kvalitetssikring (variation mellem laboratorier og sikring af korrekt koncentrationsniveau) er identificeret ét program i Europa: Assurance Qualité des Laboratoires de Biologie Medicale Association (ASQUALAB) Paris, Frankrig. Analysen er en batch analyse (et hold prøver samles sammen til analyse), hvor prøveforberedelsen udføres i løbet af dagen og instrumentet typisk analyser natten over med svar den efterfølgende dag. Dette giver en analysetid på 1 – 2 dage.

Grænser og fortolkning:

Måleresultat afgives som en kontinuerlig variabel medfølgende grænser til fortolkning som angivet i tabel 1.

Bestemmelse af genotype:

Genotype kan bestemmes vha. flere typer af metoder, der undersøger for 4 single-nucleotide polymorfier (SNPs), der dækker ca. 98% af de varianter i DPYD genet, som kan bidrage til nedsat DPD-aktivitet hos kaukasere (6-8).

Præanalytiske forhold:

Analysen af DNA kræver ingen særlige præanalytiske forhold. Der anvendes som oftest enten Citrat eller EDTA fuldblod, der kan sendes med post ved stuetemperatur.

Analyse:

Sanger sekventering:

Sekvensanalyse af nukleotider i DNA fragmenter under 1000 bp. Guld standard for validering af DNA sekvens. Sekvens aflæses vha. gel-elektroforese/kapillær-elektroforese og mutationer aflæses i sekvens vha. specialdesignet software.

Taqman assay:

Probe(r) er designet til at binde omkring området med den DNA polymorfi, der undersøges for. Derfor detekteres kun de polymorfier, proberne kan bindes til. Fund skal evt. verificeres med Sanger sekventering, men dette er ikke rutine i alle laboratorier.

Direkte metode (LAMP):

Kræver alene EDTA-fuldblod – ingen DNA oprensning. Loop-mediated amplification af den region rundt om aktuel DNA polymorfi der detekteres med fluorescens ved smeltekurve analyse. Der er 6 specifikke primere i LaCARs kit, og de analyseres i særskilte kørsler.

Grænser og fortolkning:

Afhængig af software til svarafgivelse, kan mutationer aflæses fra rådata indlæst i eksternt analysesoftware (for Sanger og Taqman) eller aflæses vha. software, som er indbygget i analyseapparatet, hvor data eksporteres til (LaCAR). Det kræver teknisk trænet personale at aflæse disse metoder. Der henvises i øvrigt til instrukser i brug af specifikt software.

Testkapacitet, svartid og analyseomkostninger

Inden udgangen af 2021 forventes det, at alle regioner enten udbyder eller sørger for adgang til begge typer af tests. Det samlede nationale behov for testkapacitet for begge typer tests er omkring 5000 analyser/år.

For begge typer test er svartiden afhængig af både prøvens transporttid til laboratoriet og af antallet af analyser på laboratoriet, da de udføres som 'batch'-analyser (tabel X). Således forventes en samling af analyserne på få laboratorier at kunne nedbringe svartiden, da der i så fald kan analyseres prøver på alle hverdage. For genotypetesten vil der være stordriftsfordele ved at anvende Taqman målemetoden efterfulgt af Sanger sekventering i udvalgte tilfælde. For fænotype testen skal prøverne sendes frosset og den korte svartid vil kræve hyppige forsendelser, hvilket er omkostningsfyldt især mellem regioner.

Svarafgivelsen er ikke standardiseret, og for især genotypetesten vil det være hensigtsmæssigt, svarafgivelsen standardiseres på tværs af laboratorier og teknik for at lette klinikernes fortolkning af svaret og tilpasning af behandlingen med 5FU (se tabel 1 under oversigt over anbefalinger). For fænotype testen eksisterer grænseværdier til identifikation af patienter med delvist og fuldstændig DPD-mangel, som angivet i rekommandationen fra Lægemiddelstyrelsen.

Da prisen per analyse varierer fra 2000 til 850 kr. ekskl. transport, vil regionerne skønsomt blive påført en årlig merudgift. Hertil kommer engangsudgifter til opbygning af testkapaciteten.

Tabel X: oversigt over metode, opsætning, prøvehåndtering, svartid og pris i Danmark i 2020

Test	Metode	Opsætning	Prøvehåndtering	Svartid	Pris pr. analyse (ekskl. omkostninger til transport)
Genotype-bestemmelse (4 SNPs)	Sanger sekventering	DNA oprenses. Analysen sættes op på klinisk biokemisk apparatur.	Fuldblod sendes ved stuetemperatur samme dag	5 hverdage + evt. transport	600-850 kr.
Genotype-bestemmelse (4 SNPs)	TaqMan probebaseret assay	D.o.	D.o.	2-5 hverdage + evt. transport	150-200 kr.
Genotype-bestemmelse (4 SNPs)	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	Kommercielt kit fra LaCAR til klinisk biokemisk apparatur.	D.o.	Samme dag + evt. transport	600-700 kr.
Fænotype-bestemmelse	Plasma uracil koncentrations - bestemmelse	LC-MS, 'in-house' metode	Prøven centrifugeres og afpipetteres inden 90 min. Plasma/serum sendes på køl/frost samme dag.	2-5 hverdage + evt. transport	200-400 kr.

LC-MS: Væskekromatografi-massespektrometri

Referencer

1. Jacobs BA, Deenen MJ, Pluim D, et al. Pronounced between-subject and circadian variability in thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase enzyme activity in human volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 82: 706-716, 2016.
2. Henricks LM, Jacobs BAW, Meulendijks D, et al. Food-effect study on uracil and dihydrouracil plasma levels as marker for dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 84: 2761-2769, 2018.
3. https://www.has-sante.fr/jcms/c_2891090/fr/methodes-de-recherche-d-un-deficit-en-dihydropyrimidine-deshydrogenase-visant-a-prevenir-certaines-toxicites-severes-associees-aux-traitements-incluant-une-fluoropyrimidine-5-fluorouracile-ou-capecitabine
4. Chavani O, Jensen BP, Strother et al. Development, validation and application of a novel liquid chromatography tandem mass spectrometry assay measuring uracil, 5,6-dihydrouracil, 5-fluorouracil, 5,6-dihydro-5-fluorouracil, α -fluoro- β -ureidopropionic acid and α -fluoro- β -alanine in human plasma. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 142: 125-135, 2017
5. Büchel B, Rhyn P, Schürch S, et al. LC-MS/MS method for simultaneous analysis of uracil, 5,6-dihydrouracil, 5-fluorouracil and 5-fluoro-5,6-dihydrouracil in human plasma for therapeutic drug monitoring and toxicity prediction in cancer patients. *Biomedical chromatography : BMC* 27: 7-16, 2013.
6. Rosmarin D, Palles C, Church D et al. Genetic markers of toxicity from capecitabine and other fluorouracil-based regimens: investigation in the QUASAR2 study, systematic review, and meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2014;32(10):1031-9
7. Meulendijks D, Henricks LM, Sonke GS et al. Clinical relevance of DPYD variants c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3, and c.1601G>A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2015 (16):1639-50
8. Ejdrup Andersen S, Herluf Paulsen N, Pfeiffer P, Qvortrup C, Damkier P. Fæno- eller genotypetest for dihydropyrimidin dehydrogenase-mangel før fluoropyrimidinbehandling? *UfL*. :in press