Kit de genotipado APO-Easy®

INSTRUCCIONES DE USO

REF FLS-OE-02

Sólo para uso de diagnóstico *in vitro*

No apto para uso terapéutico

Versión: 3.4

Fecha de emisión: 21/05/2024

Idioma: Español

Versión	Modificaciones principales
3.1	Primera versión
3.2	Apéndice del apartado de representantes autorizados
3.3	Modificación del Organismo Destinatario
3.4	Modificación del intervalo del test y suplemento de una referencia nueva para el dispositivo de qPCR QS5 Dx

CE 0459 IVD

Σ 32

Firalis SA
35 rue du Fort
68330 – Huningue FRANCIA

Teléfono: +33 389 911 320
Correo electrónico: contact@firalis.com
Web: www.firalis.com

Contenido:

1. Uso previsto 5
2. Introducción 5
3. Principio del ensayo 6
4. Instrumentos y materiales 6
4.1. Reactivos y materiales suministrados con el kit 7
4.2. Diversos materiales y equipos necesarios 8
4.3. Almacenamiento y vida útil del kit 8
5. Extracción y cuantificación de ADN genómico (ADNg) 8
5.1. Extracción 8
5.2. Cuantificación 8
6. Procedimiento de ensayo de genotipado APO-Easy® 9
6.1. Paso 1. Preparación de la reacción de PCR para genotipado en tiempo real 9
6.2. Paso 2. Ejecución de la qPCR 11
6.3. Paso 3. Análisis de resultados 13
6.4. Paso 4. Interpretación 14
7. Solución de problemas 15
8. Parámetros analíticos 17
9. Rendimiento clínico 17
10. Riesgos residuales y advertencias 18
11. Limitaciones del procedimiento 19
12. Directrices de seguridad química 19
13. Consejos técnicos 20
14. Responsabilidad 20
Asistencia técnica 20
Aviso de informe de incidente grave 21
Resumen de seguridad y rendimiento 21
Referencias 22
Leyenda de símbolos utilizados en las IFU y las etiquetas del kit 23
Representantes autorizados 24

Tablas:

Tabla 1. Referencia del equipo necesario para utilizar el kit de genotipado APO-Easy®.....7
Tabla 2. Referencia del kit de extracción de ADNg recomendado (no incluido en el kit de genotipado APO-Easy®).....7
Tabla 3. Contenido del kit de genotipado APO-Easy®. 7
Tabla 4. Descripción general del flujo de trabajo del ensayo de genotipado APO-Easy.....9
Tabla 5. Diseño del modelo de una placa de 96 pocillos para el genotipado de APOE de 24 muestras, 3 controles/SNP en duplicado y 2 NTC/SNP para el kit de genotipado APO-Easy®.....10
Tabla 6. Correspondencia estándar para la determinación de SNP del ensayo de genotipado APO-Easy.....10
Tabla 7. Programa de ejecución de qPCR en el producto QS5.....12
Tabla 8. Interpretación del genotipo a partir de los resultados de los SNP rs429358 y rs7412. 15
Tabla 9. Recomendaciones para la resolución de problemas del kit de genotipado APO-Easy.....15
Tabla 10 La prueba de genotipado APO-Easy tiene una precisión del 100 %.....17
Tabla 11 Comparaciones basadas en el genotipo entre EA y No EA + HC (Controles sanos) 17

Imágenes:

Imagen 1. Diagrama esquemático del gen APOE humano y los polimorfismos en 2 nucleótidos individuales que dan como resultado 3 alelos ε2, ε3 y ε4.....6
Imagen 2. Selección del tipo de experimento en las propiedades del software QS5. Asegurar seleccionar genotipado (flecha roja). 11
Imagen 3. Configuración de SNP para el kit de genotipado APO-Easy en el software QS5.....12
Imagen 4. Página de resultados de la ejecución de qPCR en el software QS5. La flecha roja indica el tipo de resultado a seleccionar (Discriminación Alélica) y la verde, el icono para seleccionar los SNP. 13
Imagen 5. Patrón de las señales de los estándares para SNP rs429358 (Mezcla maestra 1) tras el análisis por qPCR.....14
Imagen 6. Patrón de las señales de los estándares para SNP rs7412 (Mezcla maestra 2) tras el análisis por qPCR.....14
Imagen 7. Interpretación de los resultados en el software QS5. La flecha roja indica el icono que interpreta la señal, la flecha verde indica el estado del paciente para cada SNP determinado por el software después del análisis de los resultados.....14

Lista de abreviaturas:

SNP: Polimorfismos de un solo nucleótido

ADNg: Ácido desoxirribonucleico genómico

APOE: Apolipoproteína E

EA: Enfermedad de Alzheimer

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cualitativa en tiempo real

IVD: Diagnóstico in vitro

QS5-Dx: Sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 5 Dx

NTC: Sin control de plantillas

MUT: Mutante

WT: Tipo salvaje

Het: Heterocigoto

FCR: Fuerza centrífuga relativa

°C: Grado celsius

ng: nanogramo

µL: microlitro

ETS: Estándar

IFU: Instrucciones de uso

SDS: Fichas de datos de seguridad

1. Uso previsto

El kit de genotipado APO-Easy® es una prueba para diagnóstico in vitro cualitativa destinada a la detección de dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) rs429358 y rs7412 en el ADN genómico humano. Permite la determinación de seis genotipos de Apolipoproteína E (APOE): e2/e2, e2/e3, e3/e3, e2/e4, e3/e4 y e4/e4 basada en RT-PCR.

El resultado de la prueba de genotipado APO-Easy® está destinado a ser utilizado por los médicos, junto con otros exámenes clínicos, para ayudar a evaluar el nivel de riesgo de un individuo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer (EA). Un individuo con alelos ε2 exhibe el menor riesgo de desarrollar EA, lo que indica su efecto protector. La presencia de alelos ε3 se observa principalmente en individuos normales y no altera el riesgo de desarrollar EA. Un individuo con un solo alelo ε4 (heterocigoto e2/e4 o e3/e4) está asociado con un alto riesgo de desarrollar EA, en comparación con los otros genotipos APOE sin e4 (e2/e2, e2/e3 y e3/e3). La presencia de alelos dobles ε4 (homocigotos e4/e4) se asocia con el mayor riesgo de desarrollar EA, en comparación con todos los demás genotipos APOE.

Condiciones de uso:

- Con prescripción médica
- Para uso en humanos adultos (> 18 años)
- Para uso en laboratorios de diagnóstico molecular por personal cualificado.
- Esta prueba no es un método automatizado.
- La prueba no la puede realizar el paciente en su domicilio. No es un producto destinado al diagnóstico en el punto de atención ni una prueba de autodiagnóstico.
- Esta prueba no debe sustituir ningún examen clínico o diagnóstico.

2. Introducción

La apolipoproteína E (APOE) es una apolipoproteína quilomicrónica expresada en varios órganos como el hígado, el cerebro, el bazo, los riñones, las glándulas sexuales, las glándulas suprarrenales y los macrófagos (Marias, 2019). Se ha demostrado que la APOE es importante para diversos procesos, como el metabolismo de las lipoproteínas, las vitaminas liposolubles y la glucosa/energía, así como la transducción de señales, la metástasis y la angiogénesis. Al ser importante en el metabolismo de los lípidos, la APOE está estrechamente relacionada con las enfermedades cardiovasculares, ya que es necesaria para el catabolismo normal de los componentes de lipoproteínas ricas en triglicéridos (Semaev et al., 2022). La relevancia de APOE en la patogénesis de trastornos neurodegenerativos, como la demencia frontotemporal, la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy y la enfermedad de Alzheimer (EA), está ampliamente documentada (Davis et al., 2020; Mishra et al., 2017).

El gen APOE tiene tres alelos comunes (ε2, ε3 y ε4) y seis genotipos relacionados (ε3ε3, ε3ε2, ε2ε2, ε3ε4, ε4ε4 y ε2ε4) [Su et al., 2017]. Las isoformas correspondientes se caracterizan por los aminoácidos en las posiciones 112 y 158 y determinan la afinidad por los receptores de lipoproteínas. APOE ε3 es el alelo más común y se cree que no aumenta ni disminuye el riesgo de desarrollar EA. Se ha demostrado que APOE ε2 ejerce un efecto protector frente al desarrollo de la EA (Ohm et al., 1999). En contraste, APOE ε4 reduce la eliminación de beta-amiloide (Aβ), lo que provoca una mayor

acumulación de Aβ dentro de las neuronas en modelos murinos de EA (Yamazaki et al., 2019). Alrededor del 25 por ciento de las personas portan una copia de APOE ε4, y entre el 2 y el 3 por ciento portan dos copias (https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-genetics-fact-sheet). Mayeux et al., 1998 estudiaron a 2.188 pacientes con EA y demostraron que cuando se combina con criterios clínicos, la presencia del genotipo APOE ε4 aumenta la especificidad del diagnóstico de EA. Varios estudios han evidenciado que el genotipo APOE ε4 está asociado con la aparición tardía de formas familiares y esporádicas de EA (Corder et al., 1993, Schmechel et al., 1993, Strittmatter et al., 1993, Farrer et al., 1997, Bu G., 2009).

El kit de genotipado APO-Easy® utiliza la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) cualitativa para la determinación *in vitro* de dos mutaciones de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) de APOE: rs429358 y rs7412. Esta prueba IVD utiliza sondas marcadas con fluorescencia (FAM y VIC) que permiten la discriminación alélica y la determinación de genotipos APOE.

3. Principio del ensayo

El kit de genotipado APO-Easy® incluye los reactivos necesarios para realizar el análisis de qPCR para probar el ADN genómico (ADNg) extraído de muestras de ADN de PAXgene para determinar los genotipos APOE. El ensayo evalúa 2 SNP (rs429358 y rs7412) en el gen APOE, e incluye un control positivo para cada SNP (tipo salvaje, mutante y heterocigoto). El genotipo se determina en función del estado de mutación de ambas mutaciones analizadas, dando como resultado uno de los seis genotipos posibles (ε3ε3, ε3ε2, ε2ε2, ε3ε4, ε4ε4 y ε2ε4).

Para el alelo de tipo salvaje (ApoE3) se detectan los aminoácidos cisteína en la posición 112 y arginina en la posición 158. La mutación ApoE4 (SNP rs429358) afecta el aminoácido en la posición 112, lo que resulta en un cambio de timina a citosina, induciendo la síntesis de arginina en lugar de cisteína. En cambio, la mutación ApoE2 (SNP rs7412) afecta el aminoácido en la posición 158, lo que resulta en un cambio de citosina a timina, induciendo la síntesis de cisteína en lugar de arginina (Imagen 1).



Imagen 1. Diagrama esquemático del gen APOE humano y los polimorfismos en 2 nucleótidos individuales que dan como resultado 3 alelos ε2, ε3 y ε4.

4. Instrumentos y materiales

El kit de genotipado APO-Easy® incluye los consumibles necesarios para realizar la amplificación por qPCR y la detección fluorogénica de mutaciones APOE, utilizando el equipo ThermoFisher QS5-Dx (no incluido en el kit). El equipo necesario para el ensayo pero no incluido en el kit y sus referencias se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Referencia del equipo necesario para utilizar el kit de genotipado APO-Easy®

Instrumento	Objetivo	Fabricante	N° de referencia.	Certificaciones
Nanogota 2000/2000c	Cuantificación del ADNg	ThermoFisher	ND-2000	UL/CSA y CE
QS5-Dx	qPCR	ThermoFisher	A31928/A47324	FDA 510K (K190302)

Para la extracción de ADNg de los tubos de ADN PAXgene de sangre completa, Firalis recomienda utilizar la referencia proporcionada en la tabla 2 siguiendo las instrucciones del fabricante proporcionadas junto con el kit.
Si se utiliza otra referencia, Firalis no puede garantizar los resultados ni el rendimiento del ensayo. Las muestras deben recogerse en un tubo de ADN sanguíneo PAXgene® (BD Biosciences, número de referencia: 761165) de acuerdo con las instrucciones de uso proporcionadas por el fabricante del tubo de recolección.

Tabla 2. Referencia del kit de extracción de ADNg recomendado (no incluido en el kit de genotipado APO-Easy®).

Descripción	Fabricante	Objetivo	Almacenamiento	Referencia	Cantidad
Kit QIAamp DSP DNA Blood Mini	Qiagen	Extracción de ADNg	Según recomendación del proveedor	61104	1 kit/50 muestras

4.1. Reactivos y materiales suministrados con el kit

El kit de genotipado APO-Easy® contiene mezclas maestras listas para usar para 32 reacciones por SNP, controles positivos: Estándar A, Estándar B, Estándar C, Estándar D, Estándar E y un vial de control sin plantilla (NTC). Con los reactivos de un kit es posible realizar un total de 32 reacciones, que incluyen 6 reacciones para los estándares y 2 NTC para cada SNP y para cada análisis (Tabla 3).

Tabla 3. Contenido del kit de genotipado APO-Easy®.

Descripción	Almacenamiento	Referencia	Cantidad (32 reacciones)
Mezcla maestra TaqMan™ para genotipado 1 rs429358	-15°C a -25°C	FLS-MM1OE-02	1 vial
Mezcla maestra TaqMan™ para genotipado 2 rs7412	-15°C a -25°C	FLS-MM2OE-02	1 vial
Sin control de plantilla (NTC)	-15°C a -25°C	FLS-NTC-01	1 vial
Estándar A: Mutante (MUT) rs7412	-15°C a -25°C	FLS-OE2S-01	1 vial

Estándar B: Tipo salvaje (WT) rs429358 y rs7412	-15 a -25°C	FLS-OE3S-01	1 vial
Estándar C: Mutante (MUT) rs429358	-15 a -25°C	FLS-OE4S-01	1 vial
Estándar D: Heterocigoto (Het) rs7412	-15 °C a -25 °C	FLS-OE23S-01	1 vial
Estándar E: Heterocigoto (Het) rs429358	-15 a -25 °C	FLS-OE34S-01	1 vial

*Controles positivos: Estándar A, Estándar B, Estándar C, Estándar D, Estándar E. Control negativo: NTC

4.2. Diversos materiales y equipos necesarios

- Agua libre de nucleasas
- Utilizar únicamente puntas y tubos de microcentrífuga certificados libres de nucleasas.
- Pipetas de precisión - Pipeta multicanal
- Cabina BSL2
- Microcentrífuga (fuerza centrífuga relativa (FCR) de 17000)
- Vórtex y microcentrífuga
- Placas para PCR en tiempo real
- Centrífuga de placas de PCR compactas

4.3. Almacenamiento y vida útil del kit

- El kit debe conservarse a -20 °C.
- Los componentes del kit pueden descongelarse y congelarse hasta tres veces sin comprometer su estabilidad. Superar el ciclo recomendado de congelación y descongelación podría reducir la eficacia del kit.
- El kit se mantiene en condiciones adecuadas hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del envase.

5. Extracción y cuantificación de ADN genómico (ADNg)

5.1. Extracción

Extracción de ADNg de sangre humana completa recogida en tubos PAXgene Blood DNA utilizando el kit QIAamp DSP DNA Blood Mini como se indica en la tabla 2 siguiendo la ficha de datos de instrucciones del usuario proporcionada junto con el kit.

5.2. Cuantificación

La cuantificación del ADNg extraído se realiza mediante Nanodrop. Las muestras deben tener una concentración mínima de 6,25 ng/µL y máxima de 50 ng/µL. Si las muestras tienen una concentración superior a la recomendada, deberán diluirse en agua libre de nucleasas (grado molecular). Si tienen una concentración menor que la cantidad requerida, se recomienda utilizar 2 µL en total.

La cantidad de ADN genómico utilizada para el ensayo de genotipado APO-Easy® debe estar comprendida entre 12,5 ng y 100 ng.

6. Procedimiento de ensayo de genotipado APO-Easy®

La descripción general del flujo de trabajo del ensayo de genotipado APO-Easy se presenta en la Tabla 4. El tiempo requerido para el ensayo es: 2h30.

Tabla 4. Descripción general del flujo de trabajo del ensayo de genotipado APO-Easy.

Flujo de trabajo	
Paso 1	Preparación de la reacción de PCR para genotipado en tiempo real
Paso 2	Ejecución de qPCR
Paso 3	Análisis de resultados
Paso 4	Interpretación

6.1. Paso 1. Preparación de la reacción de PCR para genotipado en tiempo real

El kit incluye dos TaqMan™ Genotyping Master Mix listos para evaluar los SNP de APOE (rs429358 y rs7412), agua libre de nucleasas para el NTC y estándares para simular las condiciones de tipo salvaje, mutante y heterocigoto para cada polimorfismo de nucleótido único (SNP).

Cada mezcla maestra es un ensayo dualplex que evalúa el SNP de interés:

Mezcla maestra 1: compuesta por 2 sondas para evaluar el SNP rs429358 y permitir la discriminación alélica para el nucleótido de tipo salvaje (T), el nucleótido mutante (C) así como la condición heterocigota.

Mezcla maestra 2: compuesta por 2 sondas para evaluar el SNP rs7412 y permitir la discriminación alélica para el nucleótido de tipo salvaje (C), el nucleótido mutante (T) así como la condición heterocigota.

Estándar A, B, C, D y E:
Cada estándar (ETS) es una plantilla de ADN diseñada para simular los tres alelos y la combinación de diferentes plantillas de ADN que simulan la condición heterocigótica.

Estándar A: Plantilla de ADN del alelo ApoE2
Estándar B: Plantilla de ADN del alelo ApoE3
Estándar C: plantilla de ADN del alelo ApoE4
Estándar D: plantilla de ADN con alelos ApoE2 y ApoE3
Estándar E: plantilla de ADN con alelos ApoE3 y ApoE4

Nota: Las muestras maestras y los estándares deben descongelarse sobre hielo. Mezclar bien los reactivos, centrifugar brevemente y colocarlos sobre hielo.

1. Dispensar 23 µL/por pocillo de la mezcla maestra del ensayo de detección en una placa de 96 pocillos (para cada muestra se debe agregar la mezcla maestra correspondiente a ambos SNP).

2. Añadir 2 µL de ADNg o los estándares en los pocillos correspondientes y centrifugar brevemente. La cantidad total de ADN genómico por reacción debe estar comprendida entre 12,5 y 100 ng.

   - Cada SNP individual **requiere el análisis de los estándares WT, MUT y HET,** así como **de NTC** (agua de grado molecular libre de nucleasas). En la tabla 5 se muestra un plan de diseño modelo para el análisis de hasta 24 muestras de ADN de PAXgene medidas para 2 SNP en una placa de PCR de 96 pocillos.

   - Nota: El kit de genotipado APO-Easy permite realizar hasta 32 reacciones de qPCR. Cada mezcla maestra es para 8 ETS y hasta 24 muestras. Si se va a analizar un número reducido de muestras, el kit puede reutilizarse hasta dos veces. Por ejemplo, se pueden analizar 8 ETS y 8 pacientes en una primera ocasión, y repetir el proceso con 8 ETS y 8 pacientes adicionales en la segunda oportunidad.

Tabla 5. Diseño del modelo de una placa de 96 pocillos para el genotipado de APOE de 24 muestras, 3 controles/SNP en duplicado y 2 NTC/SNP para el kit de genotipado APO-Easy®.

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

- El siguiente ETS debe utilizarse para cada determinación de ensayo de SNP como se detalla a continuación. Para rs429358 (Muestra maestra 1) se deben utilizar los estándares B, C y E y para evaluar rs7412 (Muestra maestra 2), los estándares B, A y D (Tabla 6).

Tabla 6. Correspondencia estándar para la determinación de SNP del ensayo de genotipado APO-Easy.

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

3. Agitar la placa durante 5 segundos y centrifugar a 500g durante 30 segundos.

4. Comenzar el **proceso inmediatamente**.

6.2. Paso 2. Ejecución de la qPCR

5. Configuración de QS5 Dx para el ensayo de genotipado APO-Easy:

A. En la página "Properties" (*Propiedades*), asignar un nombre al experimento y seleccionar el tipo de experimento como **genotipado** (Imagen 2).

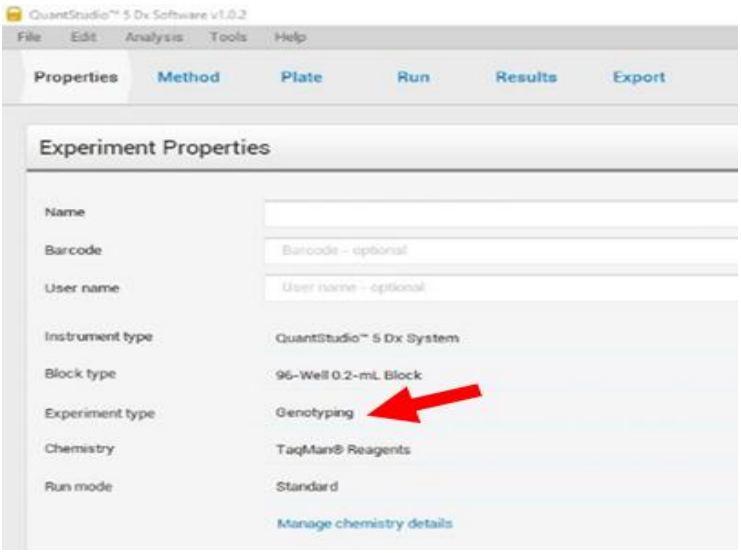

Imagen 2. Selección del tipo de experimento en las propiedades del software QS5. Asegurar seleccionar genotipado (flecha roja).

B. En la página "Method" (*Método*), configurar el volumen total de la reacción de PCR en **25 µL** de mezcla de reacción.

C. En "Plate sheet" (*Hoja de placa*), ir a "advanced Setup" (*Configuración avanzada*) para configurar la fluorescencia y hacer clic en "(+) Add button" para obtener **dos ensayos de SNP** (Ensayo de SNP 1 y Ensayo de SNP 2). Hacer clic en el botón OK para continuar. Luego, para cada ensayo de SNP, hacer clic en el botón Action y seleccionar «Edit» para completar el nombre de la siguiente manera (Imagen 3):

NOTA: Para **el ensayo SNP 1: rs429358** (mezcla maestra 1). Comprobar que **el alelo 1** está configurado con el reportero **VIC** y **el alelo 2** con el reportero **FAM**

Para **el ensayo SNP 2: rs7412** (Mezcla maestra 2). Comprobar que **el alelo 1** está configurado con el reportero **VIC** y **el alelo 2** con el reportero **FAM**

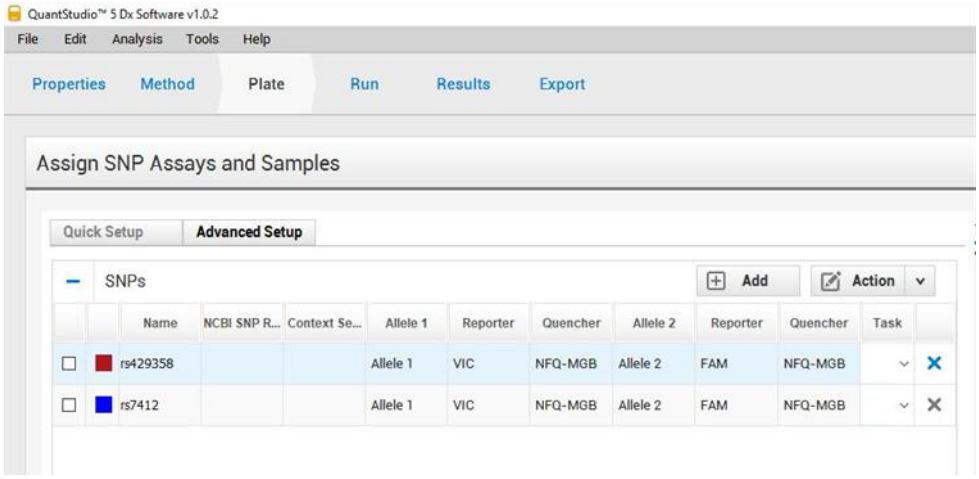

Imagen 3. Configuración de SNP para el kit de genotipado APO-Easy en el software QS5.

6. Para definir estándares para rs429358 (Mezcla maestra 1), seleccionar la columna 1 en el diseño de la placa y seleccionar SNP Assay1 (rs429358). Luego, seleccionar A1 y B1 ("ETS B (WT)") y asignar 2/2 en la barra de tareas. Seleccionar C1 y D1 ("ETS C (MUT)") y asignar 1/1 en la barra de tareas. Seleccionar E1 y F1 ("ETS E (HET)") y asignar 1/2 en la barra de tareas. Seleccionar G1 y H1 y asignar N en la barra de tareas "NTC".

7. Para definir estándares para rs7412 (mezcla maestra 2), seleccionar la columna 7 en el diseño de la placa y seleccionar SNP Assay2 (rs7412). Luego, seleccionar A7 y B7 ("ETS B (WT)") y asignar 1/1 en la barra de tareas. Seleccionar C7 y D7 ("ETS A (MUT)") y asignar 2/2 en la barra de tareas. Seleccionar E7 y F7 ("ETS D(HET)") y asignar 1/2 en la barra de tareas. Seleccionar G7 y H7 y asignar N en la barra de tareas «NTC».

8. Para definir muestras para rs429358 (Mezcla maestra 1), seleccionar las columnas 2 a 4 en el diseño de la placa y seleccionar SNP Assay1 (rs429358).

9. Para definir muestras para rs7412 (Mezcla maestra 2), seleccionar las columnas 8 a 10 en el diseño de la placa y seleccionar SNP Assay2 (rs7412).

10. Una vez que la placa esté lista y la configuración realizada, ir a la hoja "Run" y comenzar la ejecución.

11. El programa de ejecución de qPCR será seleccionado automáticamente por el QS5-Dx y la especificación del programa debe ser la indicada en la Tabla 7:

Tabla 7. Programa de ejecución de qPCR en el producto QS5.

Programa	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Activación	95	10 min.	
Desnaturalización	95	15 seg.	40
Extensión	60	1 min.	

6.3. Paso 3. Análisis de resultados

Verificar la señal obtenida para ETS con el ensayo de detección respectivo en modo de discriminación alélica, antes de analizar el resultado de la muestra. Los resultados de la ejecución de qPCR se pueden encontrar en la página de resultados del software QS5 Dx (Imagen 4). En esta página, seleccionar Allelic Discrimination (*Discriminación Alélica*) (flecha roja). La validez del análisis debe evaluarse para cada mutación por separado. La selección de rs429358 o rs7412 se puede realizar haciendo clic en el icono señalado por la flecha verde.

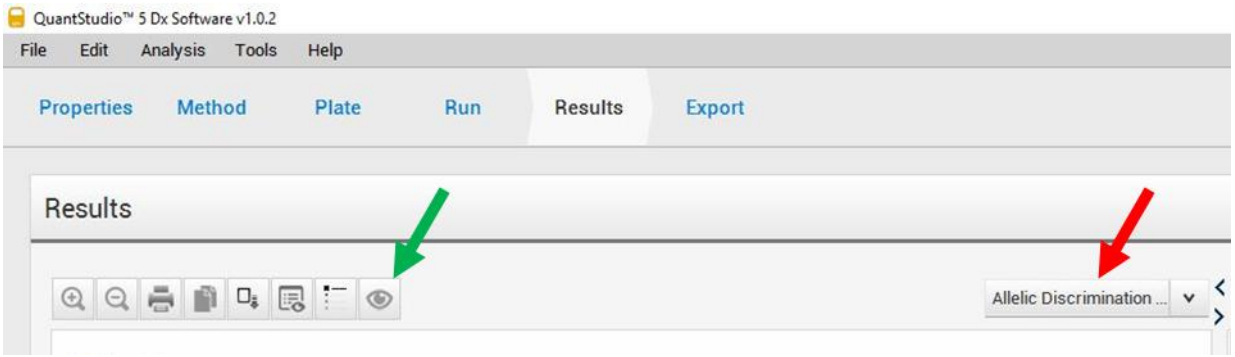

Imagen 4**.** Página de resultados de la ejecución de qPCR en el software QS5. La flecha roja indica el tipo de resultado a seleccionar (Discriminación Alélica) y la verde, el icono para seleccionar los SNP.

Para ETS y NTC, el análisis puede continuar cuando las señales ETS corresponden al siguiente ejemplo. Comprobar que sus estándares tengan un patrón similar al que se muestra en la imagen 3. Para rs429358, el tipo salvaje (WT) la señal aparece en la región superior izquierda del gráfico en el eje y (alelo 2) correspondiente al alelo homocigoto 2/alelo 2 (e3). El estándar mutante (MUT) tendrá una señal cercana al eje x (alelo 1) en el área inferior derecha del gráfico correspondiente al alelo1/alelo1 (e4). El estándar heterocigoto estará entre MUT y WT, correspondiente al alelo heterocigoto 1/alelo 2 (e3/e4), como se muestra en **la Imagen 5**. NTC no generará ninguna señal y se encontrará en la parte inferior izquierda del gráfico.

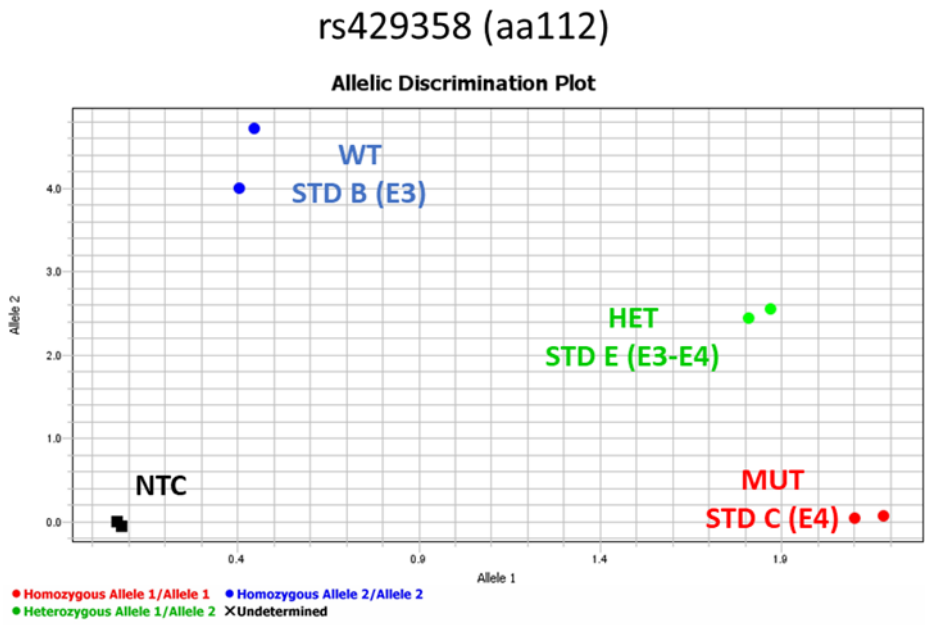

Imagen 5. Patrón de las señales de los estándares para SNP rs429358 (Mezcla maestra 1) tras el análisis por qPCR.

Para rs7412, el tipo salvaje (WT) la señal aparece en la parte inferior derecha cerca de la región del eje x del gráfico correspondiente al alelo homocigoto 1/alelo 1 (e3). El estándar mutante (MUT) tendrá una señal en el área superior izquierda del eje "y" del gráfico correspondiente al alelo2/alelo2 (e2). El estándar heterocigoto estará entre MUT y WT, correspondiente al alelo heterocigoto 1/alelo 2 (e2/e3), como se muestra en la **Imagen 6**. NTC no generará ninguna señal y se encontrará en la parte inferior izquierda del gráfico.

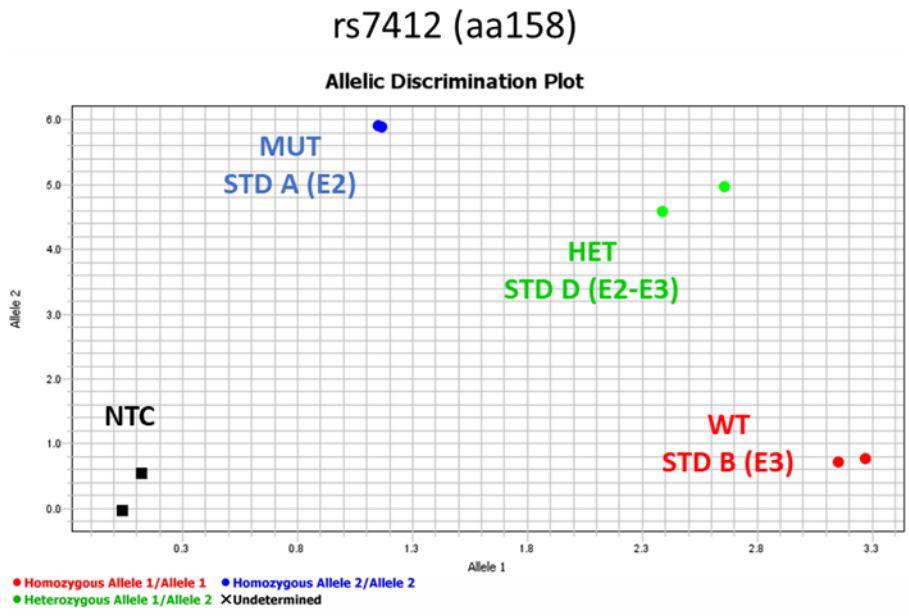

Imagen 6. Patrón de las señales de los estándares para SNP rs7412 (Mezcla maestra 2) tras el análisis por qPCR.

6.4. Paso 4. Interpretación

Una vez validados los controles, se interpretan las señales de muestra haciendo clic en el icono señalado por la flecha roja. Para cada SNP, el estado del paciente está disponible en la columna "Call" (flecha verde; Imagen 7).

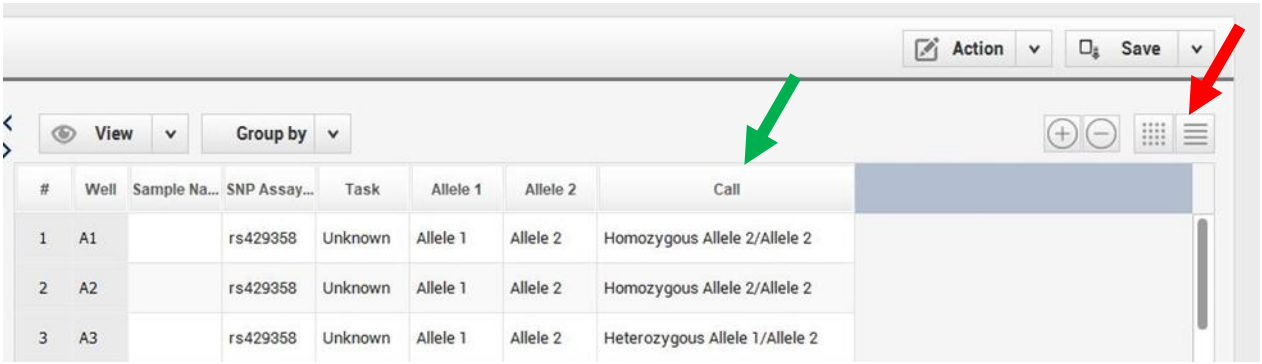

Imagen 7. Interpretación de los resultados en el software QS5. La flecha roja indica el icono que interpreta la señal, la flecha verde indica el estado del paciente para cada SNP determinado por el software después del análisis de los resultados.

Para el SNP rs429358, el genotipo homocigoto 2/alelo 2 corresponde a WT (tipo salvaje), el genotipo homocigoto 1/alelo 1 corresponde a MUT (mutante) y el genotipo heterocigoto 1/alelo 2 corresponde a HET (heterocigoto).

Para rs7412, el genotipo homocigoto 1/alelo 1 corresponde a WT, el genotipo homocigoto 2/alelo 2 corresponde a MUT y el genotipo heterocigoto 1/alelo 2 corresponde a HET.

Una vez asignado el estado a cada SNP, se puede determinar el genotipo de la muestra utilizando la tabla 8 que aparece a continuación.

Tabla 8. Interpretación del genotipo a partir de los resultados de los SNP rs429358 y rs7412.

rs429358	rs7412	Genotipo
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. Solución de problemas

- La evaluación de los resultados de la prueba debe realizarse después de examinar los controles positivos y negativos, y de verificar que son válidos y aceptables. Si los controles no son válidos, no es posible interpretar los resultados de la muestra.
- Si se detecta un fallo en el ensayo:
  - Verificar las fechas de caducidad de los reactivos individuales y confirmar que todos los reactivos se hayan almacenado según lo indicado en la etiqueta del producto. Si no se respetan estrictamente las condiciones de almacenamiento, los resultados no serán fiables y el kit no podrá volver a utilizarse.
  - Confirmar que las calibraciones de las pipetas utilizadas estén actualizadas.
  - Confirmar que la configuración del ciclador coincida con las instrucciones de uso.

En la siguiente tabla 9 se presentan las posibles razones y acciones correctivas para algunos de los hallazgos durante el ensayo.

Tabla 9. Recomendaciones para la resolución de problemas del kit de genotipado APO-Easy.

Recomendaciones	Posibles razones y acciones correctivas
No hay asignaciones genotípicas en todos los canales para una muestra	Posibilidad: problemas con la calidad del ADNg o presencia de sustancias interferentes. Recomendación: extraer nuevamente la muestra y repetir la qPCR.
No hay señal en uno o dos canales	Posibilidad: si es para una sola muestra, repetir la qPCR;

	Si es para todas las muestras, comprobar la fecha de caducidad del kit y las condiciones de almacenamiento.
Genotipo indeterminado para un SNP	Posibilidad: la cantidad de ADNg introducida fue insuficiente. Recomendación: repetir la prueba utilizando 2 µL de ADNg con 23 µL de mezcla maestra y 4 µL de ADNg con 21 µL de mezcla maestra durante el mismo ensayo para la misma muestra.
Después de una nueva prueba, el genotipo aún no está determinado	Posibilidad: presencia de sustancias interferentes en la muestra. Recomendación: - La adición de K2EDTA al tubo de ADN PAXgene podría interferir con la genotipificación. Verificar si se ha añadido EDTA al tubo o si se ha recogido el volumen de sangre correctamente conforme a las instrucciones del fabricante. - Los triglicéridos en la sangre no deben superar la concentración fisiológica (concentración sanguínea normal: 0,5 - 1,5 g/L). Si los triglicéridos de la muestra están por encima de este rango, pueden interferir con el genotipado del paciente. - La albúmina no debe superar la concentración fisiológica (concentración sanguínea normal: 35 - 50 g/L). Si la albúmina en la muestra de sangre del paciente supera este valor, puede afectar los resultados de la genotipificación. Contactar con el servicio de asistencia técnica si el problema persiste.
Los controles no tienen señal	Confirmar que se han seguido correctamente las condiciones de almacenamiento y las instrucciones del fabricante. Podría haberse producido un problema de pipeteo. Recomendación: repetir la prueba Contactar con el servicio de asistencia técnica si aún no hay señal.
Señal en NTC	Posibilidad: lo más probable es que la mezcla de reacción estuviera contaminada con una plantilla. Recomendación: repetir la qPCR. Si el problema persiste, no se debe seguir utilizando el kit. Contactar con el servicio de asistencia técnica.

8. Parámetros analíticos

Precisión: El kit de genotipado APO-Easy® muestra una precisión del 100 % en la detección de los genotipos APOE en comparación con los métodos de referencia, como la secuenciación bidireccional de Sanger y la secuenciación de Próxima generación.

Sensibilidad: El ensayo de genotificación APO-Easy® detecta 12,5 ng de ADNg humano cuando se utiliza con el sistema PCR en tiempo real QuantStudio 5 Dx.

Precisión: El kit APO-Easy® es altamente reproducible, mostrando una concordancia positiva del 100 % en diferentes lotes o cuando es utilizado por diferentes profesionales.

Interferencias: La presencia de un exceso de etanol (hasta 20 %), bilirrubina (hasta 200 mg/mL), K2EDTA (hasta 20 mg/mL), albúmina (hasta 25 g/L), hemoglobina (hasta 100 g/L) o triglicéridos (hasta 18,2 g/L) en las muestras **no interfiere** con los resultados de la genotipificación.

9. Rendimiento clínico

El kit de genotipado APO-Easy cumple con su finalidad, demostrando un 100 % de concordancia positiva cuando sus resultados se comparan con los obtenidos mediante secuenciación bidireccional de Sanger y secuenciación de Próxima generación dirigida.

Tabla 10 La prueba de genotipado APO-Easy tiene una precisión del 100 %

Genotipo APOE	APO-Easy®	Secuenciación de Próxima generación (NGS) dirigida	Asignaciones genotípicas correctas	Exactitud	Secuenciación de Sanger	Asignaciones genotípicas correctas	Exactitud
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

Al comparar las frecuencias del genotipo APOE entre sujetos con enfermedad de Alzheimer (EA) y sujetos sin la enfermedad, así como con un grupo de control sano, se observó que la presencia de dos copias del alelo ε4 (homocigoto e4/e4) aumentaba el riesgo de EA en 48,56 veces en comparación con el genotipo e2/e3. Por otro lado, la presencia de una copia del alelo ε4 incrementaba el riesgo en 9,54 veces para los heterocigotos e3/e4 y en 5,78 veces para los heterocigotos e2/e4, en comparación con el genotipo e2/e3.

Tabla 11 Comparaciones basadas en el genotipo entre EA y No EA + HC (Controles sanos)

	Grupo			
Genotipo	**EA (n=234)**	**No EA +HC (n=302)**	**O [IC del 95%]**	**p**
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. Riesgos residuales y advertencias

El diseño y las características de rendimiento del kit de genotipado APO-Easy® han sido optimizados a través de rigurosas pruebas internas y evaluaciones realizadas por usuarios finales. Estas pruebas incluyeron poblaciones representativas de la población objetivo, lo que permitió verificar su eficacia en las condiciones reales de uso. Firalis, la empresa fabricante, considera que los riesgos asociados son mínimos y aceptables para pruebas genéticas.

- Los resultados negativos no eliminan completamente los riesgos para la salud y no deben ser la única base para tomar decisiones clínicas sobre el tratamiento del paciente.
- Tanto los resultados negativos como los positivos deben interpretarse junto con las observaciones clínicas, el historial médico del paciente y otra información relevante.

Los riesgos relacionados con el uso del kit son bajos siempre que se utilice de acuerdo con su propósito previsto. Los usuarios pueden reducir aún más estos riesgos al seguir las siguientes recomendaciones:

Contaminación de las muestras: la contaminación de las muestras con ADN extraño o posibles interferentes puede dar lugar a resultados inexactos. El uso de espacios de trabajo limpios, guantes desechables y equipos específicos para la preparación de muestras es fundamental para minimizar los riesgos residuales de contaminación.

Contaminación cruzada: la manipulación inadecuada de reactivos o muestras podría provocar contaminación cruzada entre muestras, dando lugar a resultados erróneos. Es necesario mantener las áreas de trabajo separadas para la preparación de muestras, la extracción de ADN y la configuración de PCR, y trabajar en un entorno limpio cuando se manipulen pipetas y otros equipos para evitar la contaminación cruzada.

Interpretación de resultados: los usuarios sin experiencia pueden malinterpretar los resultados y llegar a conclusiones erróneas. Para garantizar la precisión, la interpretación del ensayo de genotipado APO-Easy debe ser realizada exclusivamente por personal debidamente capacitado.

Capacitación insuficiente: La falta de formación o experiencia incrementa el riesgo de errores tanto en la configuración como en la interpretación del ensayo. Se recomienda que el kit APO-Easy sea utilizado únicamente por personal altamente cualificado.

11. Limitaciones del procedimiento

- Los reactivos no deben emplearse en procedimientos terapéuticos.
- No es un método automatizado ni un producto de autocomprobación.
- Este ensayo está configurado para detectar el genotipo APOE a partir de muestras de ADN humano obtenidas de tubos PAXgene, dentro del rango de detección establecido
- Los resultados obtenidos deben interpretarse en el contexto de otros hallazgos clínicos relevantes y no deben usarse como única base para realizar un diagnóstico.
- Para evitar la contaminación con material genómico externo, es crucial manipular las muestras y los reactivos del kit con cuidado, asegurándose de trabajar en un entorno limpio.
- Los usuarios deben evitar contaminantes microbianos durante los procedimientos y no deben utilizar los componentes del kit si observan evidencia de crecimiento microbiano.
- Este kit está diseñado para utilizarse con el sistema de PCR en tiempo real QS5-Dx (ThermoFisher).
- El estricto cumplimiento de las recomendaciones dadas en las instrucciones de uso del kit es fundamental para obtener resultados óptimos.
- Es indispensable verificar las fechas de caducidad y mantener las condiciones de almacenamiento adecuadas para cada componente del kit. No se debe utilizar si está vencido o ha sido almacenado de forma incorrecta.
- No mezclar ni sustituir los reactivos con los de otros lotes o fuentes.
- Utilizar únicamente puntas y tubos de microcentrífuga certificados como libres de nucleasas,
- así como agua libre de nucleasas almacenada en recipientes limpios.
- Cualquier variación en el proceso descrito en las instrucciones de uso puede provocar variaciones en el resultado.
- El genotipado APO-Easy® no tiene como objetivo predecir o detectar la respuesta a la terapia, ni ayudar a seleccionar la terapia óptima para los pacientes.

12. Directrices de seguridad química

Para minimizar los riesgos de los productos químicos:

- Leer y comprender las fichas de datos de seguridad (SDS) proporcionadas por el fabricante del producto químico antes de almacenar, manipular o trabajar con cualquier producto químico o material peligroso.
- Evitar el contacto directo con productos químicos.
- Utilizar equipos de protección personal adecuados al manipular productos químicos, como gafas de seguridad, guantes y ropa protectora.

- Evitar la inhalación de productos químicos. No fumar ni dejar abiertos los envases de productos químicos. Utilizar únicamente con ventilación adecuada o campana extractora de humos.
- Para obtener pautas de seguridad adicionales, consultar la SDS.
- Revisar periódicamente si hay fugas o derrames de productos químicos. Si se produce una fuga o un derrame, seguir los procedimientos de limpieza del fabricante recomendados en la SDS.
- Cumplir con todas las leyes y regulaciones locales, estatales/provinciales o nacionales relacionadas con el almacenamiento, manipulación y eliminación de productos químicos.

13. Consejos técnicos

- Para obtener asistencia técnica relacionada con la extracción de ADN, consultar la ficha de datos proporcionada con el minikit de sangre de ADN QIAamp DSP recomendado (ref: 61104) de Qiagen.
- Evitar cualquier contaminación entre muestras y reactivos. Para ello, es necesario cambiar las puntas en cada paso. La contaminación bacteriana o fúngica en cualquier reactivo puede provocar resultados erróneos.
- Desechar los materiales consumibles y el contenido no utilizado en contenedores adecuados.
- Este procedimiento es adecuado únicamente para su uso con sangre completa procedente de tubos de ADN PAXgene.

14. Responsabilidad

- Este kit está destinado únicamente a la determinación *in vitro* del genotipo APOE en sangre completa humana a partir de tubos de ADN PAXgene.
- Está destinado a ser utilizado únicamente por personal cualificado.
- Firalis no asume responsabilidad por daños o pérdidas derivados de un uso del kit diferente al expresamente indicado en estas instrucciones.
- Asimismo, Firalis no se hace responsable de posibles infracciones de patentes que puedan surgir del uso o derivación de este producto.

Asistencia técnica

Para asistencia técnica, comuníquese con el Servicio Técnico de Firalis SA al +33-389 911 320, visite su sitio web en http://www.firalis.com o envíe un correo electrónico a “contact@firalis.com”.

Aviso de informe de incidente grave

Un incidente grave es la causa de cualquier mal funcionamiento o deterioro de las características o del rendimiento de un producto, y puede clasificarse en al menos una de las siguientes consecuencias:

- La muerte de un paciente, usuario u otra persona
- Un deterioro grave, temporal o permanente, del estado de salud de un paciente, usuario u otra persona
- Una amenaza grave para la salud pública.

En caso de duda los usuarios siempre deberán informar.

Si considera que se trata de un incidente que debe ser notificado, póngase en contacto con el fabricante a través de clinical@firalis.com. También se puede encontrar la información de contacto de la autoridad competente de cada país en: https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en.

Al informar un incidente grave, debe recopilarse la siguiente información:

- Nombre comercial del producto (MR para marca registrada, © para derechos de autor)
- Nombre y dirección del fabricante
- Número de lote
- Número de serie
- Código UDI (identificación única de producto)
- Una descripción precisa y concisa del incidente y las consecuencias graves o posiblemente graves para el paciente, el usuario o un tercero.

El producto en cuestión no debe desecharse, sino ponerse a disposición del fabricante para realizar un análisis más detallado a fin de determinar las causas del incidente. Puede añadirse una solicitud de devolución de envío cuando se comunique con el fabricante para informar del incidente.

Resumen de seguridad y rendimiento

El Resumen de seguridad y rendimiento del kit de genotipado APO-Easy® ha sido validado por el Organismo Notificado 2797 (BSI Group) y está disponible para el público en el sitio web de la base de datos europea sobre productos médicos (Eudamed). Los usuarios pueden acceder a la información utilizando el número UDI-DI del kit de Genotipado APO-Easy® en la base de datos. Este identificador está disponible con el código QR colocado en la etiqueta del embalaje del kit.

El Resumen de seguridad y rendimiento se actualizará periódicamente con cualquier información relevante sobre el kit de genotipado APO-Easy®.

Referencias

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. Traducción científica médica: 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. 13 de agosto de 1993;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.

Leyenda de símbolos utilizados en las IFU y las etiquetas del kit

	Producto para diagnóstico *in vitro*		Producto médico no estéril
	Número de catálogo		No utilizar si el paquete está dañado
	Código de lote		Conformidad europea evaluada por GMED
	Limitaciones de temperatura		Advertencia
	Fecha de caducidad		Contiene suficiente para < n > pruebas
	Fecha de fabricación		Tóxico o muy tóxico
	Fabricante		Consultar las instrucciones de funcionamiento
	Riesgo biológico		No reutilizar

Representantes autorizados

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

Nombre : Pathaway Services Ltd

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

Teléfono: +44 (0) 1536 647 537

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

Nombre : MedEnvoy Switzerland

Dirección : Gotthardstrasse 28, 6302 Zug, Switzerland

Teléfono : +41 41 562 01 42

Gracias por elegir Firalis

Para cualquier otra información, fichas de datos de seguridad de materiales (MSDS) u otras consultas sobre instrucciones en otros idiomas, por favor escríbanos a:

contacto@firalis.com