

Kit de Genotipagem APO-Easy®

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

REF FLS-OE-02

Apenas para utilização no diagnóstico *in vitro*

Não adequado para utilização terapêutica

Versão: 3.4

Data de Emissão: 21/05/2024

Idioma: português

Versão	Principais alterações
3.1	Primeira versão
3.2	Adição da secção relativa ao representante autorizado
3.3	Alteração do organismo notificado
3.4	Alteração do intervalo de ensaio e adição de uma nova referência para o equipamento de qPCR QS 5 Dx



Firalis SA
35 rue du Fort
68330 – Huningue FRANÇA

Telefone: +33 389 911320
E-mail: contact@firalis.com
Site: www.firalis.com

Conteúdo:

1. Utilização Prevista	5
2. Introdução	5
3. Princípio do ensaio	6
4. Instrumentos e materiais	6
4.1. Reagentes e materiais fornecidos com o kit	7
4.2. Outros materiais e equipamentos necessários	8
4.3. Requisitos de armazenamento do kit e prazo de validade do kit	8
5. Extração e quantificação do ADN genómico (gDNA)	8
5.1. Extração	8
5.2. Quantificação	8
6. Procedimento do ensaio de Genotipagem APO-Easy®	9
6.1. 1º Passo. Preparação da reação PCR de genotipagem em tempo real	9
6.2. 2º Passo. Execução da qPCR	11
6.3. 3º Passo. Análise dos resultados	13
6.4. 4º Passo. Interpretação	15
7. Resolução de problemas	15
8. Parâmetros Analíticos	17
9. Desempenho Clínico	17
10. Riscos residuais e advertências	18
11. Limitações do procedimento	19
12. Diretrizes de segurança química	20
13. Sugestões técnicas	20
14. Responsabilidade	20
Assistência técnica	21
Notificação de incidente grave	21
Resumo de Segurança e Desempenho	21
Referências	22
Legenda dos símbolos utilizados nas instruções de utilização e nos rótulos do kit	23
Representantes autorizados	24

Tabelas:

Tabela 1. Referência do equipamento necessário para utilizar o Kit de Genotipagem APO-Easy®	7
Tabela 2. Referência do kit de extração de gDNA recomendado (não fornecido juntamente com o Kit de Genotipagem APO-Easy®).	7
Tabela 3. Conteúdo do Kit de Genotipagem APO-Easy®	7
Tabela 4. Visão geral do fluxo de trabalho do ensaio de genotipagem APO-Easy.....	9
Tabela 5. Esquema de uma placa de 96 poços para a genotipagem de APOE de 24 amostras, 3 controlos/SNP em duplicado e 2 NTCs/SNP para o Kit de Genotipagem APO-Easy®.	10
Tabela 6. Correspondência padrão para determinar o SNP do ensaio de genotipagem APO-Easy.	11
Tabela 7. programa de execução de qPCR no dispositivo QS5.	13
Tabela 8. Interpretação do genótipo dos resultados dos SNPs rs429358 e rs7412.....	15
Tabela 9. Recomendações para a resolução de problemas do kit de genotipagem APO-Easy.	16
Tabela 10 O teste de genotipagem APO-Easy tem 100% de exatidão.....	17
Tabela 11 Comparações baseadas no genótipo entre DA e NAD + HC.....	18

Figuras:

Figura 1. Diagrama esquemático do gene APOE humano e os polimorfismos em 2 nucleótidos simples que resultam em 3 alelos ε2, ε3 e ε4.	6
Figura 2. Seleção do tipo de experiência nas propriedades da experiência no software QS5. Certifique-se de que seleciona a genotipagem (seta vermelha).....	11
Figura 3. Configuração SNP para o kit de genotipagem APO-Easy no software QS5.....	12
Figura4. Página de resultados da execução de qPCR no software QS5 A seta vermelha indica o tipo de resultado a selecionar (Discriminação Alélica) e a seta verde indica o ícone para selecionar os SNP.	13
Figura 5. Modelo dos sinais dos padrões para o SNP rs429358 (Mistura principal 1) após análise qPCR.	14
Figura 6. Modelo dos sinais dos padrões para o SNP rs7412 (Mistura principal 2) após análise qPCR.	14
Figura 7. Interpretação dos resultados no software QS5. A seta vermelha indica o ícone que interpreta o sinal e a seta verde indica o estado do paciente para cada SNP determinado pelo software após a análise dos resultados.	15

Lista de abreviaturas:

SNP: polimorfismos de nucleotídeo único

gDNA: ácido desoxirribonucleico genómico

APOE: Apolipoproteína E

DA: Doença de Alzheimer

qPCR: Reação em cadeia da polimerase qualitativa em tempo real

DIV: Diagnóstico In Vitro

QS5-Dx: Sistema de PCR em tempo real QuantStudio 5 Dx

NTC: Controlo sem Modelo

MUT: Mutante

WT: Tipo Selvagem

Het: Heterozigótico

FCR: Força Centrífuga Relativa

°C: Grau Celsius

ng: nanograma

μL: microlitro

STD: padrão

IU: Instruções de Utilização

FDS: Fichas de Dados de Segurança

1. Utilização Prevista

O Kit de Genotipagem APO-Easy® é um teste de diagnóstico qualitativo in vitro destinado à detecção de dois polimorfismos de nucleótido único (SNP) rs429358 e rs7412 no ADN genómico humano. Permite a determinação de seis genótipos da Apolipoproteína E (APOE): e2/e2, e2/e3, e3/e3, e2/e4, e3/e4 e e4/e4 com base em RT-PCR.

O resultado do teste de genotipagem APO-Easy® destina-se a ser utilizado por médicos, em conjunto com outros exames clínicos, para ajudar a avaliar o nível de risco de um indivíduo desenvolver a doença de Alzheimer (DA). Um indivíduo com alelos ε2 apresenta o menor risco de desenvolver a DA, o que indica o seu efeito protetor. A presença de alelos ε3 é observada principalmente em indivíduos normais e não altera o risco de desenvolvimento de DA. Um indivíduo com um único alelo ε4 (heterozigótico e2/e4, ou e3/e4) está associado a um risco elevado de desenvolver DA, em comparação com os outros genótipos APOE sem e4 (e2/e2, e2/e3, e3/e3). A presença de alelos ε4 duplos (homozigótico e4/e4) está associada ao risco mais elevado de desenvolver DA, em comparação com todos os outros genótipos APOE.

Condições de Utilização:

- Apenas com receita médica
- Para uso em humanos adultos (> 18 anos)
- Para uso em laboratórios de diagnóstico molecular por profissionais qualificados
- Este teste não é um método automatizado
- O teste não pode ser feito pelo paciente em casa. Não é um dispositivo de teste no local de prestação de cuidados nem um dispositivo de teste autoadministrado
- Este teste não se destina a substituir quaisquer exames clínicos e de diagnóstico.

2. Introdução

A apolipoproteína E (APOE) é uma apolipoproteína de quilomícrons expressa em vários órgãos como o fígado, o cérebro, o baço, os rins, as glândulas sexuais, as glândulas suprarrenais e os macrófagos ([Marias, 2019](#)). A APOE demonstrou ser importante para vários processos, como o metabolismo das lipoproteínas, as vitaminas lipossolúveis e a glicose/energia, bem como a transdução de sinais, as metástases e a angiogénese. Sendo importante no metabolismo dos lípidos, a APOE está associada a doenças cardiovasculares, uma vez que é necessária para o catabolismo normal dos componentes das lipoproteínas ricas em triglicéridos ([Semaev et al., 2022](#)). A importância da APOE na patogénese das doenças neurodegenerativas, como a demência frontotemporal, a doença de Parkinson, a demência com corpos de Lewy e a doença de Alzheimer (DA), está bem documentada ([Davis et al., 2020](#); [Mishra et al., 2017](#)).

O gene APOE tem três alelos comuns (ε2, ε3 e ε4) e seis genótipos relacionados (ε3ε3, ε3ε2, ε2ε2, ε3ε4, ε4ε4 e ε2ε4) [[Su et al., 2017](#)]. As isoformas correspondentes são caracterizadas por aminoácidos nas posições 112 e 158 e determinam a afinidade pelos recetores de lipoproteínas. Acredita-se que o APOE ε3 é o alelo mais comum que não aumenta nem diminui o risco de desenvolver DA. Verificou-se que a APOE ε2 tem um efeito protetor contra o desenvolvimento da DA ([Ohm et al., 1999](#)), enquanto a APOE ε4 reduziu a remoção da beta-amiloide (Aβ), o que resultou numa maior deposição de Aβ nos

neurónios no modelo de rato com DA (Yamazaki et al., 2019). Cerca de 25% das pessoas são portadoras de uma cópia da APOE ϵ 4 e 2 a 3% são portadoras de duas cópias (<https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-genetics-fact-sheet>). Mayeux et al., 1998 estudaram 2188 pacientes com DA e mostraram que, quando combinada com critérios clínicos, a presença do genótipo APOE ϵ 4 melhora a especificidade do diagnóstico da DA. Vários estudos evidenciaram que o genótipo APOE ϵ 4 está associado ao aparecimento tardio de formas familiares e esporádicas de DA (Corder et al., 1993, Schmechel et al., 1993, Strittmatter et al., 1993, Farrer et al., 1997, Bu G., 2009).

O Kit de Genotipagem APO-Easy® utiliza a técnica qualitativa de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para a determinação *in vitro* de dois polimorfismos de nucleótido único (SNP) da APOE: rs429358 e rs7412. Este teste DIV utiliza sondas marcadas com fluorescência (FAM e VIC) que permitem a discriminação alélica e a determinação dos genótipos da APOE.

3. Princípio do ensaio

O Kit de Genotipagem APO-Easy® inclui os reagentes necessários para efetuar a análise qPCR para testar o ADN genómico (gDNA) extraído de amostras de ADN PAXgene para determinar os genótipos APOE. O ensaio avalia 2 SNPs (rs429358 e rs7412) no gene APOE e contém um controlo positivo para cada SNP (tipo selvagem, mutante e heterozigótico). O genótipo é determinado com base no estado da mutação para ambas as mutações analisadas, resultando num dos seis genótipos possíveis (ϵ 3 ϵ 3, ϵ 3 ϵ 2, ϵ 2 ϵ 2, ϵ 3 ϵ 4, ϵ 4 ϵ 4 e ϵ 2 ϵ 4).

No caso do alelo de tipo selvagem (ApoE3), são detetados os aminoácidos cisteína na posição 112 e arginina na posição 158. A mutação ApoE4 (SNP rs429358) afeta o aminoácido na posição 112, resultando na alteração da timina para citosina, induzindo a tradução da arginina em vez da cisteína. Por outro lado, a mutação ApoE2 (SNP rs7412) afeta o aminoácido na posição 158, alterando a citosina para timina e induzindo a tradução de cisteína em vez de arginina (Figura 1).

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

Figura 1. Diagrama esquemático do gene APOE humano e os polimorfismos em 2 nucleótidos simples que resultam em 3 alelos ϵ 2, ϵ 3 e ϵ 4.

4. Instrumentos e materiais

Kit de Genotipagem APO-Easy® inclui consumíveis para efetuar a amplificação qPCR e a deteção fluorogénica das mutações APOE utilizando o ThermoFisher QS5-Dx (equipamento não fornecido com o kit). O equipamento necessário para o ensaio, mas não fornecido com o kit, e as respetivas referências são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Referência do equipamento necessário para utilizar o Kit de Genotipagem APO-Easy®

Instrumento	Finalidade	Fabricante	N.º de Referência	Certificações
Nanodrop 2000/2000c	Quantificação do gDNA	ThermoFisher	ND-2000	UL/CSA e CE
QS5-Dx	qPCR	ThermoFisher	A31928/A47324	FDA 510K (K190302)

Para a extração de gDNA de tubos de ADN PAXgene de sangue, a Firalis recomenda a utilização da referência indicada na tabela 2, seguindo as instruções do fabricante fornecidas juntamente com o kit.

Se for utilizada outra referência, a Firalis não pode garantir os resultados nem o desempenho do ensaio. As amostras devem ser colhidas no tubo de ADN de sangue PAXgene® (BD Biosciences, Referência n.º: 761165) de acordo com as instruções de utilização fornecidas pelo fabricante do tubo de colheita.

Tabela 2. Referência do kit de extração de gDNA recomendado (não fornecido juntamente com o Kit de Genotipagem APO-Easy®).

Descrição	Fabricante	Finalidade	Armazenamento	Referência	Quantidade
QIAamp DSP DNA Blood Mini kit	Qiagen	Extração de gDNA	De acordo com a recomendação do fornecedor	61104	1 kit/50 amostras

4.1. Reagentes e materiais fornecidos com o kit

O Kit de Genotipagem APO-Easy® contém misturas principais prontas a usar para 32 reações por SNP, controlos positivos: Padrão A, Padrão B, Padrão C, Padrão D, Padrão E, e um frasco de controlo sem modelo (NTC). É possível realizar um total de 32 reações utilizando os reagentes de um kit, incluindo 6 reações para os padrões e 2 NTCs para cada SNP e para cada análise (Tabela 3).

Tabela 3. Conteúdo do Kit de Genotipagem APO-Easy®

Descrição	Armazenamento	Referência	Quantidade (32 reações)
Mistura Principal de Genotipagem TaqMan™ 1 rs429358	-15 °C a -25 °C	FLS-MM1OE-02	1 frasco
Mistura Principal de Genotipagem TaqMan™ 2 rs7412	-15 °C a -25 °C	FLS-MM2OE-02	1 frasco
Controlo sem Modelo (NTC)	-15 °C a -25 °C	FLS-NTC-01	1 frasco
Padrão A: Mutante (MUT) rs7412	-15 °C a -25 °C	FLS-OE2S-01	1 frasco

Padrão B: Tipo selvagem (WT) rs429358 e rs7412	-15 °C a -25 °C	FLS-OE3S-01	1 frasco
Padrão C: Mutante (MUT) rs429358	-15 °C a -25 °C	FLS-OE4S-01	1 frasco
Padrão D: Heterozigótico (Het) rs7412	-15 °C a -25 °C	FLS-OE23S-01	1 frasco
Padrão E: Heterozigoto (Het) rs429358	-15 °C a -25 °C	FLS-OE34S-01	1 frasco

*Controlos positivos: Padrão A, Padrão B, Padrão C, Padrão D, Padrão E. Controlo negativo: NTC

4.2. Outros materiais e equipamentos necessários

- Água sem nucleases
- Utilizar apenas pontas e tubos de microcentrifugação certificados e sem nucleases
- Pipetas de precisão - Pipeta multicanal
- Armário BSL2
- Microcentrífuga (17000 de Força Centrífuga Relativa (FCR))
- Vórtice e microcentrifugação
- Placas de PCR em tempo real
- Centrífuga de placas PCR compacto

4.3. Requisitos de armazenamento do kit e prazo de validade do kit

- O kit deve ser armazenado a -20°C.
- Os componentes do kit podem ser repetidamente descongelados e congelados três vezes e permanecerem estáveis. Exceder o ciclo de congelação e descongelação recomendado pode diminuir a funcionalidade do kit.
- O kit é estável até à data de validade indicada no rótulo da caixa.

5. Extração e quantificação do ADN genómico (gDNA)

5.1. Extração

Extração de gDNA a partir de sangue humano colhido em tubos PAXgene Blood DNA utilizando o kit QIAamp DSP DNA Blood Mini, conforme indicado na tabela 2, seguindo a ficha de instruções do utilizador fornecida juntamente com o kit.

5.2. Quantificação

A quantificação do gDNA extraído é efetuada utilizando o Nanodrop. As amostras devem ter uma concentração mínima de 6.25 ng/μL e máxima de 50 ng/μL. Se as amostras tiverem uma concentração superior à recomendada, devem ser diluídas em água sem nucleases (grau molecular). Se as amostras tiverem uma concentração inferior à quantidade necessária, recomenda-se a utilização de 2 μL no total.

A quantidade de gDNA utilizada no ensaio de genotipagem APO-Easy® deve estar entre 12,5 e 100 ng.

6. Procedimento do ensaio de Genotipagem APO-Easy®

A visão geral do fluxo de trabalho do ensaio de genotipagem APO-Easy é apresentada na Tabela 4. O tempo necessário para o ensaio é de: 2h30.

Tabela 4. Visão geral do fluxo de trabalho do ensaio de genotipagem APO-Easy.

Fluxo de trabalho	
1º Passo	Preparação da reação PCR de genotipagem em tempo real
2º Passo	Execução da qPCR
3º Passo	Análise dos resultados
4º Passo	Interpretação

6.1. 1º Passo. Preparação da reação PCR de genotipagem em tempo real

O kit inclui duas Misturas Principais de Genotipagem TaqMan™ prontas a utilizar para avaliar os SNP da APOE (rs429358 e rs7412), água sem nucleases para a NTC e padrões para imitar as condições de tipo selvagem, mutante e heterozigótico para cada polimorfismo de nucleótido único (SNP).

Cada mistura principal é um ensaio dualplex que avalia o SNP de interesse:

Mistura principal 1: composta por 2 sondas para avaliar o SNP rs429358 e permitir a discriminação alélica para o nucleótido de tipo selvagem (T), o nucleótido mutante (C), bem como a condição heterozigótica.

Mistura principal 2: composta por 2 sondas para avaliar o SNP rs7412 e permitir a discriminação alélica para o nucleótido de tipo selvagem (C), o nucleótido mutante (T), bem como a condição heterozigótica.

Padrão A, B, C, D e E:

Cada padrão (STD) é um modelo de ADN concebido para imitar os três alelos e a combinação de diferentes modelos de ADN que imitam a condição heterozigótica.

Padrão A: Modelo de ADN do alelo ApoE2

Padrão B: Modelo de ADN do alelo ApoE3

Padrão C: Modelo de ADN do alelo ApoE4

Padrão D: Modelo de ADN com o alelo ApoE2 e ApoE3

Padrão E: Modelo de ADN com o alelo ApoE3 e ApoE4

Nota: Descongelar as misturas principais e os padrões em gelo. Misturar bem os reagentes, centrifugá-los brevemente e colocá-los em gelo.

1. Distribuir 23 µL/poço da mistura principal do ensaio de detecção numa placa de 96 poços (para cada amostra deve ser adicionada a mistura principal correspondente a ambos os SNPs).
2. Adicionar 2 µL de gDNA ou dos padrões nos poços correspondentes e centrifugar brevemente. A quantidade total de gDNA por reação deve situar-se entre 12,5 e 100 ng.
 - Cada SNP individual **requer a análise de padrões WT, MUT e HET**, bem como de **NTC** (grau molecular da água sem nucleases). A Tabela 5 apresenta um modelo de esquema para a análise de um máximo de 24 amostras de ADN PAXgene medidas para 2 SNP numa placa de PCR de 96 poços.
 - Nota: O kit de genotipagem APO-Easy permite efetuar até 32 reações qPCR. Cada mistura principal destina-se a 8 STD e a um máximo de 24 amostras. Se for necessário avaliar um número menor de amostras, o kit pode ser utilizado duas vezes, por exemplo, 8 STD mais 8 pacientes podem ser avaliados uma vez e, na segunda vez, podem ser avaliados novamente 8 STD mais 8 pacientes.

Tabela 5. Esquema de uma placa de 96 poços para a genotipagem de APOE de 24 amostras, 3 controlos/SNP em duplicado e 2 NTCs/SNP para o Kit de Genotipagem 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	Amostra #1	Amostra #9	Amostra #17			STD B: WT	Amostra #1	Amostra #9	Amostra #17		
B	STD B: WT	Amostra #2	Amostra #10	Amostra #18			STD B: WT	Amostra #2	Amostra #10	Amostra #18		
C	STD C: MUT	Amostra #3	Amostra #11	Amostra #19			STD A: MUT	Amostra #3	Amostra #11	Amostra #19		
D	STD C: MUT	Amostra #4	Amostra #12	Amostra #20			STD A: MUT	Amostra #4	Amostra #12	Amostra #20		
E	STD E: HET	Amostra #5	Amostra #13	Amostra #21			STD D: HET	Amostra #5	Amostra #13	Amostra #21		
F	STD E: HET	Amostra #6	Amostra #14	Amostra #22			STD D: HET	Amostra #6	Amostra #14	Amostra #22		
G	NTC	Amostra #7	Amostra #15	Amostra #23			NTC	Amostra #7	Amostra #15	Amostra #23		
H	NTC	Amostra #8	Amostra #16	Amostra #24			NTC	Amostra #8	Amostra #16	Amostra #24		

- Deve ser utilizado o seguinte STD para cada determinação do ensaio SNP, conforme indicado abaixo. Para o rs429358 (Mistura principal 1), devem ser utilizados os padrões B, C e E e para avaliar o rs7412 (Mistura principal 2) devem ser utilizados os padrões B, A e D (Tabela 6).

Tabela 6. Correspondência padrão para determinar o SNP do ensaio de genotipagem 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. Agitar a placa em vórtice durante 5 segundos e centrifugar a 500 g durante 30 segundos.
4. Proceder imediatamente **ao início da análise**.

6.2. 2º Passo. Execução da qPCR

5. Configurar o QS5 Dx para o ensaio de genotipagem APO-Easy:

A. Na página «Properties» (Propriedades), atribuir o nome da experiência e selecionar o tipo de experiência como **genotipagem** (Figura 2).

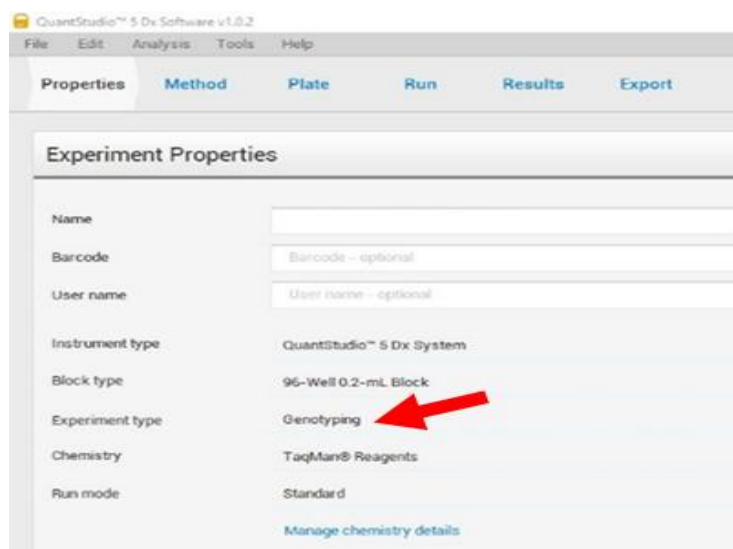


Figura 2. Seleção do tipo de experiência nas propriedades da experiência no software QS5. Certifique-se de que seleciona a genotipagem (seta vermelha).

B. Na página «Method» (Método), configure o volume total da reação de PCR, **25 µL** de mistura de reação.

C. Em «Plate sheet» (Folha de placa), ir para Advanced Setup (Configuração avançada), para configurar a fluorescência, clicar no botão «(+) Add» (Adicionar) para obter **dois ensaios SNP** (Ensaio SNP 1 e Ensaio SNP 2). Clicar no botão OK para continuar. Em seguida, para cada ensaio SNP, clicar no botão Action (Ação) e selecionar Edit (Editar) para preencher o nome da seguinte forma (Figura 3):

NOTA: Para o Ensaio **SNP 1: rs429358** (Mistura principal 1). Certifique-se de que o **Alelo 1** está definido com o repórter **VIC** e o **Alelo 2** está definido com o repórter **FAM**

Para o Ensaio **SNP 2: rs7412** (Mistura principal 2). Certifique-se de que o **Alelo 1** está definido com o repórter **VIC** e o **Alelo 2** está definido com o repórter **FAM**

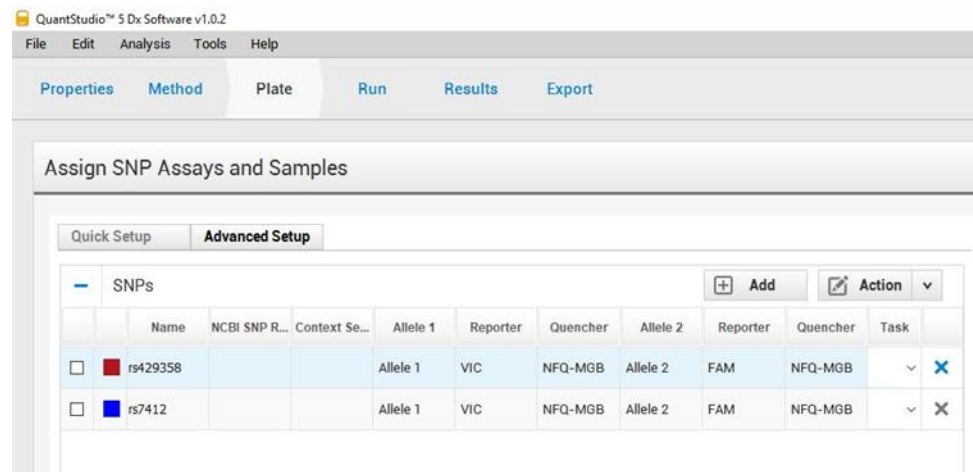


Figura 3. Configuração SNP para o kit de genotipagem APO-Easy no software QS5.

- Para definir padrões para rs429358 (Mistura principal 1), selecionar a coluna 1 no design da placa e selecionar SNP Assay1 (rs429358). Em seguida, selecionar A1 e B1 («STD B (WT)») e atribuir 2/2 na barra de tarefas. Selecionar C1 e D1 («STD C (MUT)») e atribuir 1/1 na barra de tarefas. Selecionar E1 e F1 («STD E (HET)») e atribuir 1/2 na barra de tarefas. Selecionar G1 e H1 e atribuir N na barra de tarefas «NTC».
- Para definir padrões para rs7412 (Mistura principal 2), selecionar a coluna 7 no design da placa e selecionar SNP Assay2 (rs7412). Em seguida, selecionar A7 e B7 («STD B (WT)») e atribuir 1/1 na barra de tarefas. Selecionar C7 e D7 («STD A (MUT)») e atribuir 2/2 na barra de tarefas. Selecionar E7 e F7 («STD D (HET)») e atribuir 1/2 na barra de tarefas. Selecionar G7 e H7 e atribuir N na barra de tarefas «NTC».
- Para definir Amostras para rs429358 (Mistura principal 1), selecionar as colunas 2 a 4 no design da placa e selecionar SNP Assay1 (rs429358).
- Para definir Amostras para rs7412 (Mistura principal 2), selecionar as colunas 8 a 10 no design da placa e selecionar SNP Assay2 (rs7412).
- Quando a placa estiver pronta e a configuração estiver concluída, vá para a folha «Run» (Executar) e inicie a execução.
- O programa de execução qPCR será automaticamente selecionado pelo QS5-Dx e a especificação do programa deve ser a indicada na Tabela 7:

Tabela 7. programa de execução de qPCR no dispositivo QS5.

Programa	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Ativação	95	10 minutos	40
Desnaturação	95	15 segundos	
Extensão	60	1 minuto	

6.3. 3º Passo. Análise dos resultados

Antes da análise dos resultados da amostra, verificar o sinal obtido para o STD com o respetivo ensaio de detecção no modo de discriminação alélica. Os resultados da execução da qPCR podem ser consultados na página de resultados do software QS5 Dx (Figura 4). Nesta página, selecionar Allelic Discrimination (discriminação alélica) (seta vermelha). A validade da análise deve ser avaliada para cada mutação separadamente. A seleção de rs429358 ou rs7412 pode ser feita clicando no ícone assinalado com a seta verde.

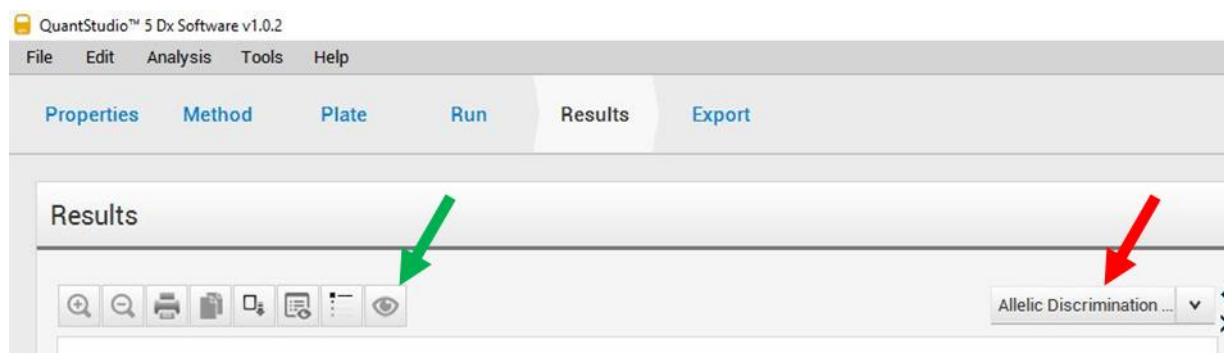


Figura4. Página de resultados da execução de qPCR no software QS5 A seta vermelha indica o tipo de resultado a selecionar (Discriminação Alélica) e a seta verde indica o ícone para selecionar os SNP.

Para o STD e o NTC, a análise pode prosseguir quando os sinais STD corresponderem ao exemplo seguinte. Certifique-se de que os seus padrões têm um modelo semelhante ao mostrado na Figura 3. Para o rs429358, o tipo selvagem (WT) terá o sinal na região superior esquerda do gráfico no eixo y (alelo 2) correspondente ao alelo homozigótico2/alelo2 (e3). O padrão mutante (MUT) terá um sinal próximo do eixo x (alelo 1) na área inferior direita do gráfico, correspondendo ao alelo1/alelo1 (e4). O padrão heterozigótico situar-se-á entre MUT e WT, correspondendo ao alelo heterozigótico1/alelo2 (e3/e4), como indicado na **Figura 5**. O NTC não gerará qualquer sinal e estará localizado na parte inferior esquerda do gráfico.

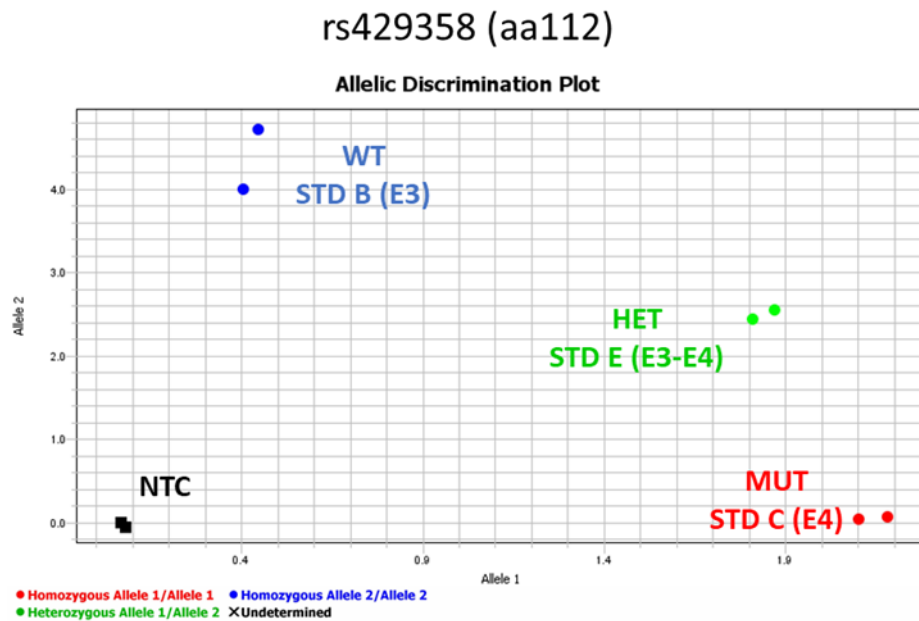


Figura 5. Modelo dos sinais dos padrões para o SNP rs429358 (Mistura principal 1) após análise qPCR.

Para o rs7412, o tipo selvagem (WT) terá o sinal no canto inferior direito, próximo da região do eixo x do gráfico, correspondendo ao alelo homozigótico1/alelo1 (e3). O padrão mutante (MUT) terá um sinal na área superior esquerda do eixo y do gráfico correspondente ao alelo2/alelo2 (e2). O padrão heterozigótico situar-se-á entre MUT e WT, correspondendo ao alelo heterozigótico1/alelo2 (e2/e3), como indicado na **Figura 6**. O NTC não gerará qualquer sinal e estará localizado na parte inferior esquerda do gráfico.

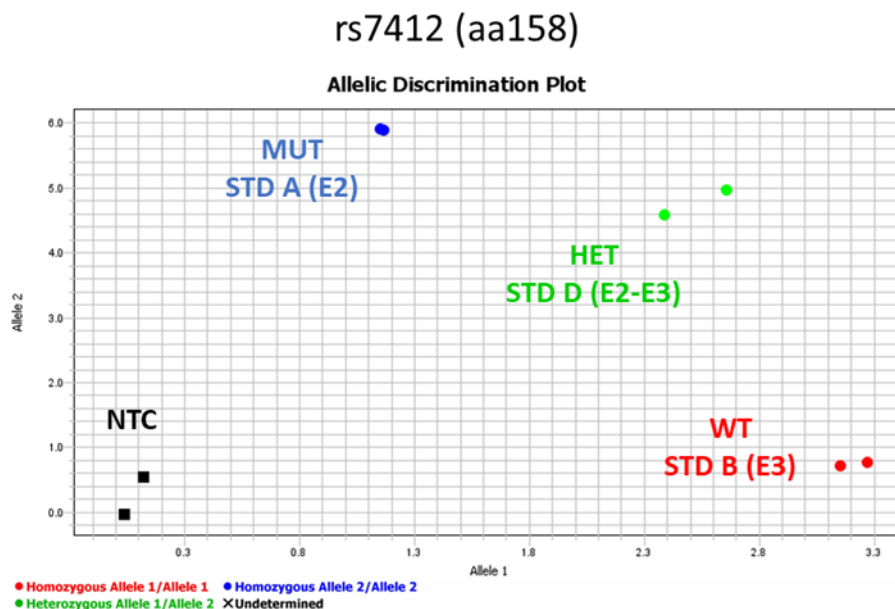


Figura 6. Modelo dos sinais dos padrões para o SNP rs7412 (Mistura principal 2) após análise qPCR.

6.4. 4º Passo. Interpretação

Uma vez validados os controlos, os sinais das amostras são interpretados clicando no ícone assinalado pela seta vermelha. Para cada SNP, o estado do paciente está disponível na coluna «Call» (seta verde; Figura 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

Figura 7. Interpretação dos resultados no software Q55. A seta vermelha indica o ícone que interpreta o sinal e a seta verde indica o estado do paciente para cada SNP determinado pelo software após a análise dos resultados.

Para o rs429358, o Alelo Homozigótico 2 / Alelo 2 corresponde a WT, o Alelo Homozigótico 1 / Alelo 1 corresponde a MUT e o Alelo heterozigótico 1 / Alelo 2 corresponde a HET.

Para o rs7412, o Alelo Homozigótico 1 / Alelo 1 corresponde a WT, o Alelo Homozigótico 2 / Alelo 2 corresponde a MUT e o Alelo heterozigótico 1 / Alelo 2 corresponde a HET.

Uma vez atribuído o estado a cada SNP, o genótipo da amostra pode ser determinado utilizando a Tabela 8 apresentada abaixo.

Tabela 8. Interpretação do genótipo dos resultados dos SNPs rs429358 e rs7412.

rs429358	rs7412	Genótipo
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. Resolução de problemas

❗ A avaliação dos resultados do teste deve ser efetuada depois de os controlos positivos e negativos terem sido examinados e considerados válidos e aceitáveis. Se os controlos não forem válidos, os resultados da amostra não podem ser interpretados.

❗ Se o ensaio falhar:

- Verificar as datas de validade dos reagentes individuais e assegurar que todos os reagentes foram armazenados conforme indicado no rótulo do produto. Se as condições de

armazenamento não tiverem sido rigorosamente respeitadas, os resultados não são fiáveis e o kit já não pode ser utilizado.

- Assegurar que as calibrações das pipetas utilizadas estão atualizadas.
- Assegurar que as definições do ciclo estão de acordo com as instruções de utilização.

As razões possíveis e as ações corretivas para algumas das constatações durante o ensaio são apresentadas no Quadro 9 abaixo.

Tabela 9. Recomendações para a resolução de problemas do kit de genotipagem APO-Easy.

Resultados	Razões possíveis e ações corretivas
Não há estimativas em todos os canais para uma amostra	Possibilidade: problemas com a qualidade do gDNA ou substâncias de interferência Recomendação: extrair novamente a amostra e refazer a qPCR.
Ausência de sinal num ou dois canais	Possibilidade: se for apenas para uma amostra, refazer a qPCR; se for para todas as amostras, verificar a data de validade do kit e as condições de armazenamento.
Genótipo indeterminado para um SNP	Possibilidade: a amostra de gDNA introduzida não foi suficiente. Recomendação: Repetir o teste. Durante o mesmo ensaio, para a mesma amostra, utilizar 2µL de gDNA da amostra com 23µL de mistura principal e 4µL de gDNA da amostra com 21µL de mistura principal.
Após novo teste, o genótipo continua indeterminado	Possibilidade: presença de uma substância interferente na amostra. Recomendação: - A adição de K2EDTA no tubo PAXgene DNA pode interferir com a genotipagem da amostra. Verificar se foi adicionado EDTA ao tubo ou se o volume de amostra de sangue foi corretamente recolhido de acordo com as instruções de utilização do fabricante. - Os triglicéridos no sangue não devem exceder a concentração fisiológica (concentração normal no sangue: 0,5 - 1,5 g/L). Se estiver presente um excesso de triglicéridos na amostra de sangue, pode interferir com a genotipagem correta do paciente. - A albumina não deve exceder a concentração fisiológica (concentração normal no sangue: 35 - 50 g/L). Se a presença de albumina na amostra de sangue do paciente

	exceder esta concentração, pode interferir com os resultados da genotipagem. Se o problema persistir, contactar a assistência técnica.
Os controlos não têm sinal	Confirmar se as condições de armazenamento e as instruções fornecidas foram seguidas. Poderá ter ocorrido um problema com a pipetagem. Recomendação: Repetir o teste. Se continuar a não ter sinal, contactar a assistência técnica.
Sinal em NTC	Possibilidade: a mistura de reação foi muito provavelmente contaminada com um modelo. Recomendação: Refazer a qPCR. Se o problema persistir, não voltar a utilizar o kit e contactar a assistência técnica.

8. Parâmetros Analíticos

Exatidão: o kit de genotipagem APO-Easy® tem 100% de exatidão na deteção de genótipos APOE quando comparado com os métodos de referência (sequenciação bidirecional Sanger e sequenciação de nova geração).

Sensibilidade: o ensaio de genotipagem APO-Easy® deteta 12,5 ng de gDNA humano quando utilizado com o sistema de PCR em tempo real QuantStudio 5 Dx.

Precisão: o kit de genotipagem APO-Easy® é reprodutível com resultados 100% positivos ao testar diferentes lotes ou ao ser utilizado por diferentes profissionais.

Interferências: um excesso de etanol até 20%, um excesso de bilirrubina até 200 mg/mL, um excesso de K2EDTA até 20 mg/mL, um excesso de albumina até 25 g/L, um excesso de hemoglobina até 100 g/L ou um excesso de triglicéridos até 18,2 g/L na amostra **não interfere** com os resultados da genotipagem.

9. Desempenho Clínico

O kit de genotipagem APO-Easy cumpre a utilização prevista, uma vez que apresenta uma concordância percentual positiva de 100% quando os resultados são comparados com a sequenciação bidirecional de Sanger e com a sequenciação orientada de nova geração.

Tabela 10 O teste de genotipagem APO-Easy tem 100% de exatidão

Genótipo APOE	APO-Easy®	NGS Direcionado	Estimativas de genótipos corretas	Exatidão	Sequenciação Sanger	Estimativas de genótipos corretas	Exatidão
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 as frequências do genótipo APOE dos indivíduos com doença de Alzheimer foram comparadas com as dos indivíduos sem doença de Alzheimer e com indivíduos de controlo saudáveis combinados, a presença de duas cópias do alelo ε4 (homozigótico e4/e4) aumentou o risco de DA 48,56 vezes em comparação com e2/e3. A presença de uma cópia do alelo ε4 aumentou o risco de DA 9,54 vezes e 5,78 vezes para os heterozigotos e3/e4 e heterozigotos e2/e4, respetivamente, quando comparados com e2/e3.

Tabela 11 Comparações baseadas no genótipo entre DA e NAD + HC

Genótipo	Grupo		OR [95% CI]	p
	DA (n=234)	NAD + HC (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. Riscos residuais e advertências

O design e as características de desempenho do kit de genotipagem APO-Easy® foram otimizados através de testes exaustivos realizados internamente e por utilizadores previstos, tal como verificado ao testar populações representativas da população de pacientes prevista. A Firalis, a empresa fabricante, considera que os restantes riscos para os utilizadores e pacientes são mínimos e aceitáveis para os testes genéticos.

- Os resultados negativos não excluem os riscos para a saúde e não devem ser utilizados como a única base para as decisões de tratamento dos pacientes.
- Os resultados negativos e positivos devem ser complementados com observações clínicas, historial do paciente e outras informações sobre os testes.

Os riscos da utilização do kit de genotipagem APO-Easy são mínimos se o teste for utilizado como pretendido. Os utilizadores podem minimizar ainda mais os riscos seguindo as recomendações abaixo:

Contaminação das Amostras: a contaminação das amostras com ADN estranho ou possíveis interferentes pode levar a resultados imprecisos. A utilização de espaços de trabalho limpos, luvas descartáveis e equipamento específico para a preparação de amostras atenuará este risco residual.

Contaminação cruzada: o manuseamento incorreto de reagentes ou amostras pode resultar em contaminação cruzada entre amostras, conduzindo a resultados incorretos. Manter áreas de trabalho

separadas para a preparação de amostras, extração de ADN e preparação da PCR, e trabalhar num ambiente limpo ao manusear pipetas e outro equipamento para evitar a contaminação cruzada.

Leitura dos resultados: os utilizadores inexperientes podem interpretar mal os resultados, levando a conclusões incorretas. A interpretação do ensaio de genotipagem APO-Easy deve ser efetuada por um profissional altamente qualificado para minimizar qualquer risco de determinação incorreta dos resultados.

Formação inadequada: os utilizadores com formação ou experiência insuficientes podem ser mais propensos a erros na configuração ou interpretação do ensaio. Recomendamos a utilização do teste APO-Easy apenas a profissionais altamente qualificados.

11. Limitações do procedimento

- Os reagentes não se destinam a ser utilizados em procedimentos terapêuticos.
- Não é um método automatizado e não é um dispositivo de autoteste.
- Este ensaio foi concebido para detetar o genótipo APOE a partir de tubos de ADN PAXgene humano, dentro do intervalo de deteção do ensaio.
- Os resultados obtidos com este ensaio devem ser interpretados no contexto de todos os resultados laboratoriais clínicos relevantes e não devem ser utilizados isoladamente para qualquer diagnóstico.
- A contaminação de materiais genómicos de fontes externas deve ser evitada através do manuseamento cuidadoso das amostras, dos reagentes do kit e de um ambiente de trabalho limpo.
- Os utilizadores devem evitar contaminantes microbianos durante os procedimentos e não devem utilizar os componentes do kit se for observada evidência de crescimento microbiano.
- Este kit destina-se a ser utilizado com o QS5-Dx Real-Time PCR System (ThermoFisher).
- O cumprimento rigoroso das recomendações fornecidas nas instruções de utilização do kit de ensaio é essencial para obter resultados ótimos.
- É fundamental prestar atenção aos prazos de validade e às condições de conservação de cada caixa do kit. Não utilizar o kit se este tiver expirado ou se tiver sido armazenado incorretamente.
- Não misturar ou substituir reagentes por outros de outros lotes ou fontes.
- Utilizar apenas pontas e tubos de microcentrifugação certificados sem nucleases.
- Utilizar água sem nucleases armazenada em recipientes limpos.
- Qualquer variação no processo descrito nas Instruções de Utilização pode causar variações no resultado.
- O kit de genotipagem APO-Easy® não se destina a prever ou detetar a resposta à terapia, ou a ajudar a selecionar a terapia ideal para os pacientes.

12. Diretrizes de segurança química

Para minimizar os perigos dos produtos químicos:

- § Ler e compreender as Fichas de Dados de Segurança (FDS) fornecidas pelo fabricante dos produtos químicos antes de armazenar, manusear ou trabalhar com quaisquer produtos químicos ou materiais perigosos.
- § Evitar o contacto direto com os produtos químicos.
- § Utilizar equipamento de proteção individual adequado ao manusear produtos químicos, como óculos de segurança, luvas e vestuário de proteção.
- § Evitar a inalação de produtos químicos. Não fumar nem deixar os recipientes de produtos químicos abertos. Utilizar apenas com ventilação adequada ou exaustor.
- § Para orientações de segurança adicionais, consultar a FDS.
- § Verificar regularmente se existem fugas ou derrames de produtos químicos. Se ocorrer uma fuga ou derrame, seguir os procedimentos de limpeza do fabricante, conforme recomendado na FDS.
- § Cumprir com todas as leis e regulamentos locais, estaduais/provinciais ou nacionais relacionados ao armazenamento, manuseio e descarte de produtos químicos.

13. Sugestões técnicas

- § Para obter assistência técnica relacionada com a extração de ADN, consultar a ficha de dados fornecida com o QIAamp DSP DNA blood mini-Kit recomendado (ref: 61104) pela Qiagen.
- § Evitar qualquer contaminação entre amostras e reagentes. Para o efeito, mudar as pontas em cada passo. A contaminação bacteriana ou fúngica em quaisquer reagentes pode causar resultados erróneos.
- § Eliminar os materiais de consumo e os conteúdos não utilizados em contentores adequados.
- § O procedimento só é adequado para utilização com sangue a partir de tubos de ADN PAXgene.

14. Responsabilidade

- § Este kit destina-se apenas à determinação *in vitro* do genótipo APOE em sangue humano proveniente de tubos de ADN PAXgene.
- § Este kit destina-se apenas a ser utilizado por profissionais qualificados.
- § A Firalis não se responsabiliza por qualquer dano ou perda devido à utilização do kit de qualquer outra forma que não a expressamente indicada nestas instruções.
- § A Firalis não é responsável por quaisquer infrações de patentes que possam resultar da utilização ou derivação deste produto.

Assistência técnica

Para obter assistência técnica, contactar os Serviços Técnicos da Firalis SA através do número +33 389 911 320 ou visitar o site da Firalis SA em <http://www.firalis.com> ou contactar «contact@firalis.com».

Notificação de incidente grave

Um incidente grave é a causa de qualquer mau funcionamento ou deterioração das características ou do desempenho de um dispositivo, e pode ser classificado em pelo menos uma das seguintes consequências:

- A morte de um paciente, utilizador ou outra pessoa
- Uma deterioração grave temporária ou permanente do estado de saúde de um paciente, utilizador ou outra pessoa
- Uma ameaça grave para a saúde pública.

Em caso de dúvida, os utilizadores devem sempre comunicá-lo.

Se concluir que se trata de um incidente que deve ser comunicado, contacte o fabricante em clinical@firalis.com. Também pode encontrar as informações de contacto da autoridade competente no seu país aqui: https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en.

Ao notificar um incidente grave, reúna as seguintes informações:

- Nome comercial do dispositivo (MR para marca registada, © para direitos de autor)
- Nome e morada do fabricante
- Número de lote
- Número de série
- Código UDI (Identificação Única do Dispositivo)
- Uma descrição exata e concisa do incidente grave e das consequências graves ou possivelmente graves para o paciente, o utilizador ou terceiros.

O dispositivo em causa não deve ser eliminado, mas deve ser colocado à disposição do fabricante para análise posterior, a fim de determinar as causas do incidente. Pode acrescentar o seu pedido de envio de devolução quando contactar o fabricante para comunicar o incidente.

Resumo de Segurança e Desempenho

O Resumo de Segurança e Desempenho do kit de Genotipagem APO-Easy® foi validado pelo Organismo de Certificação 2797 (grupo BSI) e está disponível ao público no site da base de dados europeia sobre dispositivos médicos (Eudamed), utilizando o número UDI-DI do kit de Genotipagem APO-Easy® na base de dados. Este identificador está disponível com o código QR colocado no rótulo da embalagem do kit.

O Resumo de Segurança e Desempenho será atualizado regularmente com todas as informações relevantes relativas ao kit de genotipagem APO-Easy®.

Referências

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 dos símbolos utilizados nas instruções de utilização e nos rótulos do kit

	Dispositivo de diagnóstico <i>in vitro</i>		Dispositivo médico não esterilizado
	Número de catálogo		Não utilizar se a embalagem estiver danificada
	Código do lote		Conformidade europeia avaliada pelo GMED
	Limitações de temperatura		Aviso
	Data de Validade		Contém o suficiente para < n > ensaios
	Data de Fabrico		Tóxico ou muito tóxico
	Fabricante		Consultar o manual de instruções
	Risco biológico		Não reutilizar

Representantes autorizados

- **Representante autorizado no Reino Unido (UKRP)**

Nome: Pathaway Services Ltd

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

Telefone: +44 (0) 1536 647 537

- **Representante autorizado na Suíça (CH-REP)**

Nome: MedEnvoy Switzerland

Morada: Gotthardstrasse 28, 6302 Zug, Switzerland

Telefone: +41 41 562 01 42



Obrigado por escolher a Firalis

Para qualquer informação complementar, ficha de dados de segurança

ou instruções noutras línguas, contacte-nos:

contact@firalis.com