

APO-Easy® Genotypisierungskit

GEBRAUCHSANWEISUNG

REF FLS-OE-02

Nur zur In-vitro-Diagnostik.

Nicht zur therapeutischen Anwendung.

Version: 3.4

Erstellt am: 21.05.2024

Sprache: Deutsch

Version	Wichtigste Änderungen
3.1	Erste Version
3.2	Hinzufügung des Abschnitts „Bevollmächtigte Vertreter“
3.3	Änderung der „Benannten Stelle“
3.4	Änderung des Testintervalls und Hinzufügung einer neuen Referenz für das Instrument QC-PCR-QS5-DX



Firalis SA
35 rue du Fort
68330 – Huningue FRANKREICH

Tel.: +33 389 911 320
E-Mail: contact@firalis.com
Web: www.firalis.com

Inhalt:

1. Verwendungszweck.....	5
2. Einführung	5
3. Prinzip des Assays.....	6
4. Instrumente und Materialien	6
4.1. Mit dem Kit gelieferte Reagenzien und Materialien.....	7
4.2. Benötigte Materialien und Instrumente.....	8
4.3. Lagerung und Haltbarkeit des Kits	8
5. Extraktion und Quantifizierung genomischer DNA (gDNA).....	8
5.1. Extraktion.....	8
5.2. Quantifizierung	8
6. Verfahren des APO-Easy® Genotypisierungsassays	9
6.1. Schritt 1: Vorbereitung der PCR-Reaktion für die Echtzeit Genotypisierung	9
6.2. Schritt 2. qPCR-Durchlauf.....	11
6.3. Schritt 3: Ergebnisanalyse	13
6.4. Schritt 4: Interpretation	15
7. Fehlerbehebung	15
8. Analytische Parameter.....	17
9. Klinische Leistung.....	17
10. Restrisiken und Warnhinweise	18
11. Beschränkungen des Verfahrens	20
12. Leitlinien zur chemischen Sicherheit	21
13. Technische Hinweise	21
14. Haftung.....	21
Technischer Kundendienst.....	22
Mitteilung über einen schweren Vorfall	22
Zusammenfassung der Sicherheit und Leistung	22
Weiterführende Informationen	23
Legende der in der Gebrauchsanweisung und auf den Etiketten des Kits verwendeten Symbole	24
Bevollmächtigte Vertreter.....	25

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1. Zur Anwendung des APO-Easy® Genotypisierungskits erforderliche Ausrüstung	7
Tabelle 2. Referenzen des empfohlenen gDNA-Extraktionskits (nicht im Lieferumfang des APO-Easy® Genotypisierungskits enthalten)	7
Tabelle 3. Inhalt des APO-Easy® Genotypisierungskits.	7
Tabelle 4. Überblick über den Workflow des APO-Easy Genotypierungsassays.	9
Tabelle 5. Muster-Layout einer Platte mit 96 Vertiefungen für die APOE-Genotypisierung von 24 Proben, 3 Kontrollen/SNP als Duplikat und 2 NTCs/SNP für das APO-Easy® Genotypisierungskit.	10
Tabelle 6. Standards für die SNP-Bestimmung des APO-Easy Genotypierungsassay.	11
Tabelle 7. qPCR-Programm im QS5-Gerät.	13
Tabelle 8. Interpretation des Genotyps aus den Ergebnissen der SNPs rs429358 und rs7412.	15
Tabelle 9. Empfehlungen zur Fehlerbehebung beim APO-Easy Genotypisierungskit.	16
Tabelle 10 Der APO-Easy Genotypierungsassay hat eine 100%ige Genauigkeit	18
Tabelle 11 Genotypbasierte Vergleiche zwischen Alzheimer-Patienten und Nicht-Alzheimer-Patienten + gesunden Kontrollpersonen	18

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1. Schematische Darstellung des menschlichen APOE-Gens und der Polymorphismen an 2 einzelnen Nukleotiden, die zu den 3 Allelen ε2, ε3 und ε4 führen.	6
Abbildung 2. Auswahl des Experimenttyps in den Experimenteigenschaften der QS5-Software. Wählen Sie „Genotyping“ (Genotypisierung) (roter Pfeil).	11
Abbildung 3. SNP-Setup für das APO-Easy Genotypisierungskit mit der QS5-Software.	12
Abbildung 4. Ergebnisseite des qPCR-Durchlaufs in der QS5-Software. Der rote Pfeil zeigt die Art des auszuwählenden Ergebnisses an „Allelic Discrimination“ (Allelunterscheidung) und der grüne Pfeil zeigt das Symbol für die Auswahl der SNPs an.	13
Abbildung 5. Muster der Signale der Standards für SNP rs429358 (Mastermix 1) nach der qPCR-Analyse.	14
Abbildung 6. Muster der Signale der Standards für SNP rs7412 (Mastermix 2) nach der qPCR-Analyse.	14
Abbildung 7. Interpretation der Ergebnisse mit der QS5-Software. Der rote Pfeil zeigt das Symbol an, das das Signal interpretiert, und der grüne Pfeil zeigt den Patientenstatus für jeden SNP an, der von der Software nach der Ergebnisanalyse ermittelt wurde.	15

Abkürzungen:

SNP: Einzelnukleotid-Polymorphismen

gDNA: genomische Desoxyribonukleinsäure

APOE: Apolipoprotein E

AD: Morbus Alzheimer

qPCR: qualitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

IVD: In-Vitro-Diagnostik

QS5-Dx: QuantStudio 5 Dx Real-Time PCR-System

NTC: Negativkontrolle

MUT: Mutant

WT: Wildtyp

Het: Heterozygot

RCF: Relative Zentrifugalkraft

°C: Grad Celsius

ng: Nanogramm

µl: Mikroliter

STD: Standard

IFU: Gebrauchsanweisung

SDB: Sicherheitsdatenblatt

1. Verwendungszweck

Das APO-Easy® Genotypisierungskit ist ein qualitativer In-vitro-Diagnostest für den Nachweis von zwei Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) rs429358 und rs7412 in der menschlichen genomischen DNA. Es ermöglicht die Bestimmung von sechs Apolipoprotein-E Genotypen (APOE-Genotypen): e2/e2, e2/e3, e3/e3, e2/e4, e3/e4 und e4/e4 basierend auf RT-PCR.

Das Ergebnis des APO-Easy® Genotypisierungstests soll Ärzten in Verbindung mit anderen klinischen Untersuchungen dabei helfen, das Risiko einer Person für die Entwicklung von Morbus Alzheimer zu beurteilen. Personen mit ε2-Allelen weisen das geringste Risiko für die Entwicklung von Alzheimer auf, was auf die schützende Wirkung dieser Allele hindeutet. Das Vorhandensein von ε3-Allelen wird hauptsächlich bei gesunden Personen beobachtet und verändert nicht das Risiko, an Alzheimer zu erkranken. Personen mit einem einzigen ε4-Allel (heterozygotes e2/e4 oder e3/e4) haben im Vergleich zu den anderen APOE-Genotypen ohne ε4 (e2/e2, e2/e3 und e3/e3) ein höheres Risiko, an Alzheimer zu erkranken. Das Vorhandensein von doppelten ε4-Allelen (homozygotes e4/e4) ist im Vergleich zu allen anderen APOE-Genotypen mit dem höchsten Alzheimer-Risiko verbunden.

Verwendungsbedingungen:

- Verschreibungspflichtig
- Zur Verwendung bei Erwachsenen (> 18 Jahre alt)
- Zur Verwendung in Molekularlaboren durch qualifiziertes Personal
- Dieser Test ist kein automatisiertes Verfahren.
- Der Test kann nicht vom Patienten selbst zu Hause durchgeführt werden. Es handelt sich weder um ein Point-of-Care-Gerät noch um ein Testgerät zur Selbstverwendung.
- Dieser Test ist nicht als Ersatz für klinische und diagnostische Untersuchungen gedacht.

2. Einführung

Apolipoprotein E (APOE) ist ein Chylomikron-Apolipoprotein, das in verschiedenen Organen wie der Leber, dem Gehirn, der Milz, den Nieren, den Geschlechtsdrüsen, Nebennieren und Makrophagen vorkommt ([Marias, 2019](#)). Es hat sich gezeigt, dass APOE für verschiedene Prozesse wie den Stoffwechsel von Lipoproteinen, fettlöslichen Vitaminen und Glukose/Energie sowie für die Signaltransduktion, Metastasierung und Angiogenese wichtig ist. Da APOE eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel spielt und für den normalen Abbau der triglyceridreichen Lipoproteinkomponenten erforderlich ist, wird es mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Verbindung gebracht ([Semaev et al., 2022](#)). Die Bedeutung von APOE in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie der frontotemporalen Demenz, Morbus Parkinson, der Lewy-Körperchen-Demenz und der Morbus Alzheimer ist gut dokumentiert ([Davis et al., 2020](#); [Mishra et al., 2017](#)).

Das APOE-Gen hat drei gemeinsame Allele (ε2, ε3 und ε4) und sechs verwandte Genotypen (ε3ε3, ε3ε2, ε2ε2, ε3ε4, ε4ε4 und ε2ε4) [[Su et al., 2017](#)]. Die entsprechenden Isoformen werden durch die Aminosäuren an den Positionen 112 und 158 charakterisiert und bestimmen die Affinität für Lipoproteinrezeptoren. APOE ε3 ist das häufigste Allel, von dem angenommen wird, dass es das

Alzheimer-Risiko weder erhöht noch verringert. APOE ε2 hat nachweislich eine schützende Wirkung gegen die Entwicklung von Alzheimer ([Ohm et al., 1999](#)), während APOE ε4 die Clearance von Beta-Amyloid (Aβ) reduziert, was im Alzheimer-Mausmodell zu einer verstärkten Aβ-Ablagerung innerhalb der Neuronen führt ([Yamazaki et al., 2019](#)). Etwa 25 Prozent der Menschen tragen eine Kopie von APOE ε4, und 2 bis 3 Prozent tragen zwei Kopien (<https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-genetics-fact-sheet>). [Mayeux et al., 1998](#) untersuchten 2188 Alzheimer-Patienten und wiesen nach, dass das Vorhandensein des APOE-ε4 Genotyps in Verbindung mit klinischen Kriterien die Spezifität der Alzheimer-Diagnose verbessert. Mehrere Studien haben gezeigt, dass der Genotyp APOE ε4 mit dem späten Auftreten von bekannten und sporadischen Alzheimer-Formen in Verbindung steht ([Corder et al., 1993](#), [Schmechel et al., 1993](#), [Strittmatter et al., 1993](#), [Farrer et al., 1997](#), [Bu G., 2009](#)).

Das APO-Easy® Genotypisierungskit verwendet die qualitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) zur In-vitro-Bestimmung von zwei APOE-Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs): rs429358 und rs7412. Dieser In-vitro-Test verwendet fluoreszenzmarkierte Sonden (FAM und VIC), die eine Unterscheidung der Allele und die Bestimmung des APOE-Genotyps ermöglichen.

3. Prinzip des Assays

Das APO-Easy® Genotypisierungskit enthält zur Bestimmung des APOE-Genotyps Reagenzien für eine qPCR-Analyse von genomischer DNA (gDNA), die aus PAXgene-DNA-Proben extrahiert wurde. Der Assay prüft 2 SNPs (rs429358 und rs7412) im APOE-Gen und enthält Positivkontrollen für jeden SNP (Wildtyp, Mutant und heterozygot). Der Genotyp wird auf der Grundlage des Mutationsstatus für beide analysierten Mutationen bestimmt und ergibt einen der sechs möglichen Genotypen (ε3ε3, ε3ε2, ε2ε2, ε3ε4, ε4ε4 und ε2ε4).

Für das Wildtyp-Allel (ApoE3) werden die Aminosäuren Cystein an Position 112 und Arginin an Position 158 nachgewiesen. Die Mutation ApoE4 (SNP rs429358) wirkt sich auf die Aminosäure an Position 112 aus und führt zu einem Wechsel von Thymin zu Cytosin, was die Translation von Arginin anstelle von Cystein bewirkt. Die Mutation ApoE2 (SNP rs7412) hingegen wirkt sich auf die Aminosäure an Position 158 aus, was dazu führt, dass Cytosin in Thymin umgewandelt wird, was die Translation von Cystein anstelle von Arginin bewirkt (Abbildung 1).

APOE2	APOE3	APOE4
• CYS 112: TGC	• CYS 112: TGC	• ARG 112: CGC
• CYS 158: TGC	• ARG 158: CGC	• ARG 158: CGC

Abbildung 1. Schematische Darstellung des menschlichen APOE-Gens und der Polymorphismen an 2 einzelnen Nukleotiden, die zu den 3 Allelen ε2, ε3 und ε4 führen.

4. Instrumente und Materialien

Das APO-Easy® Genotypisierungskit enthält Verbrauchsmaterialien zur Durchführung der qPCR-Amplifikation und des fluorogenen Nachweises von APOE-Mutationen mit dem ThermoFisher QS5-Dx (nicht im Kit enthalten). Die für den Assay benötigte, aber nicht im Kit enthaltene Ausrüstung und ihre Referenzen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1. Zur Anwendung des APO-Easy® Genotypisierungskits erforderliche Ausrüstung

Instrumente	Zweck	Hersteller	Referenz-Nr.	Zertifizierungen
Nanodrop 2000/2000c	Quantifizierung der gDNA	ThermoFisher	ND-2000	UL/CSA und CE
QS5-Dx	qPCR	ThermoFisher	A31928/A47324	FDA 510K (K190302)

Für die gDNA-Extraktion aus Vollblut-PAXgene-DNA-Röhrchen empfiehlt Firalis die Verwendung der in Tabelle 2 angegebenen Referenzwerte gemäß der mit dem Kit gelieferten Herstelleranweisung. Wenn andere Referenzen verwendet werden, kann Firalis weder die Ergebnisse noch die Leistungsfähigkeit des Assays garantieren. Die Proben müssen gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers des Entnahmeröhrchens in PAXgene® Blood DNA Tube (BD Biosciences, Referenznummer: 761165) gesammelt werden.

Tabelle 2. Referenzen des empfohlenen gDNA-Extraktionskits (nicht im Lieferumfang des APO-Easy® Genotypisierungskits enthalten).

Beschreibung	Hersteller	Zweck	Lagerung	Referenz	Menge
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit	Qiagen	gDNA-Extraktion	Gemäß der Empfehlung des Lieferanten	61104	1 Kit/50 Proben

4.1. Mit dem Kit gelieferte Reagenzien und Materialien

Das APO-Easy® Genotypisierungskit enthält gebrauchsfertige Mastermixe für 32 Reaktionen pro SNP, Positivkontrollen: Standard A, Standard B, Standard C, Standard D, Standard E, und ein Fläschchen mit einer Negativkontrolle (NTC). Mit den Reagenzien aus einem Kit sind insgesamt 32 Reaktionen möglich, darunter 6 Reaktionen für die Standards und 2 NTCs für jeden SNP und für jede Analyse (Tabelle 3).

Tabelle 3. Inhalt des APO-Easy® Genotypisierungskits.

Beschreibung	Lagerung	Referenz	Menge (32 Reaktionen)
TaqMan™ Genotypisierungs-Mastermix 1 rs429358	-15°C bis -25°C	FLS-MM1OE-02	1 Fläschchen
TaqMan™ Genotypisierungs-Mastermix 2 rs7412	-15°C bis -25°C	FLS-MM2OE-02	1 Fläschchen
Negativkontrolle (NTC)	-15°C bis -25°C	FLS-NTC-01	1 Fläschchen

Standard A: Mutant (MUT) rs7412	-15°C bis -25°C	FLS-OE2S-01	1 Fläschchen
Standard B: Wildtyp (WT) rs429358 und rs7412	-15°C bis -25°C	FLS-OE3S-01	1 Fläschchen
Standard C: Mutant (MUT) rs429358	-15°C bis -25°C	FLS-OE4S-01	1 Fläschchen
Standard D: Heterozygot (Het) rs7412	-15°C bis -25°C	FLS-OE23S-01	1 Fläschchen
Standard E: Heterozygot (Het) rs429358	-15°C bis -25°C	FLS-OE34S-01	1 Fläschchen

*Positivkontrollen: Standard A, Standard B, Standard C, Standard D, Standard E. Negativkontrolle: NTC

4.2. Benötigte Materialien und Instrumente

- 📖 Nuklease-freies Wasser
- 📖 Verwenden Sie nur zertifizierte nukleasefreie Spitzen und Mikrozentrifugenröhrchen
- 📖 Präzisionspipetten - Mehrkanalpipette
- 📖 BSL2-Schrank
- 📖 Mikrozentrifuge (17.000 Relative Zentrifugalkraft (RCF))
- 📖 Vortex und Mikrozentrifuge
- 📖 Echtzeit-PCR-Platten
- 📖 Kompakte PCR-Plattenschleuder

4.3. Lagerung und Haltbarkeit des Kits

- 📖 Das Kit muss bei -20°C gelagert werden.
- 📖 Die Bestandteile des Kits können dreimal aufgetaut und eingefroren werden und bleiben dabei stabil. Eine Überschreitung des empfohlenen Gefrier- und Auftauzyklus kann die Funktionalität des Kits beeinträchtigen.
- 📖 Das Kit ist bis zu dem auf dem Etikett der Verpackung angegebenen Verfallsdatum haltbar.

5. Extraktion und Quantifizierung genomischer DNA (gDNA)

5.1. Extraktion

Extraktion von gDNA aus menschlichem Vollblut, das in PAXgene-Blut-DNA-Röhrchen entnommen wurde, mit dem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit gemäß Tabelle 2 und unter Beachtung des mit dem Kit gelieferten Benutzerdatenblatts.

5.2. Quantifizierung

Die Quantifizierung der extrahierten gDNA wird mit Nanodrop durchgeführt. Die Proben müssen eine Mindestkonzentration von 6,25 ng/µl und eine Maximalkonzentration von 50 ng/µl aufweisen. Wenn die Proben eine höhere Konzentration als die empfohlene aufweisen, müssen sie mit Nuklease-freiem

Wasser (Molekularqualität) verdünnt werden. Wenn die Proben eine geringere Konzentration als die erforderliche Menge aufweisen, sollten insgesamt 2 µl verwendet werden. **Für den APO-Easy® Genotypisierungstest werden 12,5 bis 100 ng gDNA verwendet.**

6. Verfahren des APO-Easy® Genotypierungsassays

Ein Überblick über den Arbeitsablauf des APO-Easy Genotypierungsassays ist in Tabelle 4 dargestellt. Die für den Assay benötigte Zeit beträgt: 2h30.

Tabelle 4. Überblick über den Workflow des APO-Easy Genotypierungsassays.

Workflow	
Schritt 1	Vorbereitung der PCR-Reaktion für die Echtzeit Genotypisierung
Schritt 2	qPCR-Durchlauf
Schritt 3	Ergebnisanalyse
Schritt 4	Interpretation

6.1. Schritt 1: Vorbereitung der PCR-Reaktion für die Echtzeit Genotypisierung

Das Kit umfasst zwei gebrauchsfertige TaqMan™ Genotypierungs-Mastermixe zur Bestimmung von APOE-SNPs (rs429358 und rs7412), nukleasefreies Wasser für die NTC sowie Standards zur Nachahmung von Wildtyp, Mutante und heterozygotem Zustand für jeden Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP).

Jeder Mastermix ist ein Dualplex-Assay, der den fraglichen SNP bewertet:

Mastermix 1: besteht aus 2 Sonden zur Bewertung des SNP rs429358 und zur Unterscheidung der Allele für das Wildtyp-Nukleotid (T), das mutierte Nukleotid (C) sowie den heterozygoten Zustand.

Mastermix 2: besteht aus 2 Sonden zur Bewertung des SNP rs7412 und zur Unterscheidung der Allele für das Wildtyp-Nukleotid (C), das mutierte Nukleotid (T) sowie den heterozygoten Zustand.

Standard A, B, C, D und E:

Jeder Standard (STD) ist eine DNA-Vorlage, die die drei Allele und die Kombination verschiedener DNA-Vorlagen, die den heterozygoten Zustand nachahmen, nachbilden soll.

Standard A: DNA-Vorlage des Allels ApoE2

Standard B: DNA-Vorlage des Allels ApoE3

Standard C: DNA-Vorlage des Allels ApoE4

Standard D: DNA-Vorlage mit Allel ApoE2 und ApoE3

Standard E: DNA-Vorlage mit Allel ApoE3 und ApoE4

Hinweis: Tauen Sie die Mastermixe und die Standards auf Eis auf. Mischen Sie die Reagenzien gründlich, schleudern Sie sie kurz ab und stellen Sie sie auf Eis.

1. Geben Sie 23 µl/Vertiefung des Mastermix für den Detektionsassay in eine 96er Vertiefungsplatte (für jede Probe muss der Mastermix für beide SNPs hinzugefügt werden).
 2. Geben Sie 2 µl gDNA oder die Standardlösungen in die entsprechenden Vertiefungen und schleudern Sie sie kurz. Die Gesamtmenge an gDNA in einer Reaktion muss zwischen 12,5 und 100 ng liegen.
- Jeder einzelne SNP **erfordert die Analyse von WT-, MUT- und HET-Standards** sowie eine **NTC** (nukleasefreies Wasser molekularer Qualität). In Tabelle 5 ist ein Muster-Layoutplan für die Analyse von bis zu 24 PAXgene-DNA-Proben, die auf 2 SNPs in einer PCR-Platte mit 96 Vertiefungen untersucht werden, dargestellt.
 - Hinweis: Mit dem APO-Easy Genotypisierungskit können bis zu 32 qPCR-Reaktionen durchgeführt werden. Jeder Mastermix ist für 8 STD und bis zu 24 Proben ausgelegt. Wenn eine geringere Anzahl von Proben untersucht werden soll, kann das Kit zweimal verwendet werden, z. B. können beim ersten Mal 8 STD plus 8 Patienten untersucht und beim zweiten Mal wiederum 8 STD plus 8 Patienten untersucht werden.

Tabelle 5. Muster-Layout einer Platte mit 96 Vertiefungen für die APOE-Genotypisierung von 24 Proben, 3 Kontrollen/SNP als Duplikat und 2 NTCs/SNP für das APO-Easy® Genotypisierungskit.

APOE (rs429358)						APOE (rs7412)						
Spalte 1		Spalte 2	Spalte 3	Spalte 4	Spalte 5	Spalte 6	Spalte 7	Spalte 8	Spalte 9	Spalte 10	Spalte 11	Spalte 12
A	STD B: WT	Probe 1	Probe 9	Probe 17			STD B: WT	Probe 1	Probe 9	Probe 17		
B	STD B: WT	Probe 2	Probe 10	Probe 18			STD B: WT	Probe 2	Probe 10	Probe 18		
C	STD C: MUT	Probe 3	Probe 11	Probe 19			STD A: MUT	Probe 3	Probe 11	Probe 19		
D	STD C: MUT	Probe 4	Probe 12	Probe 20			STD A: MUT	Probe 4	Probe 12	Probe 20		
E	STD E: HET	Probe 5	Probe 13	Probe 21			STD D: HET	Probe 5	Probe 13	Probe 21		
F	STD E: HET	Probe 6	Probe 14	Probe 22			STD D: HET	Probe 6	Probe 14	Probe 22		
G	NTC	Probe 7	Probe 15	Probe 23			NTC	Probe 7	Probe 15	Probe 23		
H	NTC	Probe 8	Probe 16	Probe 24			NTC	Probe 8	Probe 16	Probe 24		

- Für jede SNP-Assay-Bestimmung muss der folgende STD wie unten angegeben verwendet werden. Für rs429358 (Mastermix 1) müssen die Standards B, C und E verwendet werden, und für rs7412 (Mastermix 2) müssen die Standards B, A und D verwendet werden (Tabelle 6).

Tabelle 6. Standards für die SNP-Bestimmung des APO-Easy Genotypisierungsassay.

APOE (rs429358)	APOE (rs7412)
STD B (WT)	STD B (WT)
STD C (MUT)	STD A (MUT)
STD E (HET)	STD D (HET)

3. Die Platte 5 Sekunden lang vortexen und 30 Sekunden lang bei 500 g zentrifugieren.
4. Starten Sie den Durchlauf **sofort**.

6.2. Schritt 2. qPCR-Durchlauf

5. Einstellung des QS5 Dx für den APO-Easy Genotypisierungsassay:

A. Weisen Sie auf der Seite „Properties“ (Eigenschaften) einen Experimentnamen zu und wählen Sie als Experimenttyp **„Genotyping“** (Genotypisierung) (Abbildung 2).

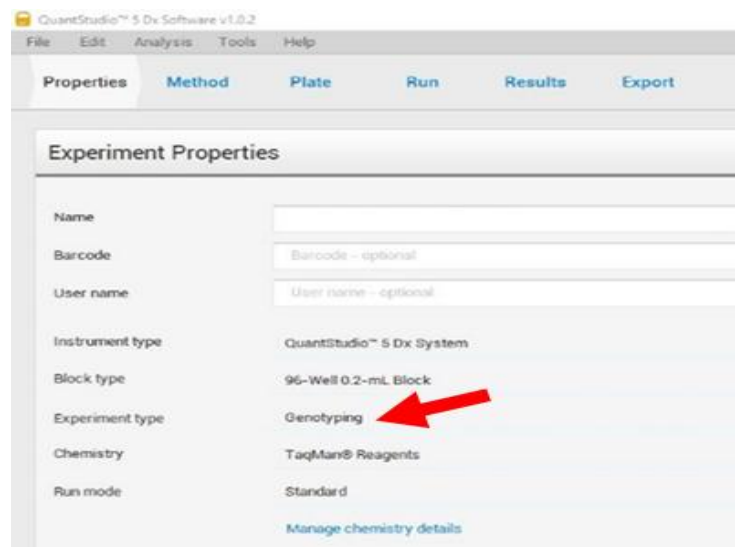


Abbildung 2. Auswahl des Experimenttyps in den Experimenteigenschaften der QS5-Software. Wählen Sie „Genotyping“ (Genotypisierung) (roter Pfeil).

B. Stellen Sie auf der Seite „Method“ (Methode) das Gesamtvolumen der PCR-Reaktion ein: **25 µl** Reaktionsmischung.

C. Gehen Sie auf der Seite „Plate“ (Platte) in das erweiterte Setup, um die Fluoreszenz einzustellen, und klicken Sie auf die Schaltfläche „+“, um **zwei SNP-Assays** zu erstellen (SNP-Assay 1 & SNP-Assay 2). Klicken Sie auf die Schaltfläche OK, um fortzufahren. Klicken Sie dann für jeden SNP-Assay auf die Schaltfläche „Action“ (Aktion) und wählen Sie „Edit“ (Bearbeiten), um den Namen wie folgt einzugeben (Abbildung 3):

HINWEIS: Für **SNP Assay 1: rs429358** (Mastermix 1). Achten Sie darauf, dass **Allel 1** mit dem **Reporter VIC** und **Allel 2** mit dem **Reporter FAM** gesetzt wird.

HINWEIS: Für **SNP Assay 2: rs7412** (Mastermix 2). Achten Sie darauf, dass **Allel 1** mit dem **Reporter VIC** und **Allel 2** mit dem **Reporter FAM** gesetzt wird.

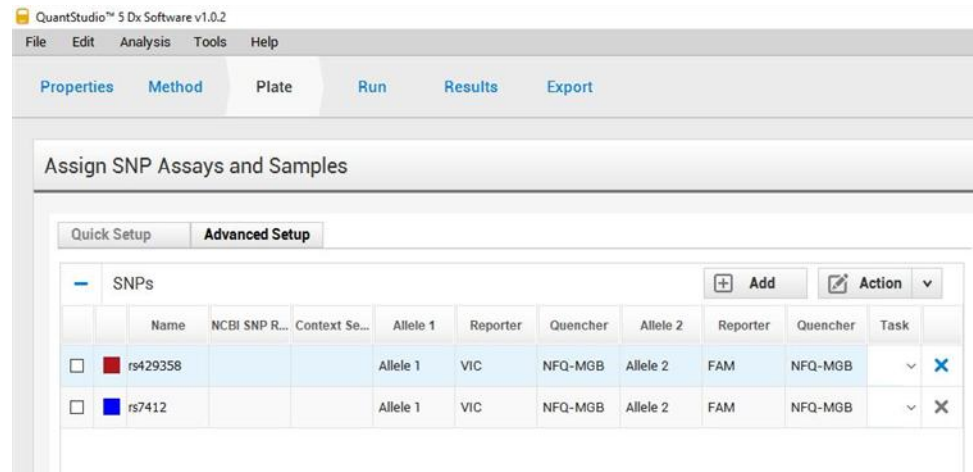


Abbildung 3. SNP-Setup für das APO-Easy Genotypisierungskit mit der QS5-Software.

6. Um Standards für rs429358 (Mastermix 1) zu definieren, wählen Sie im „Plate Design“ (Plattendesign) Spalte 1 und dann „SNP Assay 1“ (rs429358). Wählen Sie dann A1 und B1 („STD B (WT)“) und weisen Sie 2/2 in der Aufgabenleiste zu. Wählen Sie C1 und D1 („STD C (MUT)“) und weisen Sie 1/1 in der Aufgabenleiste zu. Wählen Sie E1 und F1 („STD E (HET)“) und weisen Sie 1/2 in der Aufgabenleiste zu. Wählen Sie G1 und H1 und weisen Sie N in der NTC-Aufgabenleiste zu.
7. Um Standards für rs7412 (Mastermix 2) zu definieren, wählen Sie im „Plate Design“ (Plattendesign) Spalte 7 und dann „SNP Assay 2“ (rs7412). Wählen Sie dann A7 und B7 („STD B (WT)“) und weisen Sie 1/1 in der Aufgabenleiste zu. Wählen Sie C7 und D7 („STD A (MUT)“) und weisen Sie 2/2 in der Aufgabenleiste zu. Wählen Sie E7 und F7 („STD D (HET)“) und weisen Sie 1/2 in der Aufgabenleiste zu. Wählen Sie G7 und H7 und weisen Sie N in der NTC-Aufgabenleiste zu.
8. Um Proben für rs429358 (Mastermix 1) zu definieren, wählen Sie im „Plate Design“ (Plattendesign) Spalte 2 und 4 und dann „SNP Assay 1“ (rs429358).
9. Um Proben für rs7412 (Mastermix 2) zu definieren, wählen Sie im „Plate Design“ (Plattendesign) Spalte 8 und 10 und dann „SNP Assay 2“ (rs7412).
10. Sobald die Platte fertig ist und die Einstellungen vorgenommen wurden, gehen Sie auf die Seite „Run“ (Durchlauf) und starten Sie den Durchlauf.
11. Das qPCR-Programm wird automatisch vom QS5-Dx ausgewählt und die Programmspezifikation sollte wie in Tabelle 7 angegeben sein:

Tabelle 7. qPCR-Programm im QS5-Gerät.

Programm	Temperatur °C	Uhrzeit	Zyklen
Aktivierung	95	10 min	40
Denaturierung	95	15 s	
Erweiterung	60	1 min	

6.3. Schritt 3: Ergebnisanalyse

Vor der Analyse des Probenergebnisses ist das für den STD erhaltene Signal mit dem entsprechenden Detektionsassay im Modus „Allelic Discrimination“ (Allelunterscheidung) zu überprüfen. Die Ergebnisse des qPCR-Durchlaufs sind auf der Ergebnisseite der QS5 Dx-Software zu finden (Abbildung 4). Wählen Sie auf dieser Seite „Allelic Discrimination“ (Allelunterscheidung) (roter Pfeil). Die Aussagekraft der Analyse sollte für jede Mutation einzeln bewertet werden. Die Auswahl von rs429358 oder rs7412 erfolgt durch Klicken auf das mit dem grünen Pfeil markierte Symbol.

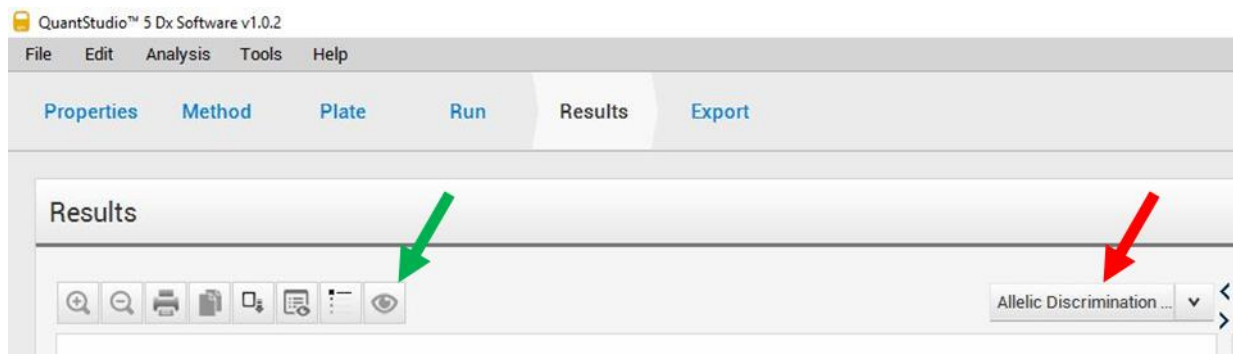


Abbildung4. Ergebnisseite des qPCR-Durchlaufs in der QS5-Software. Der rote Pfeil zeigt die Art des auszuwählenden Ergebnisses an „Allelic Discrimination“ (Allelunterscheidung) und der grüne Pfeil zeigt das Symbol für die Auswahl der SNPs an.

Für den STD und die NTC kann die Analyse fortgesetzt werden, wenn die STD-Signale dem folgenden Beispiel entsprechen. Vergewissern Sie sich, dass Ihre Standards ein ähnliches Muster aufweisen wie in Abbildung 3 dargestellt. Bei rs429358 ist das Signal des Wildtyps (WT) im oberen linken Bereich des Diagramms auf der y-Achse zu finden (Allel 2), was dem homozygoten Allel 2/Allel 2 (e3) entspricht. Der Mutationsstandard (MUT) weist im rechten unteren Bereich des Diagramms ein Signal nahe der x-Achse (Allel 1) auf, das dem Allel 1/Allel 1 (e4) entspricht. Der heterozygote Standard liegt zwischen MUT und WT und entspricht dem heterozygoten Allel 1/Allel 2 (e3/e4), wie in **Abbildung 5** dargestellt. Die NTC erzeugt kein Signal und befindet sich unten links im Diagramm.

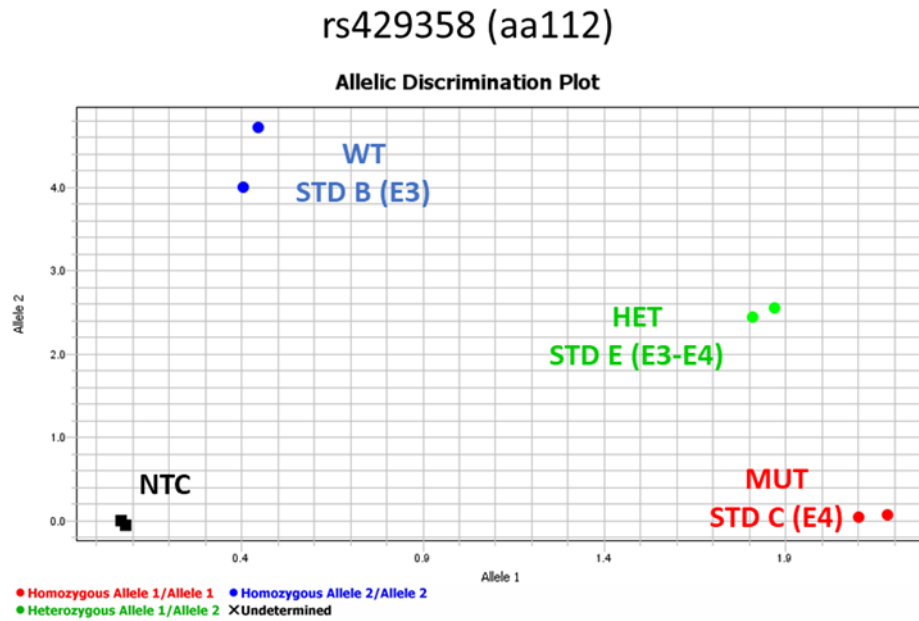


Abbildung 5. Muster der Signale der Standards für SNP rs429358 (Mastermix 1) nach der qPCR-Analyse.

Bei rs7412 ist das Signal für den Wildtyp (WT) unten rechts in der Nähe der x-Achse des Diagramms, das dem homozygoten Allel 1/Allel 1 (e3) entspricht. Der Mutantenstandard (MUT) weist ein Signal im oberen linken Bereich der y-Achse des Diagramms auf, das dem Allel 2/Allel 2 (e2) entspricht. Der heterozygote Standard liegt zwischen MUT und WT und entspricht dem heterozygoten Allel 1/Allel 2 (e2/e3), wie in **Abbildung 6** dargestellt. Die NTC erzeugt kein Signal und befindet sich unten links im Diagramm.

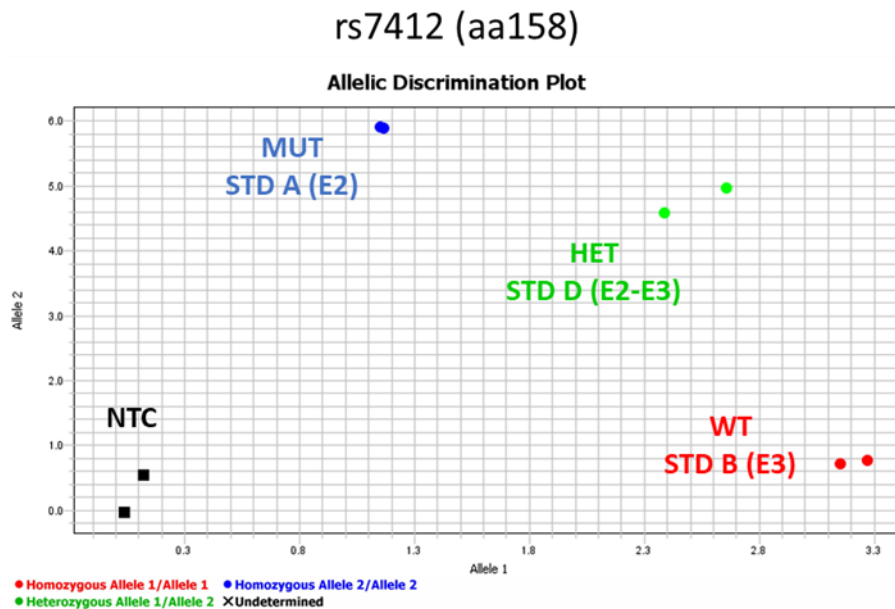
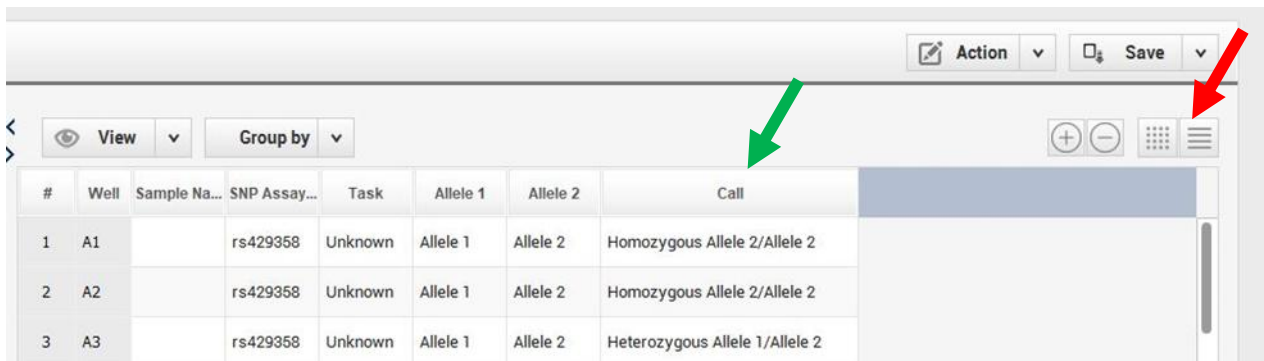


Abbildung 6. Muster der Signale der Standards für SNP rs7412 (Mastermix 2) nach der qPCR-Analyse.

6.4. Schritt 4: Interpretation

Sobald die Kontrollen validiert sind, werden die Probensignale durch Klicken auf das mit dem roten Pfeil markierte Symbol interpretiert. Für jeden SNP ist der Patientenstatus in der Spalte „Call“ (Abruf) verfügbar (grüner Pfeil; Abbildung 7).



#	Well	Sample Na...	SNP Assay...	Task	Allele 1	Allele 2	Call
1	A1		rs429358	Unknown	Allele 1	Allele 2	Homozygous Allele 2/Allele 2
2	A2		rs429358	Unknown	Allele 1	Allele 2	Homozygous Allele 2/Allele 2
3	A3		rs429358	Unknown	Allele 1	Allele 2	Heterozygous Allele 1/Allele 2

Abbildung 7. Interpretation der Ergebnisse mit der QS5-Software. Der rote Pfeil zeigt das Symbol an, das das Signal interpretiert, und der grüne Pfeil zeigt den Patientenstatus für jeden SNP an, der von der Software nach der Ergebnisanalyse ermittelt wurde.

Bei rs429358 entspricht das homozygote Allel 2/Allel 2 dem WT, das homozygote Allel 1/Allel 1 dem MUT und das heterozygote Allel 1/Allel 2 dem HET.

Bei rs7412 entspricht das homozygote Allel 1/Allel 1 dem WT, das homozygote Allel 2/Allel 2 dem MUT und das heterozygote Allel 1/Allel 2 dem HET.

Sobald der Status für jeden SNP zugewiesen ist, kann der Genotyp der Probe anhand der nachstehenden Tabelle 8 bestimmt werden.

Tabelle 8. Interpretation des Genotyps aus den Ergebnissen der SNPs rs429358 und rs7412.

rs429358	rs7412	Genotyp
WT	MUT	e2/e2
WT	HET	e2/e3
WT	WT	e3/e3
HET	HET	e2/e4
MUT	WT	e4/e4
HET	WT	e3/e4

7. Fehlerbehebung

Die Bewertung der Testergebnisse sollte erfolgen, nachdem die Positiv- und Negativkontrollen untersucht und für gültig und akzeptabel befunden worden sind. Wenn die Kontrollen nicht gültig sind, können die Ergebnisse der Probe nicht interpretiert werden.

Wenn der Assay fehlschlägt:

- Überprüfen Sie die Verfallsdaten der einzelnen Reagenzien und stellen Sie sicher, dass alle Reagenzien entsprechend den Angaben auf dem Produktetikett gelagert wurden. Wenn die

Lagerungsbedingungen nicht strikt eingehalten wurden, sind die Ergebnisse nicht zuverlässig, und das Kit kann nicht mehr verwendet werden.

- Vergewissern Sie sich, dass die Kalibrierungen der verwendeten Pipetten auf dem neuesten Stand sind.
- Vergewissern Sie sich, dass die Cycler-Einstellungen den Angaben in der Gebrauchsanweisung entsprechen.

Mögliche Gründe und Abhilfemaßnahmen für einige der während des Assays festgestellten Mängel sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9. Empfehlungen zur Fehlerbehebung beim APO-Easy Genotypisierungskit.

Ergebnisse	Mögliche Gründe und Abhilfemaßnahmen
Keine „Calls“ (Abrufe) in allen Kanälen einer Probe	Grund: Probleme mit der Qualität der gDNA oder störende Substanzen Empfehlung: Extrahieren Sie die Probe erneut und führen Sie die qPCR erneut durch.
Kein Signal in einem oder zwei Kanälen	Grund: wenn nur bei einer Probe, dann wiederholen Sie die qPCR-Analyse; wenn bei allen Proben, dann überprüfen Sie das Verfallsdatum des Kits und die Lagerbedingungen.
Unbestimmter Genotyp für einen SNP	Grund: Der gDNA-Input war nicht ausreichend. Empfehlung: Wiederholen Sie den Test. Verwenden Sie während desselben Assays für dieselbe Probe 2 µl der Proben-gDNA mit 23 µl des Mastermixes und 4 µl der Proben-gDNA mit 21 µl des Mastermixes.
Nach einem erneuten Test ist der Genotyp immer noch unbestimmt	Grund: Vorhandensein einer störenden Substanz in der Probe. Empfehlung: - Der Zusatz von K2EDTA im PAXgene-DNA-Röhrchen könnte die Genotypisierung der Probe beeinträchtigen. Bitte überprüfen Sie, ob EDTA im Röhrchen zugesetzt wurde bzw. ob die Blutprobe gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers richtig entnommen wurde. - Die Triglyceride im Blut sollten die physiologische Konzentration nicht überschreiten (normale Konzentration im Blut: 0,5 - 1,5 g/l). Ein Überschuss an Triglyceriden in der Blutprobe könnte die korrekte Genotypisierung des Patienten beeinträchtigen. - Albumin sollte die physiologische Konzentration nicht überschreiten (normale Konzentration im Blut: 35 - 50 g/l).

	Übersteigt die Anwesenheit von Albumin in der Blutprobe des Patienten diese Konzentration, kann dies die Ergebnisse der Genotypisierung beeinträchtigen. Wenn das Problem weiterhin besteht, wenden Sie sich an den technischen Kundendienst.
Bedienelemente haben kein Signal	Vergewissern Sie sich, dass die angegebenen Lagerungsbedingungen und -anweisungen eingehalten wurden. Es könnte ein Pipettierproblem aufgetreten sein. Empfehlung: Wiederholen Sie den Test. Wenn Sie immer noch kein Signal haben, wenden Sie sich an den technischen Kundendienst.
Signal in NTC	Grund: Die Reaktionsmischung war höchstwahrscheinlich mit einer Vorlage verunreinigt. Empfehlung: Wiederholen Sie die qPCR-Analyse. Wenn das Problem weiterhin besteht, verwenden Sie das Kit nicht weiter und wenden Sie sich an den technischen Kundendienst.

8. Analytische Parameter

Genauigkeit: Das APO-Easy® Genotypisierungskit weist im Vergleich zu den Referenzmethoden (bidirektionale Sanger-Sequenzierung und Next Generation Sequencing) APOE-Genotypen mit einer Genauigkeit von 100 % nach.

Sensitivität: Der APO-Easy® Genotypisierungsassay weist 12,5 ng menschlicher gDNA nach, wenn er mit dem QuantStudio 5 Dx Real-Time PCR-System verwendet wird.

Präzision: Das APO-Easy® Genotypisierungskit ist reproduzierbar und liefert 100 % positive Ergebnisse, wenn verschiedene Chargen getestet werden oder wenn es von verschiedenen Anwendern verwendet wird.

Interferenzen: Ein Überschuss an Ethanol bis 20 %, ein Überschuss an Bilirubin bis 200 mg/ml, ein Überschuss an K2EDTA bis 20 mg/ml, ein Überschuss an Albumin bis 25 g/l, ein Überschuss an Hämoglobin bis 100 g/l oder ein Überschuss an Triglyceriden bis 18,2 g/l in der Probe **beeinträchtigt die Genotypisierungsergebnisse nicht**.

9. Klinische Leistung

Das APO-Easy Genotypisierungskit erfüllt seinen Verwendungszweck, da es eine 100%ige positive prozentuale Übereinstimmung aufweist, wenn die Ergebnisse mit der bidirektionalen Sanger-Sequenzierung und dem Targeted Next-Generation Sequencing verglichen werden.

Tabelle 10 Der APO-Easy Genotypisierungsassay hat eine 100%ige Genauigkeit

APOE-Genotyp	APO-Easy®	Gezieltes NGS	Korrekte Genotyp-Abrufe	Genauigkeit	Sanger-Sequenzierung	Korrekte Genotyp-Abrufe	Genauigkeit
e3/e3	25	25	25	100	25	25	100
e4/e4	21	21	21	100	21	21	100
e2/e4	6	6	6	100	6	6	100
e3/e4	23	23	23	100	23	23	100
e2/e3	21	21	21	100	21	21	100

Bei einem Vergleich der APOE-Genotyphäufigkeiten von Alzheimer-Patienten mit denen von Nicht-Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollpersonen zusammengefasst erhöhte das Vorhandensein von zwei Kopien des ε4-Allels (e4/e4-Homozygote) das Alzheimer-Risiko im Vergleich zu e2/e3 um das 48,56-fache. Das Vorhandensein einer Kopie des ε4-Allels erhöhte das Alzheimer-Risiko im Vergleich zu e2/e3 bei e3/e4-Heterozygoten um das 9,54-fache und bei e2/e4-Heterozygoten um das 5,78-fache.

Tabelle 11 Genotypbasierte Vergleiche zwischen Alzheimer-Patienten und Nicht-Alzheimer-Patienten + gesunden Kontrollpersonen

Genotyp	Gruppe		OR [95% KI]	p
	Alzheimer-Patienten (n=234)	Nicht-Alzheimer-Patienten + gesunde Kontrollpersonen (n=302)		
e2/e2	0 (0)	1 (0,33)	1,47 [0,05-39,32]	0,8181
e2/e3	8 (3,42)	37 (12,25)	1 (Ref)	
e2/e4	5 (2,14)	4 (1,32)	5,78 [1,26-26,45]	0,0237*
e3/e3	80 (34,19)	208 (68,87)	1,78 [0,79-3,98]	0,1616
e3/e4	99 (42,31)	48 (15,89)	9,54 [4,12-22,06]	<0,0001*
e4/e4	42 (17,95)	4 (1,32)	48,56 [13,52-174,49]	<0,0001*

10. Restrisiken und Warnhinweise

Das Design und die Leistungsmerkmale des APO-Easy® Genotypisierungskits wurden durch umfassende Tests im eigenen Haus und in den Händen der vorgesehenen Benutzer optimiert, was bei der Untersuchung von für die vorgesehene Patientenpopulation repräsentativen Gruppen bestätigt wurde. Firalis, die Herstellerfirma, hält die verbleibenden Risiken für Benutzer und Patienten bei Gentests für minimal und akzeptabel.

- ⌋ Negative Ergebnisse schließen Gesundheitsrisiken nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für Entscheidungen über die Behandlung des Patienten herangezogen werden.
- ⌋ Negative und positive Ergebnisse müssen mit klinischen Beobachtungen, der Patientenanamnese und anderen Testinformationen kombiniert werden.

Die Risiken bei der Verwendung des APO-Easy Genotypisierungskits sind minimal, wenn der Test wie vorgesehen verwendet wird. Die Benutzer können das Risiko weiter minimieren, indem sie die folgenden Empfehlungen befolgen:

Probenkontamination: Die Kontamination von Proben mit Fremd-DNA oder möglichen Störfaktoren kann zu ungenauen Ergebnissen führen. Die Nutzung von sauberen Arbeitsplätzen, Einweghandschuhen und spezieller Ausrüstung für die Probenvorbereitung wird dieses Restrisiko mindern.

Kreuzkontamination: Bei unsachgemäßer Handhabung von Reagenzien oder Proben kann es zu Kreuzkontaminationen zwischen Proben kommen, was zu falschen Ergebnissen führt. Halten Sie getrennte Arbeitsbereiche für die Probenvorbereitung, die DNA-Extraktion und das PCR-Setup ein und arbeiten Sie beim Umgang mit Pipetten und anderen Geräten in einer sauberen Umgebung, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Ergebnisanzeige: Unerfahrene Benutzer können die Ergebnisse falsch interpretieren, was zu falschen Schlussfolgerungen führen kann. Die Auswertung des APO-Easy Genotypisierungsassays muss von gut geschultem Personal vorgenommen werden, um das Risiko einer falschen Ergebnisbestimmung zu minimieren.

Unzureichende Schulung: Benutzer mit unzureichender Schulung oder Erfahrung verursachen möglicherweise häufiger Fehler bei der Einrichtung oder Interpretation des Assays. Wir empfehlen die Anwendung des APO-Easy-Tests nur hochqualifiziertem Personal.

11. Beschränkungen des Verfahrens

- Die Reagenzien sind nicht zur Verwendung in therapeutischen Verfahren bestimmt.
- Es handelt sich nicht um eine automatisierte Methode und nicht um ein Selbsttestgerät.
- Dieser Assay ist für den Nachweis des APOE-Genotyps aus menschlichen PAXgene-DNA-Röhrchen innerhalb des Assay-Nachweisbereichs bestimmt.
- Die Ergebnisse dieses Assays müssen im Zusammenhang mit allen relevanten klinischen Laborbefunden interpretiert und dürfen nicht allein für eine Diagnose verwendet werden.
- Die Kontamination von genomischem Material aus externen Quellen muss durch eine sorgfältige Handhabung der Proben, der Kit-Reagenzien und eine saubere Arbeitsumgebung vermieden werden.
- Die Anwender müssen mikrobielle Verunreinigungen während der Verfahren vermeiden und sollten die Bestandteile des Kits nicht verwenden, wenn Anzeichen von mikrobiellem Wachstum zu beobachten sind.
- Dieses Kit ist für die Verwendung mit dem QS5-Dx Real-Time PCR-System (ThermoFisher) vorgesehen.
- Um optimale Ergebnisse zu erzielen, müssen die Empfehlungen in der Gebrauchsanweisung des Assay-Kits strikt eingehalten werden.
- Für jeden Karton des Kits müssen die Verfallsdaten und die Aufbewahrungsbedingungen beachtet werden. Verwenden Sie das Kit nicht, wenn es abgelaufen ist oder wenn es falsch gelagert wurde.
- Die Reagenzien dürfen nicht mit Reagenzien aus anderen Chargen oder Quellen gemischt oder ersetzt werden.
- Verwenden Sie nur zertifizierte nukleasefreie Spitzen und Mikrozentrifugenröhrchen.
- Verwenden Sie Nuklease-freies Wasser in sauberen Behältern.
- Jede Abweichung von dem in der Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren kann zu Abweichungen im Ergebnis führen.
- Die APO-Easy®-Genotypisierung ist nicht dazu bestimmt, das Ansprechen auf eine Therapie vorherzusagen bzw. zu erkennen oder bei der Auswahl der optimalen Therapie für Patienten zu helfen.

12. Leitlinien zur chemischen Sicherheit

Minimierung der von Chemikalien ausgehenden Gefahren:

- § Lesen Sie die vom Chemikalienhersteller bereitgestellten Sicherheitsdatenblätter (SDB), bevor Sie Chemikalien oder Gefahrstoffe lagern, handhaben oder damit arbeiten.
- § Vermeiden Sie den direkten Kontakt mit Chemikalien.
- § Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien eine geeignete persönliche Schutzausrüstung, wie Schutzbrille, Handschuhe und Schutzkleidung.
- § Vermeiden Sie das Einatmen von Chemikalien. Rauchen Sie nicht und lassen Sie die Chemikalienbehälter nicht offen stehen. Nur bei ausreichender Belüftung oder in einem Dunstabzug verwenden.
- § Weitere Sicherheitsrichtlinien finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.
- § Überprüfen Sie regelmäßig, ob Chemikalien auslaufen oder verschüttet wurden. Wenn ein Leck oder ein Verschütten auftritt, befolgen Sie die Reinigungsverfahren des Herstellers laut Sicherheitsdatenblatt.
- § Halten Sie alle lokalen oder nationalen Gesetze und Vorschriften in Bezug auf die Lagerung, Handhabung und Entsorgung von Chemikalien ein.

13. Technische Hinweise

- § Technische Unterstützung bei der DNA-Extraktion finden Sie im Datenblatt zum empfohlenen QIAamp DSP DNA Blood Mini-Kit (Ref. 61104) von Qiagen.
- § Vermeiden Sie jegliche Kontamination von Proben und Reagenzien. Wechseln Sie zu diesem Zweck bei jedem Schritt die Spitzen. Eine bakterielle oder fungale Kontamination der Reagenzien kann zu falschen Ergebnissen führen.
- § Entsorgen Sie Verbrauchsmaterialien und unbenutzte Inhalte in geeigneten Behältern.
- § Das Verfahren ist nur für die Verwendung von Vollblut aus PAXgene DNA-Röhrchen geeignet.

14. Haftung

- § Dieses Kit ist nur für die In-vitro-Bestimmung des APOE-Genotyps in menschlichem Vollblut aus PAXgene DNA-Röhrchen bestimmt.
- § Dieses Kit ist nur für den Gebrauch durch qualifiziertes Personal bestimmt.
- § Firalis haftet nicht für Schäden oder Verluste, die durch die Verwendung des Kits auf eine andere Weise als in dieser Anleitung ausdrücklich angegeben entstehen.
- § Firalis ist nicht verantwortlich für eventuelle Patentverletzungen, die sich aus der Verwendung oder Ableitung dieses Produkts ergeben könnten.

Technischer Kundendienst

Für technische Unterstützung wenden Sie sich bitte an den technischen Kundendienst von Firalis SA unter +33-389 911 320 oder besuchen Sie die Website von Firalis SA unter <http://www.firalis.com> oder kontaktieren Sie „contact@firalis.com“.

Mitteilung über einen schweren Vorfall

Ein schwerwiegender Vorfall ist die Ursache für eine Fehlfunktion oder eine Verschlechterung der Eigenschaften oder der Leistung eines Produkts und kann in mindestens eine der folgenden Kategorien eingeteilt werden:

- Tod eines Patienten, Benutzers oder einer anderen Person
- Vorübergehende oder dauerhafte ernsthafte Verschlechterung des Gesundheitszustandes eines Patienten, Benutzers oder einer anderen Person
- Ernste Gefahr für die öffentliche Gesundheit.

Im Zweifelsfall sollten sich die Benutzer immer melden.

Wenn Sie zu dem Schluss kommen, dass es sich um einen meldepflichtigen Vorfall handelt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller unter clinical@firalis.com. Die Kontaktinformationen der zuständigen Behörde in Ihrem Land finden Sie auch hier: https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en.

Wenn Sie einen schweren Vorfall melden, stellen Sie bitte die folgenden Informationen zusammen:

- Handelsname des Geräts (TM für Markenzeichen, © für Urheberrecht)
- Name und Anschrift des Herstellers
- Chargennummer
- Seriennummer
- UDI (Unique Device Identification) Code
- Eine genaue und prägnante Beschreibung des schwerwiegenden Vorfalls und der (möglicherweise) schwerwiegenden Folgen für den Patienten, den Benutzer oder einen Dritten.

Das betroffene Gerät sollte nicht entsorgt werden, sondern dem Hersteller zur weiteren Analyse zur Verfügung gestellt werden, um die Ursachen des Vorfalls zu ermitteln. Wenn Sie den Hersteller kontaktieren, um den Vorfall zu melden, können Sie Ihre Anfrage dem Rücksendepaket beifügen.

Zusammenfassung der Sicherheit und Leistung

Die Zusammenfassung der Sicherheit und Leistung des APO-Easy® Genotypisierungskits wurde von der benannten Stelle 2797 (BSI-Gruppe) validiert und ist für die Öffentlichkeit auf der Website der Europäischen Datenbank für Medizinprodukte (Eudamed) unter Verwendung der UDI-DI-Nummer des

APO-Easy® Genotypisierungskits in der Datenbank verfügbar. Diese Kennung ist über den QR-Code auf dem Verpackungsetikett des Kits verfügbar.

Die Zusammenfassung der Sicherheit und Leistung wird regelmäßig mit allen relevanten Informationen über das APO-Easy® Genotypisierungskit aktualisiert.

Weiterführende Informationen

1. Marias, A.D. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health, and cardiovascular disease. *Pathology* **2019**, *51*, 165–176.
2. Semaev, S.; Shakhtshneider, E.; Shcherbakova, L.; Ivanoshchuk, D.; Orlov, P.; Malyutina, S.; Gafarov, V.; Ragino, Y.; Voevoda, M. Associations of APOE Gene Variants rs429358 and rs7412 with Parameters of the Blood Lipid Profile and the Risk of Myocardial Infarction and Death in a White Population of Western Siberia. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2022, *44*, 1713-1724. <https://doi.org/10.3390/cimb44040118>.
3. Davis AA et al (2020) APOE genotype regulates pathology and disease progression in synucleinopathy. *Sci Transl Med*:12(529)
4. Mishra A, Ferrari R, Heutink P, Hardy J, Pijnenburg Y, Posthuma D, et al. Gene-based association studies report genetic links for clinical subtypes of frontotemporal dementia. *Brain*. 2017;140(5):1437–46.
5. Su WH, Shi ZH, Liu SL, Wang XD, Liu S, Ji Y. Updated meta-analysis of the role of APOE ε2/ε3/ε4 alleles in frontotemporal lobar degeneration. *Oncotarget*. 2017 Jul 4;8(27):43721-43732. doi: 10.18632/oncotarget.17341.
6. Ohm, T., Scharnagl, H., März, W. et al. Apolipoprotein E isoforms and the development of low and high Braak stages of Alzheimer's disease-related lesions. *Acta Neuropathol* 98, 273–280 (1999). <https://doi.org/10.1007/s004010051080>.
7. Yamazaki, Y., Zhao, N., Caulfield, T.R. et al. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat Rev Neurol* 15, 501–518 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0228-7>.
8. Mayeux R, Saunders AM, Shea S, Mirra S, Evans D, Roses AD, et al. Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. Alzheimer's disease centers consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 1998;338(8):506–11.
9. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993 Aug 13;261(5123):921-3. doi: 10.1126/science.8346443. PMID: 8346443.
10. Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Oct 15;90(20):9649-53. doi: 10.1073/pnas.90.20.9649.
11. Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., et al. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type

4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 1977–1981. doi: 10.1073/pnas.90.5.1977

12. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, et al. Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association Between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease: A Meta-analysis. JAMA. 1997;278(16):1349–1356. doi:10.1001/jama.1997.03550160069041.
13. Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. Nat Rev Neurosci. 2009 May;10(5):333–44. doi: 10.1038/nrn2620.

Legende der in der Gebrauchsanweisung und auf den Etiketten des Kits verwendeten Symbole

	In-vitro-Diagnostikum		Nicht steriles Medizinprodukt
	Bestellnummer		Bei beschädigter Verpackung nicht verwenden
	Fertigungslosnummer		Europäische Konformität bewertet durch GMED
	Temperaturgrenzen		Warnhinweis
	Haltbarkeitsdatum		Ausreichend für <n> Tests
	Herstellungsdatum		Giftig oder sehr giftig
	Hersteller		Gebrauchsanweisung zu Rate ziehen
	Biologisches Risiko		Nicht wiederverwenden

Bevollmächtigte Vertreter

- **United Kingdom Responsible Person (UKRP)**

Name: Pathaway Services Ltd

Adresse: Headlands House, 1, Kings Court, Kettering Parkway, Kettering, NN15 6WJ, United Kingdom

Telefon: +44 (0) 1536 647 537

- **Swiss Authorized Representative (CH-REP)**

Name: MedEnvoy Switzerland

Adresse: Gotthardstrasse 28, 6302 Zug, Switzerland

Telefon: +41 41 562 01 42



Danke, dass Sie sich für Firalis entschieden haben

Für weitere Informationen, SDB oder

Anweisungen in anderen Sprachen schreiben Sie uns bitte:

contact@firalis.com