Kit di genotipizzazione APO-Easy®

ISTRUZIONI PER L'USO

REF FLS-OE-02

Solo per uso diagnostico *in vitro*

Non per uso terapeutico

Versione: 3.4

Data di emissione: 21/05/2024

Lingua: italiano

Versione	Modifiche principali
3.1	Prima versione
3.2	Aggiunta della sezione relativa al Rappresentante Autorizzato
3.3	Modifica dell'Organismo Notificato
3.4	Modifica dell'intervallo del test e aggiunta di un nuovo numero di riferimento per lo strumento di qPCR QS5 Dx

CE 0459 IVD

Σ 32

Firalis SA
35 rue du Fort
68330 - Huningue FRANCIA

Telefono: +33 389 911 320
E-mail: contact@firalis.com
Web: www.firalis.com

Contenuto:

1. Uso previsto ... 5
2. Introduzione ... 5
3. Principio del test ... 6
4. Strumenti e materiali ... 6
4.1. Reagenti e materiali forniti con il kit ... 7
4.2. Materiali e attrezzature varie necessarie ... 8
4.3. Requisiti di conservazione del kit e durata di conservazione del kit ... 8
5. Estrazione e quantificazione del DNA genomico (gDNA) ... 8
5.1. Estrazione ... 8
5.2. Quantificazione ... 8
6. Procedura del saggio APO-Easy® Genotyping ... 9
6.1. Fase 1. Preparazione della reazione PCR di genotipizzazione in tempo reale ... 9
6.2. Fase 2. Esecuzione qPCR ... 11
6.3. Fase 3. Analisi dei risultati ... 13
6.4. Fase 4. Interpretazione ... 14
7. Risoluzione dei problemi ... 15
8. Parametri analitici ... 17
9. Prestazioni cliniche ... 17
10. Rischi residui e avvertenze ... 18
11. Limitazioni della procedura ... 19
12. Linee guida per la sicurezza chimica ... 20
13. Suggerimenti tecnici ... 20
14. Responsabilità ... 20
Assistenza tecnica ... 21
Notifica di eventuali gravi incidenti ... 21
Sintesi delle informazioni sulla sicurezza e sulle prestazioni ... 21
Riferimenti ... 22
Legenda dei simboli utilizzati nell'IFU e nelle etichette del kit ... 23
Rappresentante autorizzato ... 24

Tabelle:

Tabella 1. Riferimento dell'attrezzatura necessaria per l'esecuzione del kit di genotipizzazione APO-Easy®..... 7
Tabella 2. Riferimento del kit di estrazione del gDNA raccomandato (non fornito insieme al kit di genotipizzazione APO-Easy®). 7
Tabella 3. Contenuto del kit di genotipizzazione APO-Easy®. 7
Tabella 4. Panoramica del flusso di lavoro del test di genotipizzazione APO-Easy..... 9
Tabella 5. Modello di piastra da 96 pozzetti per la genotipizzazione APOE di 24 campioni, 3 controlli/SNP in duplicato e 2 NTC/SNP per il kit di genotipizzazione APO-Easy®..... 10
Tabella 6. Corrispondenza standard per la determinazione di SNP del test di genotipizzazione APO-Easy..... 10
Tabella 7. Programma di esecuzione qPCR nel dispositivo QS5..... 12
Tabella 8. Interpretazione del genotipo dai risultati degli SNP rs429358 e rs7412. 15
Tabella 9. Raccomandazioni per la risoluzione dei problemi del kit di genotipizzazione APO-Easy..... 15
Tabella 10 Il test di genotipizzazione APO-Easy offre un'accuratezza del 100%..... 17
Tabella 11 Confronti basati sul genotipo tra AD e NAD + HC..... 17

Figure:

Figura 1. Schema del gene APOE umano e dei polimorfismi a 2 singoli nucleotidi che danno luogo a 3 alleli ε2, ε3 ed ε4. 6
Figura 2. Selezione del tipo di esperimento nelle proprietà dell'esperimento sul software QS5. Assicurarsi di selezionare la genotipizzazione (freccia rossa). 11
Figura 3. Impostazione SNP per il kit di genotipizzazione APO-Easy sul software QS5. 12
Figura 4. Pagina dei risultati di esecuzione del qPCR sul software QS5. La freccia rossa indica il tipo di risultato da selezionare (discriminazione allelica) e la freccia verde indica l'icona per selezionare gli SNP. 13
Figura 5. Schema dei segnali degli standard per SNP rs429358 (mix master 1) dopo l'analisi qPCR.... 14
Figura 6. Schema dei segnali degli standard per SNP rs7412 (mix master 2) dopo l'analisi qPCR..... 14
Figura 7. Interpretazione dei risultati sul software QS5. La freccia rossa indica l'icona che interpreta il segnale e la freccia verde indica lo stato del paziente per ogni SNP determinato dal software dopo l'analisi dei risultati..... 14

Elenco delle abbreviazioni:

SNP: polimorfismi a singolo nucleotide

gDNA: acido desossiribonucleico genomico

APOE: Apolipoproteina E

AD: Morbo di Alzheimer

qPCR: reazione a catena della polimerasiqualitativa in tempo reale

IVD: Diagnostica in vitro

QS5-Dx: Sistema di PCR in tempo reale QuantStudio 5 Dx

NTC: Controllo senza modello

MUT: Mutante

WT: Non mutato

Het: Eterozigote

RCF: Forza centrifuga relativa

°C: Grado Celsius

ng: nanogrammo

µL: microlitro

STD: standard

IFU: Istruzioni per l'uso

SDS: Scheda dati di sicurezza

1. Uso previsto

Il kit di genotipizzazione APO-Easy® è un test diagnostico qualitativo in vitro destinato alla rilevazione di due polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) rs429358 e rs7412 nel DNA genomico umano. Consente di determinare sei genotipi di apolipoproteina E (APOE): e2/e2, e2/e3, e3/e3, e2/e4, e3/e4 ed e4/e4 sulla base della RT-PCR.

Il risultato del test di genotipizzazione APO-Easy® è destinato a essere utilizzato dai medici, insieme ad altri esami clinici, per aiutare a valutare il livello di rischio di un individuo di sviluppare la malattia di Alzheimer (AD). Un individuo con l'allele ε2 presenta il rischio più basso di sviluppare l'AD, a dimostrazione del suo effetto protettivo. La presenza di alleli ε3 si osserva principalmente in individui normali e non altera il rischio di sviluppare l'AD. Un individuo con un singolo allele ε4 (eterozigote e2/e4 o e3/e4) è associato a un rischio elevato di sviluppare l'AD, rispetto agli altri genotipi APOE senza e4 (e2/e2, e2/e3 ed e3/e3). La presenza del doppio allele ε4 (omozigote e4/e4) è associata al rischio più elevato di sviluppare l'AD, rispetto a tutti gli altri genotipi APOE.

Condizioni di utilizzo:

- Per l'uso su prescrizione
- Per l'uso in esseri umani adulti (> 18 anni)
- Da utilizzare nei laboratori di diagnostica molecolare da parte di operatori qualificati
- Questo test non è un metodo automatizzato
- Il test non può essere eseguito dal paziente a casa. Non è un dispositivo point-of-care né un dispositivo per test autosomministrati
- Questo test non è destinato a sostituire gli esami clinici e diagnostici.

2. Introduzione

L'apolipoproteina E (APOE) è un'apolipoproteina chilomicrona espressa in vari organi come fegato, cervello, milza, reni, ghiandole sessuali, ghiandole surrenali e macrofagi (Marias, 2019). È stato dimostrato che l'APOE è importante per vari processi, come il metabolismo delle lipoproteine, delle vitamine liposolubili e del glucosio/energia, nonché per la trasduzione del segnale, le metastasi e l'angiogenesi. Essendo importante nel metabolismo dei lipidi, l'APOE è ben collegato alle malattie cardiovascolari in quanto è necessario per il normale catabolismo dei componenti delle lipoproteine ricche di trigliceridi (Semaev et al., 2022). L'importanza dell'APOE nella patogenesi di disturbi neurodegenerativi come la demenza frontotemporale, la malattia di Parkinson, la demenza a corpi di Lewy e la malattia di Alzheimer (AD) è stata ben documentata (Davis et al., 2020; Mishra et al., 2017).

Il gene APOE ha tre alleli comuni (ε2, ε3 e ε4) e sei genotipi correlati (ε3ε3, ε3ε2, ε2ε2, ε3ε4, ε4ε4, e ε2ε4) [Su et al., 2017]. Le isoforme corrispondenti sono caratterizzate da aminoacidi in posizione 112 e 158 e determinano l'affinità per i recettori delle lipoproteine. L'APOE ε3 è l'allele più comune che si ritiene non aumenti né diminuisca il rischio di sviluppare l'AD. È stato dimostrato che APOE ε2 ha un effetto protettivo contro lo sviluppo di AD (Ohm et al., 1999), mentre APOE ε4 ha ridotto la clearance della beta-amiloide (Aβ), con conseguente aumento della deposizione di Aβ all'interno dei neuroni nel modello murino di AD (Yamazaki et al., 2019). Circa il 25 per cento delle persone è portatore di una copia di APOE ε4, mentre il 2-3 per cento è portatore di due copie

(https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-genetics-fact-sheet). Mayeux et al., 1998 hanno studiato 2188 pazienti con AD e hanno dimostrato che, se combinata con i criteri clinici, la presenza del genotipo APOE ε4 migliora la specificità della diagnosi di AD. Diversi studi hanno evidenziato che il genotipo APOE ε4 è associato all'insorgenza tardiva di forme familiari e sporadiche di AD (Corder et al., 1993, Schmechel et al., 1993, Strittmatter et al., 1993, Farrer et al., 1997, Bu G., 2009).

Il kit di genotipizzazione APO-Easy® utilizza la tecnica qualitativa della reazione a catena della polimerasi in tempo reale (qPCR) per la determinazione *in vitro* di due polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) APOE: rs429358 e rs7412. Questo test IVD utilizza sonde marcate con fluorescenza (FAM e VIC) che consentono la discriminazione allelica e la determinazione dei genotipi APOE.

3. Principio del test

Il kit di genotipizzazione APO-Easy® comprende i reagenti necessari per eseguire l'analisi qPCR per analizzare il DNA genomico (gDNA) estratto da campioni di DNA PAXgene per determinare i genotipi APOE. Il test analizza 2 SNP (rs429358 e rs7412) nel gene APOE e contiene controlli positivi per ogni SNP (non mutato, mutante ed eterozigote). Il genotipo è determinato in base allo stato di mutazione per entrambe le mutazioni analizzate, risultando in uno dei sei genotipi possibili(ε3ε3, ε3ε2, ε2ε2, ε3ε4, ε4ε4 e ε2ε4).

Per l'allele non mutato (ApoE3) vengono rilevati gli aminoacidi cisteina in posizione 112 e arginina in posizione 158. La mutazione ApoE4 (SNP rs429358) ha un impatto sull'amminoacido in posizione 112, con conseguente cambio di timina in citosina, che induce la traduzione di arginina anziché di cisteina. Mentre la mutazione ApoE2 (SNP rs7412) ha un impatto sull'amminoacido in posizione 158, con conseguente cambio di citosina in timina, inducendo la traduzione di cisteina anziché di arginina (Figura 1).

Figura 1. Schema del gene APOE umano e dei polimorfismi a 2 singoli nucleotidi che danno luogo a 3 alleli ε2, ε3 ed ε4.

4. Strumenti e materiali

Il kit di genotipizzazione APO-Easy® comprende i materiali di consumo per eseguire l'amplificazione qPCR e la rilevazione fluorogenica delle mutazioni APOE utilizzando ThermoFisher QS5-Dx (l'attrezzatura non è fornita con il kit). Le attrezzature necessarie per il test, ma non fornite con il kit, e i loro riferimenti sono riportati nella Tabella 1.

Tabella 1. Riferimento dell'attrezzatura necessaria per l'esecuzione del kit di genotipizzazione APO-Easy®

Strumento	Scopo	Produttore	Riferimento n.	Certificazioni
Nanodrop 2000/2000c	Quantificazione del gDNA	ThermoFisher	ND-2000	UL/CSA e CE
QS5-Dx	qPCR	ThermoFisher	A31928/A47324	FDA 510K (K190302)

Per l'estrazione del gDNA dalle provette di DNA PAXgene da sangue intero, Firalis raccomanda di utilizzare il riferimento indicato nella tabella 2 seguendo le istruzioni del produttore fornite con il kit. Se si utilizza un altro riferimento, Firalis non può garantire i risultati e le prestazioni del test. I campioni devono essere raccolti in provette di DNA ematico PAXgene® (BD Biosciences, n. di riferimento: 761165) secondo le istruzioni per l'uso fornite dal produttore della provetta di raccolta.

Tabella 2. Riferimento del kit di estrazione del gDNA raccomandato (non fornito insieme al kit di genotipizzazione APO-Easy®).

Descrizione	Produttore	Scopo	Stoccaggio	Riferimento	Quantità
Mini kit QIAamp DSP DNA Blood	Qiagen	Estrazione del gDNA	Secondo le raccomandazioni del fornitore	61104	1 kit / 50 campioni

4.1. Reagenti e materiali forniti con il kit

Il kit di genotipizzazione APO-Easy® contiene mix master pronte all'uso per 32 reazioni per SNP, controlli positivi: Standard A, Standard B, Standard C, Standard D, Standard E e una fiala di controllo senza modello (NTC). Con i reagenti di un kit è possibile effettuare un totale di 32 reazioni, comprese 6 reazioni per gli standard e 2 NTC per ogni SNP e per ogni analisi (Tabella 3).

Tabella 3. Contenuto del kit di genotipizzazione APO-Easy®.

Descrizione	Stoccaggio	Riferimento	Quantità (32 reazioni)
Mix master 1 di genotipizzazione TaqMan™ rs429358	da -15°C a -25°C	FLS-MM1OE-02	1 fiala
Mix master 2 di genotipizzazione TaqMan™ rs7412	da -15°C a -25°C	FLS-MM2OE-02	1 fiala
Controllo senza modello (NTC)	da -15°C a -25°C	FLS-NTC-01	1 fiala
Standard A: Mutante (MUT) rs7412	-da 15 a -25°C	FLS-OE2S-01	1 fiala
Standard B: Non mutato (WT) rs429358 e rs7412	-da 15 a -25°C	FLS-OE3S-01	1 fiala

Standard C: mutante (MUT) rs429358	-da 15 a -25°C	FLS-OE4S-01	1 fiala
Standard D: eterozigote (Het) rs7412	-da 15 a -25°C	FLS-OE23S-01	1 fiala
Standard E : Eterozigote (Het) rs429358	-da 15 a -25°C	FLS-OE34S-01	1 fiala

*Controlli positivi: Standard A, Standard B, Standard C, Standard D, Standard E. Controllo negativo: NTC

4.2. Materiali e attrezzature varie necessarie

- Acqua priva di nucleasi
- Utilizzare solo puntali e provette per microcentrifuga privi di nucleasi certificati
- Pipette di precisione - Pipetta multicanale
- Armadio BSL2
- Microcentrifuga (17000 forza centrifuga relativa (RCF))
- Vortex e microcentrifuga
- Piastre PCR in tempo reale
- Centrifuga compatta per piastre PCR

4.3. Requisiti di conservazione del kit e durata di conservazione del kit

- Il kit deve essere conservato a -20°C.
- I componenti del kit possono essere scongelati e congelati ripetutamente per tre volte e rimangono stabili. Il superamento del ciclo di congelamento e scongelamento consigliato potrebbe ridurre la funzionalità del kit.
- Il kit è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione.

5. Estrazione e quantificazione del DNA genomico (gDNA)

5.1. Estrazione

Estrazione del gDNA da sangue umano intero raccolto in provette PAXgene Blood DNA utilizzando il mini kit QIAamp DSP DNA Blood, come indicato nella tabella 2, seguendo le istruzioni per l'uso fornite insieme al kit.

5.2. Quantificazione

La quantificazione del gDNA estratto viene effettuata mediante Nanodrop. I campioni devono avere una concentrazione minima di 6,25 ng/µL e una concentrazione massima di 50 ng/µL. Se i campioni hanno una concentrazione superiore a quella raccomandata, devono essere diluiti in acqua priva di nucleasi (grado molecolare). Se i campioni hanno una concentrazione inferiore alla quantità richiesta, si raccomanda di utilizzare 4 µL in totale.

L'intervallo di quantità di gDNA utilizzato per il test di genotipizzazione APO-Easy® è compreso tra 12,5 e 100 ng.

6. Procedura del saggio APO-Easy® Genotyping

La tabella 4 presenta una panoramica del flusso di lavoro del test di genotipizzazione APO-Easy. Il tempo richiesto per il test è di 2h30.

Tabella 4. Panoramica del flusso di lavoro del test di genotipizzazione APO-Easy.

Flusso di lavoro	
Fase 1	Preparazione della reazione PCR di genotipizzazione in tempo reale
Fase 2	Esecuzione qPCR
Fase 3	Analisi dei risultati
Fase 4	Interpretazione

6.1. Fase 1. Preparazione della reazione PCR di genotipizzazione in tempo reale

Il kit comprende due mix master di genotipizzazione TaqMan™ pronte all'uso per valutare gli SNP APOE (rs429358 e rs7412), acqua priva di nucleasi per l'NTC e standard per imitare il tipo non mutato, mutante ed eterozigote per ciascun polimorfismo a singolo nucleotide (SNP).

Ogni mix master comprende un test dualplex che valuta l'SNP oggetto di interesse:

Mix master 1: composta da 2 sonde per valutare lo SNP rs429358 e consentire la discriminazione allelica per il nucleotide non mutato (T), il nucleotide mutante (C) e la condizione di eterozigote.

Mix master 2: composta da 2 sonde per valutare lo SNP rs7412 e consentire la discriminazione allelica per il nucleotide non mutato (C), il nucleotide mutante (T) e la condizione di eterozigote.

Standard A, B, C, D ed E:
Ogni standard (STD) è un modello di DNA progettato per imitare i tre alleli e la combinazione di diversi modelli di DNA che imitano la condizione eterozigote.

Standard A: modello di DNA dell'allele ApoE2
Standard B: modello di DNA dell'allele ApoE3
Standard C: modello di DNA dell'allele ApoE4
Standard D: modello di DNA con allele ApoE2 e ApoE3
Standard E: modello di DNA con allele ApoE3 e ApoE4

Nota: scongelare le mix master e standard in ghiaccio. Mescolare accuratamente i reagenti, centrifugarli brevemente e metterli in ghiaccio.

1. Dispensare 23 µL/pozzetto di mix master del test di rivelazione in una piastra da 96 pozzetti (per ogni campione è necessario aggiungere la master corrispondente a entrambi gli SNP).
2. Aggiungere 2 µL di gDNA o di standard nei pozzetti corrispondenti e centrifugare brevemente. La quantità totale di gDNA in una reazione deve essere compresa tra 12,5 e 100 ng.

- Ogni singolo SNP **richiede l'analisi di standard WT, MUT e HET** e di **NTC** (acqua di grado molecolare priva di nucleasi). Nella Tabella 5 è riportato un modello di layout per l'analisi di un massimo di 24 campioni di DNA PAXgene misurati per 2 SNP in una piastra PCR da 96 pozzetti.
- Nota: il kit di genotipizzazione APO-Easy consente di eseguire fino a 32 reazioni qPCR. Ogni mix master serve per 8 STD e fino a 24 campioni. Se deve essere valutato un numero inferiore di campioni, il kit può essere utilizzato due volte, ad esempio 8 STD più 8 pazienti possono essere valutati una volta e la seconda volta di nuovo 8 STD più 8 pazienti.

Tabella 5. Modello di piastra da 96 pozzetti per la genotipizzazione APOE di 24 campioni, 3 controlli/SNP in duplicato e 2 NTC/SNP per il kit di genotipizzazione 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	STD B: WT	Campione 1	Campione 9	Campione 17			STD B: WT	Campione 1	Campione 9	Campione 17		
B	STD B: WT	Campione 2	Campione 10	Campione 18			STD B: WT	Campione 2	Campione 10	Campione 18		
C	STD C: MUT	Campione 3	Campione 11	Campione 19			STD A: MUT	Campione 3	Campione 11	Campione 19		
D	STD C: MUT	Campione 4	Campione 12	Campione 20			STD A: MUT	Campione 4	Campione 12	Campione 20		
E	STD E: HET	Campione 5	Campione 13	Campione 21			STD D: HET	Campione 5	Campione 13	Campione 21		
F	STD E: HET	Campione 6	Campione 14	Campione 22			STD D: HET	Campione 6	Campione 14	Campione 22		
G	NTC	Campione 7	Campione 15	Campione 23			NTC	Campione 7	Campione 15	Campione 23		
H	NTC	Campione 8	Campione 16	Campione 24			NTC	Campione 8	Campione 16	Campione 24		

- Per ogni determinazione del test SNP deve essere utilizzato il seguente STD, come indicato di seguito. Per la valutazione di rs429358 (mix master 1), devono essere utilizzati gli standard B, C ed E, mentre per la valutazione di rs7412 (mix master 2) devono essere utilizzati gli standard B, A e D (Tabella 6).

Tabella 6. Corrispondenza standard per la determinazione di SNP del test di genotipizzazione APO-Easy.

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

3. Fare girare la piastra per 5 secondi e centrifugare a 500g per 30 secondi.
4. Avviare **immediatamente** la procedura.

6.2. Fase 2. Esecuzione qPCR

5. Impostazione del QS5 Dx per il test di genotipizzazione APO-Easy:

A. Nella pagina "Proprietà", assegnare il nome dell'esperimento e selezionare il tipo di esperimento come **genotipizzazione** (Figura 2).

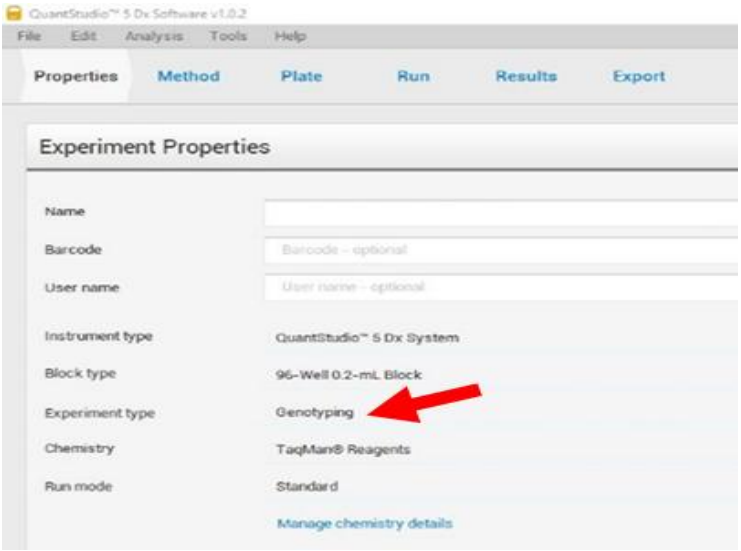

Figura 2. Selezione del tipo di esperimento nelle proprietà dell'esperimento sul software QS5. Assicurarsi di selezionare la genotipizzazione (freccia rossa).

B. Nella pagina "Metodo", impostare il volume totale di reazione di PCR, per **25 µL** di miscela di reazione.

C. Nella pagina "Scheda piastre", accedere a Impostazioni Avanzate per impostare la fluorescenza, fare clic sul pulsante "(+) Aggiungi" per ottenere **due test SNP** (test SNP 1 e test SNP 2). Fare clic sul pulsante OK per procedere. Quindi, per ciascun test SNP, fare clic sul pulsante Azione e selezionare Modifica per inserire il nome come segue (Figura 3):

NOTA: Per il **test SNP 1: rs429358** (master mix 1). Assicurarsi che l'**allele 1** sia impostato con il reporter **VIC** e l'**allele 2** con il reporter **FAM**

Per il **test SNP 2: rs7412** (mix master 2). Assicurarsi che l'**allele 1** sia impostato con il reporter **VIC** e l'**allele 2** con il reporter **FAM**

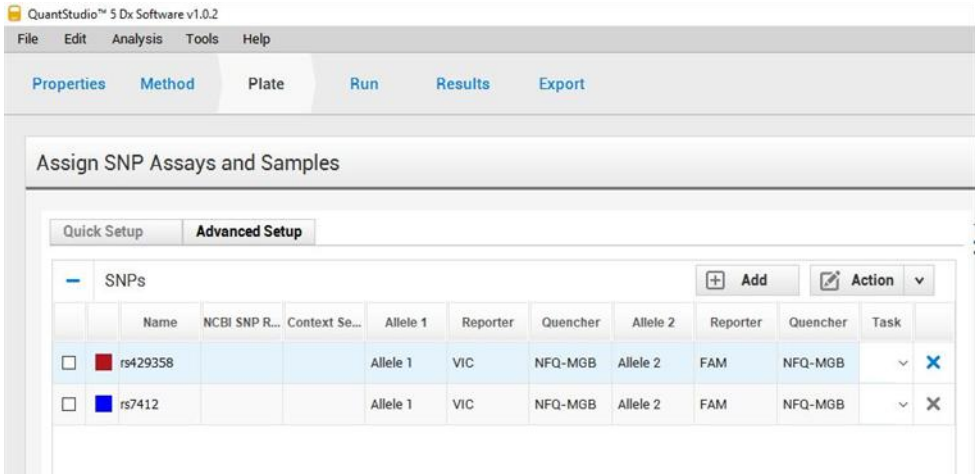

Figura 3. Impostazione SNP per il kit di genotipizzazione APO-Easy sul software QS5.

6. Per definire gli standard per rs429358 (mix master 1), selezionare la colonna 1 nel disegno della piastra e selezionare Test SNP 1 (rs429358). Quindi, selezionare A1 e B1 ("STD B (WT)") e assegnare 2/2 nella barra delle applicazioni. Selezionare C1 e D1 ("STD C (MUT)") e assegnare 1/1 nella barra delle applicazioni. Selezionare E1 e F1 ("STD E (HET)") e assegnare 1/2 nella barra delle applicazioni. Selezionare G1 e H1 e assegnare N nella barra delle applicazioni "NTC".

7. Per definire gli standard per rs7412 (mix master 2), selezionare la colonna 7 nel disegno della piastra e selezionare Test SNP 2 (rs7412). Quindi, selezionare A7 e B7 ("STD B (WT)") e assegnare 1/1 nella barra delle applicazioni. Selezionare C7 e D7 ("STD A (MUT)") e assegnare 2/2 nella barra delle applicazioni. Selezionare E7 e F7 ("STD D(HET)") e assegnare 1/2 nella barra delle applicazioni. Selezionare G7 e H7 e assegnare N nella barra delle applicazioni "NTC".

8. Per definire i campioni per rs429358 (mix master 1), selezionare le colonne da 2 a 4 nel disegno della piastra e selezionare test SNP 1 (rs429358).

9. Per definire i campioni per rs7412 (mix master 2), selezionare le colonne da 8 a 10 nel disegno della piastra e selezionare test SNP 2 (rs7412).

10. Una volta che la piastra è pronta e l'impostazione è stata completata, accedere alla scheda "Esecuzione" e avviare la procedura.

11. Il programma di esecuzione della qPCR viene selezionato automaticamente dal QS5-Dx e le specifiche del programma devono essere indicate nella Tabella 7:

Tabella 7. Programma di esecuzione qPCR nel dispositivo QS5.

Programma	Temperatura °C	Tempo	Cicli
Attivazione	95	10 min	
Denaturazione	95	15 sec	40
Estensione	60	1 min	

6.3. Fase 3. Analisi dei risultati

Prima dell'analisi dei risultati del campione, verificare il segnale ottenuto per l'STD con il rispettivo test di rilevamento in modalità di discriminazione allelica. I risultati di esecuzione del qPCR si trovano nella pagina dei risultati del software QS5 Dx (Figura 4). In questa pagina selezionare Discriminazione allelica (freccia rossa). La validità dell'analisi deve essere valutata separatamente per ciascuna mutazione. Per selezionare rs429358 o rs7412, fare clic sull'icona evidenziata dalla freccia verde.

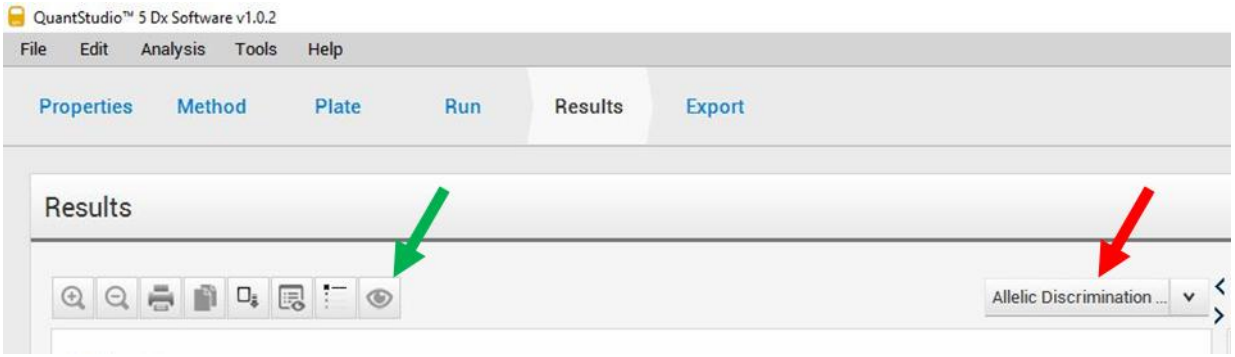

Figura 4. Pagina dei risultati di esecuzione del qPCR sul software QS5. La freccia rossa indica il tipo di risultato da selezionare (discriminazione allelica) e la freccia verde indica l'icona per selezionare gli SNP.

Per STD e NTC, l'analisi può procedere quando i segnali STD corrispondono all'esempio seguente. Assicuratevi che i vostri standard abbiano uno schema simile a quello mostrato nella Figura 3. Per rs429358, il tipo non mutato (WT) verrà visualizzato nell'area in alto a sinistra del grafico nell'asse delle ordinate (allele 2) corrispondente all'allele omozigote 2/allele 2 (e3). Lo standard mutante (MUT) avrà un segnale vicino all'asse x (allele 1) nell'area in basso a destra del grafico, corrispondente all'allele 1/allele 1 (e4). Lo standard eterozigote sarà a metà tra MUT e WT, corrispondente all'allele eterozigote 1/allele 2 (e3/e4), come mostrato nella **Figura 5**. L'NTC non genererà alcun segnale e si troverà in basso a sinistra del grafico.

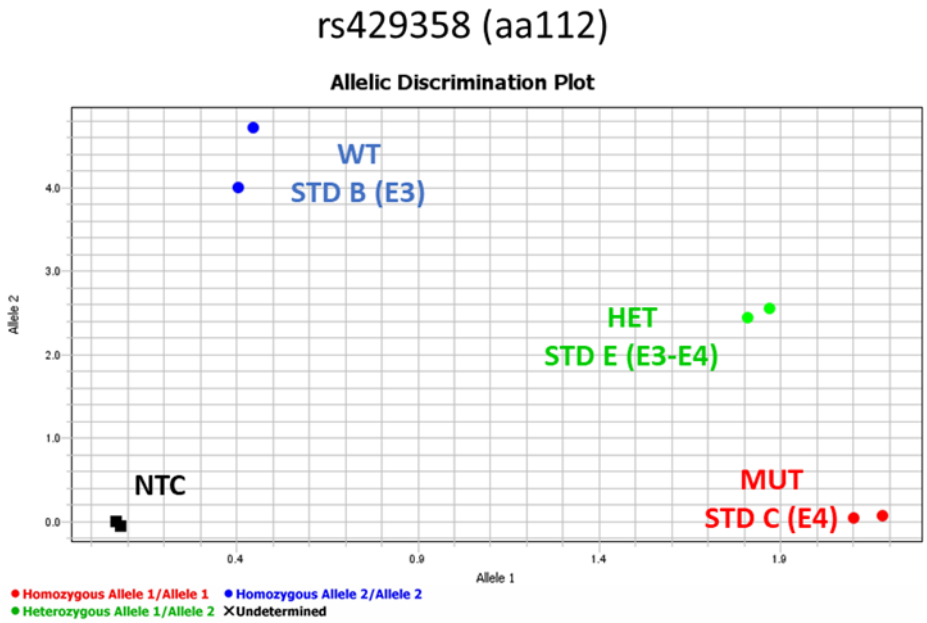

Figura 5. Schema dei segnali degli standard per SNP rs429358 (mix master 1) dopo l'analisi qPCR.

Per rs7412 il tipo non mutato (WT) verrà visualizzato in basso a destra vicino all'area dell'asse x del grafico corrispondente all'allele omozigote 1/allele 1 (e3). Lo standard mutante (MUT) avrà un segnale nell'area in alto a sinistra dell'asse y del grafico, corrispondente all'allele 2/allele 2 (e2). Lo standard eterozigote sarà a metà tra MUT e WT, corrispondente all'allele eterozigote 1/allele 2 (e2/e3), come mostrato nella **Figura 6**. L'NTC non genererà alcun segnale e si troverà in basso a sinistra del grafico.

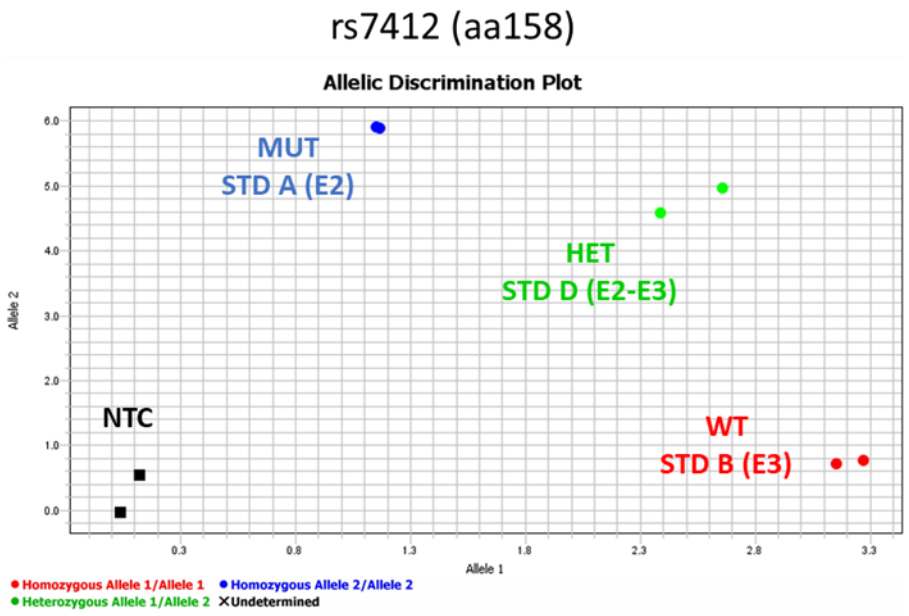

Figura 6. Schema dei segnali degli standard per SNP rs7412 (mix master 2) dopo l'analisi qPCR.

6.4. Fase 4. Interpretazione

Una volta convalidati i controlli, i segnali dei campioni vengono interpretati facendo clic sull'icona evidenziata dalla freccia rossa. Per ogni SNP, lo stato del paziente è disponibile nella colonna "Call" (freccia verde; Figura 7).

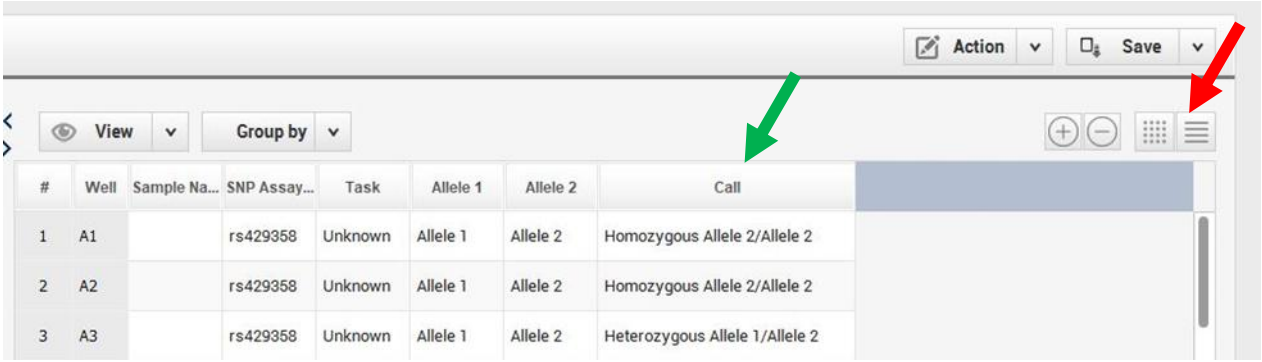

Figura 7. Interpretazione dei risultati sul software QS5. La freccia rossa indica l'icona che interpreta il segnale e la freccia verde indica lo stato del paziente per ogni SNP determinato dal software dopo l'analisi dei risultati.

Per rs429358, l'allele omozigote 2 / allele 2 corrisponde a WT, l'allele omozigote 1 / allele 1 corrisponde a MUT e l'allele eterozigote 1 / allele 2 corrisponde a HET.

Per rs7412, l'allele omozigote 1 / allele 1 corrisponde a WT, l'allele omozigote 2 / allele 2 corrisponde a MUT e l'allele eterozigote 1 / allele 2 corrisponde a HET.

Una volta assegnato lo stato per ogni SNP, il genotipo del campione può essere determinato utilizzando la Tabella 8 riportata di seguito.

Tabella 8. Interpretazione del genotipo dai risultati degli SNP rs429358 e 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. Risoluzione dei problemi

- La valutazione dei risultati del test deve essere effettuata dopo che i controlli positivi e negativi sono stati esaminati e ritenuti validi e accettabili. Se i controlli non sono validi, i risultati del campione non possono essere interpretati.
- Se si verifica un errore di dosaggio:
  - Controllare le date di scadenza dei singoli reagenti e assicurarsi che tutti i reagenti siano stati conservati come indicato sull'etichetta del prodotto. Se le condizioni di conservazione non sono state rigorosamente rispettate, i risultati non sono affidabili e il kit non può più essere utilizzato.
  - Assicurarsi che le calibrazioni delle pipette utilizzate siano aggiornate.
  - Assicurarsi che le impostazioni del ciclatore siano conformi alle IFU.

Le possibili ragioni e le azioni correttive per alcuni dei risultati emersi durante il test sono riportate nella Tabella 9.

Tabella 9. Raccomandazioni per la risoluzione dei problemi del kit di genotipizzazione APO-Easy.

Risultati	Possibili ragioni e azioni correttive
Nessuna chiamata in tutti i canali per un campione	Possibilità: problemi con la qualità del gDNA o sostanze di interferenza Raccomandazione: estrarre nuovamente il campione e ripetere la qPCR.
Assenza di segnale in uno o due canali	Possibilità: per un solo campione, ripetere la qPCR; per tutti i campioni, controllare la data di scadenza del kit e le condizioni di conservazione.

Genotipo non determinato per un SNP	Possibilità: l'ingresso di gDNA non era sufficiente. Raccomandazione: ripetere il test. Durante lo stesso test, per lo stesso campione, utilizzare 2µL di gDNA del campione con 23µL di mix master e 4µL di gDNA del campione con 21µL di mix master.
Dopo un nuovo test, il genotipo è ancora indeterminato	Possibilità: presenza di una sostanza interferente nel campione. Raccomandazione: - L'aggiunta di K2EDTA nella provetta di DNA PAXgene potrebbe interferire con la genotipizzazione del campione; verificare se l'EDTA è stato aggiunto nella provetta o se il volume del campione di sangue è stato raccolto correttamente secondo le istruzioni d'uso del produttore. - I trigliceridi nel sangue non devono superare la concentrazione fisiologica (concentrazione normale nel sangue: 0,5 - 1,5 g/L). Se nel campione di sangue è presente un eccesso di trigliceridi, questo potrebbe interferire con la corretta genotipizzazione del paziente. - L'albumina non deve superare la concentrazione fisiologica (concentrazione normale nel sangue: 35 - 50 g/L). Se la presenza di albumina nel campione di sangue del paziente supera questa concentrazione, potrebbe interferire con i risultati della genotipizzazione. Se il problema persiste, contattare l'assistenza tecnica.
I controlli non hanno segnale	Confermare che le condizioni di conservazione e le istruzioni fornite sono state rispettate. Potrebbe essersi verificato un problema di pipettaggio. Raccomandazione: ripetere il test. Se ancora non c'è segnale, contattare l'assistenza tecnica.
Segnale in NTC	Possibilità: la miscela di reazione è stata probabilmente contaminata da un modello. Raccomandazione: rifare la qPCR. Se il problema persiste, non utilizzare ulteriormente il kit e contattare l'assistenza tecnica.

8. Parametri analitici

Accuratezza: il kit di genotipizzazione APO-Easy® è accurato al 100% nel rilevare i genotipi APOE rispetto ai metodi di riferimento (sequenziamento bidirezionale Sanger e Next Generation Sequencing, cioè sequenziamento di seconda generazione).

Sensibilità: il test di genotipizzazione APO-Easy® rileva 12,5 ng di gDNA umano quando viene utilizzato con il sistema QuantStudio 5 Dx Real-Time PCR.

Precisione: il kit di genotipizzazione APO-Easy® è riproducibile con risultati che concordano al 100% con quelli ottenuti analizzando lotti diversi o utilizzando operatori diversi.

Interferenze: un eccesso di etanolo fino al 20%, un eccesso di bilirubina fino a 200 mg/mL, un eccesso di K2EDTA fino a 20 mg/mL, un eccesso di albumina fino a 25 g/L, un eccesso di emoglobina fino a 100 g/L o un eccesso di trigliceridi fino a 18,2 g/L nel campione **non interferisce** con i risultati della genotipizzazione.

9. Prestazioni cliniche

Il kit di genotipizzazione APO-Easy soddisfa la sua destinazione d'uso in quanto ha una percentuale di accordo positivo del 100% quando i risultati sono confrontati con il sequenziamento bidirezionale Sanger e il sequenziamento mirato di nuova generazione.

Tabella 10 Il test di genotipizzazione APO-Easy offre un'accuratezza del 100%

Genotipo APOE	APO-Easy®	NGS mirato	Chiamate genotipiche corrette	Accuratezza	Sequenziamento Sanger	Chiamate genotipiche corrette	Accuratezza
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

Quando le frequenze dei genotipi APOE dei soggetti con malattia di Alzheimer sono state confrontate con quelle dei soggetti non affetti da malattia di Alzheimer e dei soggetti sani di controllo, la presenza di due copie dell'allele ε4 (omozigote e4/e4) ha aumentato il rischio di AD di 48,56 volte rispetto a e2/e3. La presenza di una copia dell'allele ε4 ha aumentato il rischio di AD di 9,54 volte e di 5,78 volte rispettivamente per gli eterozigoti e3/e4 e per gli eterozigoti e2/e4 rispetto a e2/e3.

Tabella 11 Confronti basati sul genotipo tra AD e NAD + HC

	Gruppo			
Genotipo	**AD (n=234)**	**NAD + HC (n=302)**	**OR [95% CI]**	**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 (rif.)	
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. Rischi residui e avvertenze

Il design del kit di genotipizzazione APO-Easy® e le prestazioni sono stati ottimizzati da test completi interni ed eseguiti direttamente sugli utenti previsti, come verificato quando sono stati analizzati gruppi rappresentativi della popolazione di pazienti prevista. Firalis, la Società produttrice ritiene che i rischi rimanenti per gli utenti e i pazienti siano minimi e accettabili per i test genetici.

- I risultati negativi non escludono rischi per la salute e non devono essere utilizzati come unica base per le decisioni sulla gestione del paziente.
- I risultati negativi e positivi devono essere combinati con le osservazioni cliniche, l'anamnesi del paziente e altre informazioni sui test.

I rischi legati all'uso del kit di genotipizzazione APO-Easy sono minimi se il test viene utilizzato come previsto. Gli utenti possono ridurre ulteriormente il rischio seguendo le seguenti raccomandazioni:

Contaminazione dei campioni: la contaminazione dei campioni con DNA estraneo o possibili interferenti può portare a risultati imprecisi. L'uso di spazi di lavoro puliti, guanti monouso e attrezzature dedicate per la preparazione dei campioni ridurrà questo rischio residuo.

Contaminazione incrociata: la manipolazione impropria dei reagenti o dei campioni potrebbe causare una contaminazione incrociata tra i campioni, con conseguenti risultati errati. Mantenere aree di lavoro separate per la preparazione dei campioni, l'estrazione del DNA e l'impostazione della PCR e lavorare in un ambiente pulito quando si maneggiano pipette e altre attrezzature per evitare la contaminazione incrociata.

Lettura dei risultati: gli utenti inesperti possono interpretare i risultati in modo errato, portando a conclusioni sbagliate. L'interpretazione del test di genotipizzazione APO-Easy deve essere effettuata da personale altamente qualificato per ridurre al minimo il rischio di determinazione di risultati errati.

Formazione inadeguata: gli utenti con formazione o esperienza insufficiente possono essere più inclini a commettere errori nell'impostazione o nell'interpretazione dei test. Si consiglia di utilizzare il test APO-Easy solo a personale altamente qualificato.

11. Limitazioni della procedura

- I reagenti non sono destinati all'uso in procedure terapeutiche.
- Non è un metodo automatizzato e non è un dispositivo di autotest.
- Questo test è progettato per rilevare il genotipo APOE da provette di DNA umano PAXgene, entro l'intervallo di rilevamento del test.
- I risultati ottenuti da questo test devono essere interpretati nel contesto di tutti i risultati clinici di laboratorio pertinenti e non devono essere utilizzati da soli per una diagnosi.
- La contaminazione di materiali genomici provenienti da fonti esterne deve essere evitata mediante un'attenta manipolazione dei campioni, dei reagenti del kit e di un ambiente di lavoro pulito.
- Gli operatori devono evitare la contaminazione microbica durante le procedure e non devono utilizzare i componenti del kit se si osservano tracce di crescita microbica.
- Questo kit è destinato all'uso con il sistema QS5-Dx Real-Time PCR (ThermoFisher).
- Per ottenere risultati ottimali è essenziale attenersi scrupolosamente alle raccomandazioni riportate nelle IFU del kit di analisi.
- È necessario prestare attenzione alle date di scadenza e alle condizioni di conservazione di ciascuna scatola del kit. Non utilizzare il prodotto se scaduto o se conservato in modo non corretto.
- Non mescolare o sostituire i reagenti con quelli di altri lotti o fonti.
- Utilizzare solo puntali e provette per microcentrifuga privi di nucleasi certificati.
- Utilizzare acqua priva di nucleasi conservata in contenitori puliti.
- Qualsiasi variazione nel processo descritto nelle IFU può causare variazioni nel risultato.
- La genotipizzazione APO-Easy® non ha lo scopo di prevedere o rilevare la risposta alla terapia, né di aiutare a selezionare la terapia ottimale per i pazienti.

12. Linee guida per la sicurezza chimica

Ridurre al minimo i rischi delle sostanze chimiche:

- Leggere e comprendere le schede di sicurezza (SDS) fornite dal produttore dei prodotti chimici prima di conservare, maneggiare o lavorare con qualsiasi prodotto chimico o materiale pericoloso.
- Evitare il contatto diretto con le sostanze chimiche.
- Indossare i dispositivi di protezione individuale appropriati durante la manipolazione dei prodotti chimici, come occhiali di sicurezza, guanti e indumenti protettivi.
- Evitare l'inalazione di sostanze chimiche. Non fumare e non lasciare aperti i contenitori dei prodotti chimici. Utilizzare solo in presenza di una ventilazione adeguata o di una cappa di aspirazione.
- Per ulteriori indicazioni sulla sicurezza, consultare la SDS.
- Controllare regolarmente che non vi siano perdite o fuoriuscite di sostanze chimiche. In caso di perdite o fuoriuscite, seguire le procedure di pulizia del produttore come raccomandato nella SDS.
- Rispettare tutte le leggi e le normative locali, statali/provinciali o nazionali relative allo stoccaggio, alla manipolazione e allo smaltimento dei prodotti chimici.

13. Suggerimenti tecnici

- Per l'assistenza tecnica relativa all'estrazione del DNA, consultare la scheda tecnica fornita con il mini kit QIAamp DSP DNA blood (rif. 61104) di Qiagen.
- Evitare qualsiasi contaminazione tra i campioni e i reagenti. A tal fine, cambiare le punte ad ogni passaggio. La contaminazione batterica o fungina dei reagenti può causare risultati errati.
- Smaltire i materiali di consumo e i contenuti inutilizzati in contenitori appropriati.
- La procedura è adatta solo per l'uso con sangue intero proveniente da provette di DNA PAXgene.

14. Responsabilità

- Questo kit è destinato esclusivamente alla determinazione *in vitro* del genotipo APOE nel sangue intero umano da provette di DNA PAXgene.
- Questo kit è destinato esclusivamente all'uso da parte di personale qualificato.
- Firalis non è responsabile di eventuali danni o perdite dovuti all'utilizzo del kit in modo diverso da quanto espressamente indicato nelle presenti istruzioni.
- Firalis non è responsabile di eventuali violazioni di brevetti che potrebbero derivare dall'uso o dalla derivazione di questo prodotto.

Assistenza tecnica

Per assistenza tecnica, chiamare il Servizio Tecnico Firalis SA al numero +33-389 911 320 o visitare il sito web di Firalis SA all'indirizzo http://www.firalis.com o contattare "contact@firalis.com".

Notifica di eventuali gravi incidenti

Un incidente grave è la causa di qualsiasi malfunzionamento o deterioramento delle caratteristiche o delle prestazioni di un dispositivo e può essere classificato in almeno una delle seguenti conseguenze:

- Il decesso di un paziente, di un utente o di un'altra persona
- Un grave peggioramento temporaneo o permanente dello stato di salute di un paziente, di un utente o di un'altra persona
- Una grave minaccia per la salute pubblica.

In caso di dubbio, gli utenti devono sempre segnalarlo.

Se si ritiene che si tratti di un incidente da segnalare, contattare il produttore all'indirizzo clinical@firalis.com. Inoltre, è possibile accedere alle informazioni di contatto dell'autorità competente del vostro Paese cliccando qui: https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en.

Quando si segnala un incidente grave, si prega di raccogliere le seguenti informazioni:

- Nome commerciale del dispositivo (TM indica il marchio commerciale, © indica i Copyright)
- Nome e indirizzo del produttore
- Numero di lotto
- Numero di serie
- Codice UDI (identificazione unica dei dispositivi)
- Una descrizione accurata e concisa dell'incidente grave e delle conseguenze gravi o potenzialmente gravi per il paziente, l'utente o una terza parte.

Il dispositivo in questione non deve essere smaltito, ma deve essere messo a disposizione del produttore per ulteriori analisi volte a determinare le cause dell'incidente. È possibile aggiungere la richiesta di spedizione di ritorno quando si contatta il produttore per segnalare l'incidente.

Sintesi delle informazioni sulla sicurezza e sulle prestazioni

La sintesi delle informazioni sulla sicurezza e sulle prestazioni del kit di genotipizzazione APO-Easy® è stata convalidata dall'organismo notificato 2797 (gruppo BSI) ed è disponibile al pubblico sul sito web della banca dati europea dei dispositivi medici (Eudamed) utilizzando il numero UDI-DI del kit di genotipizzazione APO-Easy® nella banca dati. Questo identificatore è disponibile con il codice QR posto sull'etichetta della confezione del kit.

Il Riassunto della sicurezza e delle prestazioni sarà regolarmente aggiornato con tutte le informazioni rilevanti relative al kit di genotipizzazione APO-Easy®.

Riferimenti

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.

Legenda dei simboli utilizzati nell'IFU e nelle etichette del kit

IVD	Dispositivo diagnostico *in vitro*	NON STERILE	Dispositivo medico non sterile
REF	Numero di catalogo		Non utilizzare il pacchetto se è danneggiato
LOT	Codice lotto	CE 2797	Conformità Europea valutata da BSI
	Limiti di temperatura		Attenzione
	Data di scadenza		Contiene un numero sufficiente per < n > test
	Data di fabbricazione		Tossico o molto tossico
	Produttore		Consultare le istruzioni per l'uso
	Rischio biologico		Non riutilizzare

Rappresentante autorizzato

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

Nome: Pathaway Services Ltd

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

Telefono: +44 (0) 1536 647 537

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

Nome: MedEnvoy Switzerland

Indirizzo: Gotthardstrasse 28, 6302 Zug, Switzerland

Telefono: +41 41 562 01 42

FIRALIS

Grazie per avere scelto Firalis

Per ulteriori informazioni, schede di sicurezza o

per richiedere le istruzioni in altre lingue, scriveteci all'indirizzo:

contact@firalis.com