Kit de genotipare APO-Easy®

INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

REF FLS-OE-02

Exclusiv pentru diagnostic *in vitro*

Nu este destinat uzului terapeutic

Versiunea: 3.4

Data emiterii: 21.05.2024

Limba: Română

Versiune	Modificări principale
3.1	Prima versiune
3.2	Adăugarea secțiunii privind Reprezentantul autorizat
3.3	Modificarea Organismului notificat
3.4	Modificarea intervalului testului și adăugarea unei noi referințe pentru instrumentul qPCR QS5 Dx

CE 0459 IVD

Σ 32

Firalis SA
35 rue du Fort
68330 – Huningue FRANȚA

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

Cuprins:

1. Utilizare prevăzută 5
2. Introducere 5
3. Principiul testului 6
4. Instrumente și materiale 6
4.1. Reactivi și materiale furnizate cu kitul 7
4.2. Diverse materiale și echipamente necesare 8
4.3. Cerințe privind depozitarea kitului și termenul de valabilitate al kitului 8
5. Extracția și cuantificarea ADN-ului genomic (ADNg) 8
5.1. Extracție 8
5.2. Cuantificare 8
6. Procedura de analiză a genotipării APO-Easy® 8
6.1. Pasul 1 Pregătirea reacției PCR de genotipare în timp real 9
6.2. Pasul 2. Executarea qPCR 10
6.3. Pasul 3 Analiza rezultatelor 12
6.4. Pasul 4 Interpretare 14
7. Depanare 15
8. Parametri analitici 16
9. Performanță clinică 17
10. Riscuri reziduale și avertismente 17
11. Limitări ale procedurii 19
12. Orientări privind securitatea chimică 20
13. Recomandări tehnice 21
14. Responsabilitate 21
Asistența tehnică 21
Notă de raportare a incidentelor grave 21
Rezumatul caracteristicilor de siguranță și performanță 22
Referințe 23
Legenda simbolurilor utilizate în instrucțiunile de utilizare și pe etichetele kitului 24

Tabele:

Tabel 1. Referință privind echipamentul necesar pentru a efectua genotiparea cu kitul APO-Easy®.....6
Tabel 2. Referință la kitul recomandat de extracție ADNg (nu este furnizat împreună cu kitul de genotipare APO-Easy®). 7
Tabel 3. Conținutul kitului de genotipare APO-Easy®.....7
Tabel 4. Prezentare generală a fluxului de lucru al testului de genotipare APO-Easy.....8
Tabel 5. Modelul unei plăci cu 96 de godeuri pentru genotiparea APOE a 24 de specimene, 3 controale/SNP în duplicat și 2 NTC/SNP pentru kitul de genotipare APO-Easy®. 10
Tabel 6. Corespondență standard pentru determinarea SNP a testului de genotipare APO-Easy. 10
Tabel 7. Programul de execuție qPCR în dispozitivul QS5.....12
Tabel 8. Interpretarea genotipului din rezultatele SNPs rs429358 și rs7412.....15
Tabel 9. Recomandări pentru depanarea kitului de genotipare APO-Easy.....15
Tabelul 10. Testul de genotipare APO-Easy are o acuratețe de 100%.....17
Tabelul 11. Comparații bazate pe genotip între AD și NAD + HC 17

Figuri:

Figura 1. Diagrama schematică a genei APOE umane și polimorfismele la 2 nucleotide unice care rezultă în 3 alele ε2, ε3 și ε4.....6
Figura 2. Selectarea tipului de experiment în proprietățile experimentului în software-ul QS5. Asigurați-vă că selectați genotiparea (săgeata roșie).....11
Figura 3. Configurarea SNP pentru kitul de genotipare APO-Easy, pe software-ul QS5.....12
Figura 4. Pagina cu rezultatele execuției qPCR pe software-ul QS5. Săgeata roșie indică tipul de rezultat care trebuie selectat (Discriminare alelică) și săgeata verde indică pictograma pentru selectarea SNP-urilor.....13
Figura 5. Modelul semnalelor standardelor pentru SNP rs429358 (amestec Master 1) după analiza qPCR.....14
Figura 6. Modelul semnalelor standardelor pentru SNP rs7412 (amestec Master 2) după analiza qPCR.....14
Figura 7. Interpretarea rezultatelor pe software-ul QS5. Săgeata roșie indică pictograma care interpretează semnalul și săgeata verde indică starea pacientului pentru fiecare SNP determinat de software după analiza rezultatelor.....14

Lista abrevierilor:

SNP: polimorfisme uninucleotidice

ADNg: acid dezoxiribonucleic genomic

APOE: apolipoproteina E

AD: boala Alzheimer

qPCR: reacție cantitativă în lanț a polimerazei în timp real

IVD: diagnostic in vitro

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

NTC: control fără etalon

MUT: mutant

WT: tulpină sălbatică

Het: heterozigot

RCF: forța centrifugă relativă

°C: grad Celsius

ng: nanogram

µL: microlitru

STD: standard

IFU: Instrucțiuni de Utilizare

FDS: fișe cu date de securitate

1. Utilizare prevăzută

Kitul de genotipare APO-Easy® este un test pentru diagnosticare calitativă in vitro, destinat detectării a două polimorfisme uninucleotidice (SNP-uri), rs429358 și rs7412, în ADN-ul genomic uman. Acest test permite determinarea a șase genotipuri de apolipoproteină E (APOE): e2/e2, e2/e3, e3/e3, e2/e4, e3/e4 și e4/e4 pe baza RT-PCR.

Rezultatul testului de genotipare APO-Easy® este destinat pentru utilizarea de către medici, în asociere cu alte examinări clinice, pentru a ajuta la evaluarea nivelului de risc al unei persoane de a dezvolta boala Alzheimer (AD). Un individ cu alele ε2 prezintă cel mai scăzut risc de a dezvolta AD, ceea ce indică efectul protector al acestor alele. Prezența alelelor ε3 este observată în principal la persoanele normale și nu modifică riscul de apariție a AD. Un individ cu o alelă ε4 unică (heterozigot e2/e4 sau e3/e4) este asociat cu un risc ridicat de a dezvolta AD, comparativ cu alte genotipuri APOE fără e4 (e2/e2, e2/e3 și e3/e3). Prezența alelelor duble ε4 (homozigot e4/e4) este asociată cu cel mai mare risc de a dezvolta AD, comparativ cu toate celelalte genotipuri APOE.

Condiții de utilizare:

- Pentru utilizare pe bază de prescripție medicală
- Pentru utilizare la adulți (vârsta > 18 ani)
- Pentru utilizarea în laboratoarele de diagnosticare moleculară, de către operatori calificați
- Acest test nu este o metodă automată
- Testul nu poate fi efectuat de pacient, la domiciliu. Dispozitivul nu este nici un dispozitiv de testare la punctul acordării asistenței medicale, nici un dispozitiv de testare cu autoadministrare
- Acest test nu este destinat să înlocuiască examinările clinice și diagnostice.

2. Introducere

Apolipoproteina E (APOE) este o apolipoproteină chilomicronică exprimată în diferite organe, cum ar fi ficatul, creierul, splina, rinichii, glandele sexuale, glandele suprarenale și macrofagele (Marias, 2019). S-a demonstrat că APOE este importantă pentru diverse procese, cum ar fi metabolismul lipoproteinelor, al vitaminelor liposolubile, metabolismul glucidic/energetic, precum și pentru transducția semnalelor, metastazare și angiogeneză. Fiind importantă în metabolismul lipidic, APOE este strâns legată de afecțiunile cardiovasculare, deoarece este necesară pentru catabolismul normal al componentelor lipoproteinelor bogate în trigliceride (Semaev et al., 2022). Importanța APOE în patogeneza tulburărilor neurodegenerative, ca demența frontotemporală, boala Parkinson, demența cu corpi Lewy și boala Alzheimer (AD) a fost bine documentată (Davis et al., 2020; Mishra et al., 2017).

Gena APOE are trei alele comune (ε2, ε3 și ε4) și șase genotipuri înrudite (ε3ε3, ε3ε2, ε2ε2, ε3ε4, ε4ε4, și ε2ε4) [Su et al., 2017]. Izoformele corespunzătoare sunt caracterizate de aminoacizi la pozițiile 112 și 158 și determină afinitatea pentru receptorii lipoproteici. APOE ε3 este cea mai frecventă alelă despre care se crede că nici nu mărește și nici nu scade riscul de a dezvolta AD. S-a demonstrat că APOE ε2 are un efect protector împotriva apariției AD (Ohm et al., 1999), în timp ce APOE ε4 a redus eliminarea beta-amiloidului (Aβ), ceea ce a dus la creșterea depunerii de Aβ în neuronii din modelul de șoarece AD (Yamazaki și colab., 2019). Aproximativ 25 la sută dintre oameni au o copie a APOE ε4 și 23 la sută au două copii (https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-genetics-fact-

sheet). Mayeux și colab., 1998 au studiat 2188 de pacienți cu AD și au arătat că, atunci când este combinată cu criteriile clinice, prezența genotipului APOE ε4 îmbunătățește specificitatea diagnosticării AD. Mai multe studii au evidențiat faptul că genotipul APOE ε4 este asociat cu apariția târzie a formelor familiare și sporadice de AD (Corder et al., 1993, Schmechel et al., 1993, Strittmatter et al., 1993, Farrer et al., 1997, Bu G., 2009).

Kitul de genotipare APO-Easy® utilizează tehnica de reacție cantativă în lanț a polimerazei în timp real (qPCR) pentru determinarea *in vitro* a mutației a două polimorfisme uninucleotidice (SNP-uri) APOE: rs429358 și rs7412. Acest test IVD utilizează sonde marcate fluorescent (FAM și VIC) care permit discriminarea alelică și determinarea genotipurilor APOE.

3. Principiul testului

Kitul de genotipare APO-Easy® include reactivii necesari pentru a efectua analiza qPCR pentru testarea ADN-ului genomic (ADNg) extras din specimenele de ADN PAXgene pentru a determina genotipurile APOE. Testul evaluează 2 SNP-uri (rs429358 și rs7412) în gena APOE și conține un control pozitiv pentru fiecare SNP (tip sălbatic, mutant și heterozigot). Genotipul este determinat pe baza statusului mutației pentru ambele mutații analizate, rezultând unul dintre cele șase genotipuri posibile (ε3ε3, ε3ε2, ε2ε2, ε3ε4, ε4ε4 și ε2ε4).

Pentru alela de tip sălbatic (ApoE3) sunt detectați aminoacizii cisteină la poziția 112 și arginină, la poziția 158. Mutația ApoE4 (SNP rs429358) afectează aminoacidul din poziția 112, rezultând în substituţia timinei cu citozina, inducând conversia argininei în loc de cisteină. În timp ce mutația ApoE2 (SNP rs7412) afectează aminoacidul din poziția 158, rezultând în schimbarea citozinei în timină, inducând conversia cisteinei în loc de arginină (figura 1).



Figura 1. Diagrama schematică a genei APOE umane și polimorfismele la 2 nucleotide unice care rezultă în 3 alele ε2, ε3 și ε4.

4. Instrumente și materiale

Kitul de genotipare APO-Easy® include consumabile pentru a efectua amplificarea qPCR și detectarea fluorogenă a mutațiilor APOE utilizând ThermoFisher QS5-Dx (echipamentul nu este furnizat cu kitul). Echipamentul necesar pentru analiză, dar care nu este furnizat cu kitul, precum și referințele acestuia sunt prezentate în tabelul 1.

Tabel 1. Referință privind echipamentul necesar pentru a efectua genotiparea cu kitul APO-Easy®

Instrument	Scop	Producător	Nr. de referință	Certificări
Nanodrop 2000/2000c	Cuantificarea ADN-ului genomic, ADNg	ThermoFisher	ND-2000	UL/CSA și CE
QS5-Dx	qPCR	ThermoFisher	A31928/A47324	FDA 510K (K190302)

Pentru extracția ADN-ului genomic, ADNg, din sângele integral din tuburile PAXgene DNA, Firalis recomandă utilizarea referinței indicate în tabelul 2, urmând instrucțiunile producătorului care au fost furnizate odată cu kitul.
Dacă se utilizează o altă referință, Firalis nu poate garanta rezultatele sau performanța testului. Probele trebuie colectate în tubul PAXgene® Blood DNA (BD Biosciences, nr.: 761165) în conformitate cu instrucțiunile de utilizare furnizate de producătorul tubului de colectare.

Tabel 2. Referință la kitul recomandat de extracție ADNg (nu este furnizat împreună cu kitul de genotipare APO-Easy®).

Descriere	Producător	Scop	Păstrare	Referință	Cantitate
Minikit QIAamp DSP DNA Blood	Qiagen	Extracție ADNg	În conformitate cu recomandarea furnizorului	61104	1kit/50specimene

4.1. Reactivi și materiale furnizate cu kitul

Kitul de genotipare APO-Easy® conține amestecuri master gata de utilizare pentru 32 de reacții per SNP, controale pozitive: Standard A, Standard B, Standard C, Standard D, Standard E și o fiolă pentru controlul fără șablon (NTC). Este posibil un total de 32 de reacții folosind reactivii dintr-un kit, inclusiv 6 reacții pentru standarde și 2 NTC-uri pentru fiecare SNP și pentru fiecare analiză (tabelul 3).

Tabel 3. Conținutul kitului de genotipare APO-Easy®.

Descriere	Păstrare	Referință	Cantitate (32 de reacții)
Genotipare TaqMan™ **Mix Master 1** rs429358	Între -15°C și -25°C	FLS-MM1OE-02	1 fiolă
Genotipare TaqMan™ **Mix Master 2** rs7412	Între -15°C și -25°C	FLS-MM2OE-02	1 fiolă
Control fără șablon (NTC)	Între -15°C și -25°C	FLS-NTC-01	1 fiolă
Standard A: mutant (MUT) rs7412	Între -15 și -25 °C	FLS-OE2S-01	1 fiolă
Standard B: tip sălbatic (WT) rs429358 și rs7412	Între -15 și -25 °C	FLS-OE3S-01	1 fiolă
Standard C: mutant (MUT) rs429358	Între -15 și -25 °C	FLS-OE4S-01	1 fiolă
Standard D: heterozigot (Het) rs7412	Între -15 și -25 °C	FLS-OE23S-01	1 fiolă

Standard E : heterozigot (Het) rs429358	Între -15 și -25 °C	FLS-OE34S-01	1 fiolă

*Controale pozitive: Standard A, Standard B, Standard C, Standard D, Standard E. Control negativ: NTC

4.2. Diverse materiale și echipamente necesare

- Apă fără nucleaze
- Utilizați numai vârfuri fără nucleaze și tuburi de microcentrifugare certificate
- Pipete de precizie - Pipete multicanal
- Dulap BSL2
- Microcentrifugă (forță centrifugă relativă 17000 (RCF))
- Vortex și microcentrifugă
- Plăci PCR în timp real
- Microcentrifugă compactă pentru plăci PCR

4.3. Cerințe privind depozitarea kitului și termenul de valabilitate al kitului

- Kitul trebuie depozitat la -20°C.
- Componentele kitului pot fi dezghețate și congelate în mod repetat de trei ori pentru a rămâne stabile. Depășirea ciclului de înghețare și dezghețare recomandat poate diminua funcționalitatea kitului.
- Kitul este stabil până la data de expirare indicată pe eticheta cutiei.

5. Extracția și cuantificarea ADN-ului genomic (ADNg)

5.1. Extracție

Extracția ADNg din sânge uman integral recoltat în tuburile PAXgene Blood DNA utilizând kitul QIAamp DSP DNA Blood Mini, așa cum se indică în tabelul 2, în conformitate cu fișa cu instrucțiuni pentru utilizator furnizată împreună cu kitul.

5.2. Cuantificare

Cuantificarea ADN-ului genomic (ADNg) extras se face cu ajutorul Nanodrop. Probele trebuie să aibă o concentrație minimă de 6,25 ng/µl și o concentrație maximă de 50 ng/µl. Dacă specimenele au o concentrație mai mare decât concentrația recomandată, acestea trebuie diluate în apă fără nucleaze (grad molecular). Dacă specimenele au o concentrație mai mică decât cantitatea necesară, se recomandă utilizarea a 2 µl în total. **Cantitatea de ADNg utilizată pentru testul de genotipare APO-Easy® este cuprinsă între 12,5 și 100 ng.**

6. Procedura de analiză a genotipării APO-Easy®

Prezentarea generală a fluxului de lucru al testului de genotipare APO-Easy este prezentată în tabelul 4. Timpul necesar pentru testare este de: 2h30.

Tabel 4. Prezentare generală a fluxului de lucru al testului de genotipare APO-Easy.

Flux de lucru	
Pasul 1	Pregătirea reacției PCR de genotipare în timp real
Pasul 2	Rulare qPCR
Pasul 3	Analiza rezultatelor
Pasul 4	Interpretare

6.1. Pasul 1 Pregătirea reacției PCR de genotipare în timp real

Kitul cuprinde două TaqMan™ Genotyping Master Mix gata de utilizare pentru a evalua SNP-urile APOE (rs429358 și rs7412), apă fără nucleaze pentru NTC și standarde pentru a imita condițiile de tip sălbatic, mutant și heterozigot pentru fiecare polimorfism uninucleotidic (SNP).

Fiecare amestec master este un test dualplex care evaluează SNP-ul de interes:

Mix Master 1: compus din 2 sonde pentru a evalua SNP rs429358 și a permite discriminarea alelică pentru nucleotida de tip sălbatic (T), nucleotida mutantă (C), precum și condiția de heterozigot.

Mix Master 2: compus din 2 sonde pentru a evalua SNP rs7412 și a permite discriminarea alelică pentru nucleotida de tip sălbatic (C), nucleotida mutantă (T), precum și condiția de heterozigot.

Standard A, B, C, D și E:
Fiecare standard (STD) este un șablon ADN conceput pentru a duplica cele trei alele și combinația de șabloane ADN diferite care mimează starea heterozigotă.

Standard A: şablon ADN al alelei ApoE2
Standard B: șablon ADN al alelei ApoE3
Standard C: șablon ADN al alelei ApoE4
Standard D: şablon ADN cu alela ApoE2 și ApoE3
Standard E: șablon ADN cu alela ApoE3 și ApoE4

Notă: Dezgheţați amestecurile master și standard și așezați-le pe gheață. Amestecaţi bine reactivii, efectuați o centrifugare rapidă și puneți-i la gheață.

1. Alicotați 23 µl/godeu de amestec master pentru testul de detecție într-o placă cu 96 de godeuri (pentru fiecare specimen trebuie adăugat master corespunzător ambelor SNP-uri).
2. Adăugați 2 µl de ADN genomic sau de standard în godeurile corespunzătoare și efectuați o centrifugare rapidă. Cantitatea totală de ADNg dintr-o reacție trebuie să fie cuprinsă între 12,5 și 100 ng.

   - Fiecare SNP individual **necesită analiza standardelor WT, MUT și HET** , precum și **NTC** (grad molecular al apei fără nucleaze). În tabelul 5 este prezentat un model de plan pentru analiza a până la 24 de specimene de ADN PAXgene măsurate pentru 2 SNP-uri într-o placă PCR cu 96 de godeuri.

- Notă: kitul de genotipare APO-Easy permite efectuarea a până la 32 de reacții qPCR. Fiecare amestec master este pentru 8 STD-uri și până la 24 de specimene. Dacă trebuie evaluat un număr mai mic de specimene, kitul poate fi utilizat de două ori, de exemplu, se pot evalua o dată 8 STD-uri plus 8 pacienți, iar a doua oară, se pot evalua încă o dată 8 STD-uri plus 8 pacienți.

Tabel 5. Modelul unei plăci cu 96 de godeuri pentru genotiparea APOE a 24 de specimene, 3 controale/SNP în duplicat și 2 NTC/SNP pentru kitul de genotipare 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	Specimenul #1	Specimenul #9	Specimenul #17			STD B: WT	Specimenul #1	Specimenul #9	Specimenul #17		
B	STD B: WT	Specimenul #2	Specimenul #10	Specimenul #18			STD B: WT	Specimenul #2	Specimenul #10	Specimenul #18		
C	STD C: MUT	Specimenul #3	Specimenul #11	Specimenul #19			STD A: MUT	Specimenul #3	Specimenul #11	Specimenul #19		
D	STD C: MUT	Specimenul #4	Specimenul #12	Specimenul #20			STD A: MUT	Specimenul #4	Specimenul #12	Specimenul #20		
E	STD E: HET	Specimenul #5	Specimenul #13	Specimenul #21			STD D: HET	Specimenul #5	Specimenul #13	Specimenul #21		
F	STD E: HET	Specimenul #6	Specimenul #14	Specimenul #22			STD D: HET	Specimenul #6	Specimenul #14	Specimenul #22		
G	NTC	Specimenul #7	Specimenul #15	Specimenul #23			NTC	Specimenul #7	Specimenul #15	Specimenul #23		
H	NTC	Specimenul #8	Specimenul #16	Specimenul #24			NTC	Specimenul #8	Specimenul #16	Specimenul #24		

- Următorul STD trebuie utilizat pentru fiecare determinare a analizei SNP, așa cum se indică mai jos. Pentru rs429358 (amestec Master 1), trebuie utilizate standardele B, C și E, iar pentru evaluarea rs7412 (amestec Master 2) trebuie utilizate standardele B, A și D (tabelul 6).

Tabel 6. Corespondență standard pentru determinarea SNP a testului de genotipare 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. Agitați placa timp de 5 secunde și efectuați o centrifugare la 500 g timp de 30 de secunde.
4. Procedați la **începerea imediată a execuției**.

6.2. Pasul 2. Executarea qPCR

5. Setarea QS5 Dx pentru testul de genotipare APO-Easy:

A. La pagina "Properties" (Proprietăți), atribuiți numele experimentului și selectați tipul de experiment ca **genotipare** (figura 2).

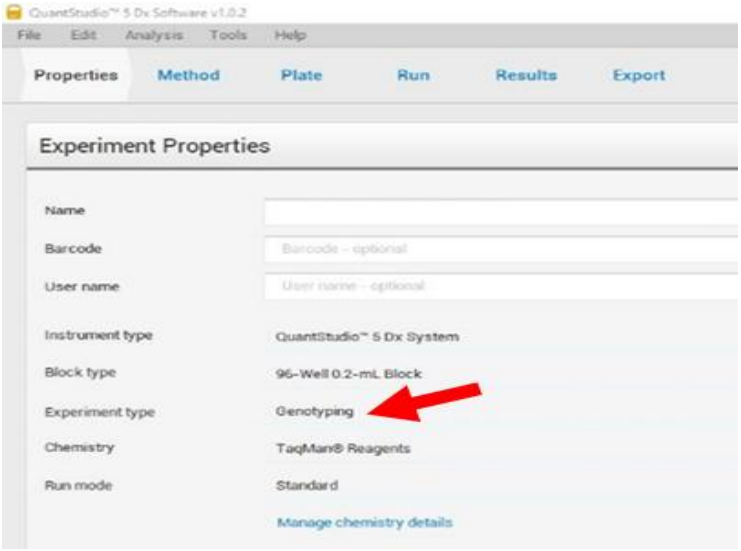

Figura 2. Selectarea tipului de experiment în proprietățile experimentului în software-ul QS5. Asigurați-vă că selectați genotiparea (săgeata roșie).

B. Pe pagina "Method", se stabilește volumul total al reacției PCR, **25 µl** de amestec de reacție.

C. La "Fișa plăcii", accesați Configurare avansată, pentru a configura fluorescența, faceți clic pe "(+) Butonul de adăugare" pentru a obține **două teste SNP** (SNP Assay 1 & SNP Assay 2). Faceți clic pe butonul OK pentru a continua. Apoi, pentru fiecare SNP Assay, faceți clic pe butonul "Action" (Acțiune) și selectați "Edit" (Editare) pentru a completa numele așa cum urmează (Figura 3):

NOTĂ: Pentru **SNP Assay 1: rs429358** (amestec master 1). Asigurați-vă că **alela 1** este setată cu reporterul **VIC** și **alela 2** este setată cu reporterul **FAM**

Pentru **SNP Assay 2: rs7412** (Master 2). Asigurați-vă că **alela 1** este setată cu reporterul **VIC** și **alela 2** este setată cu reporterul **FAM**

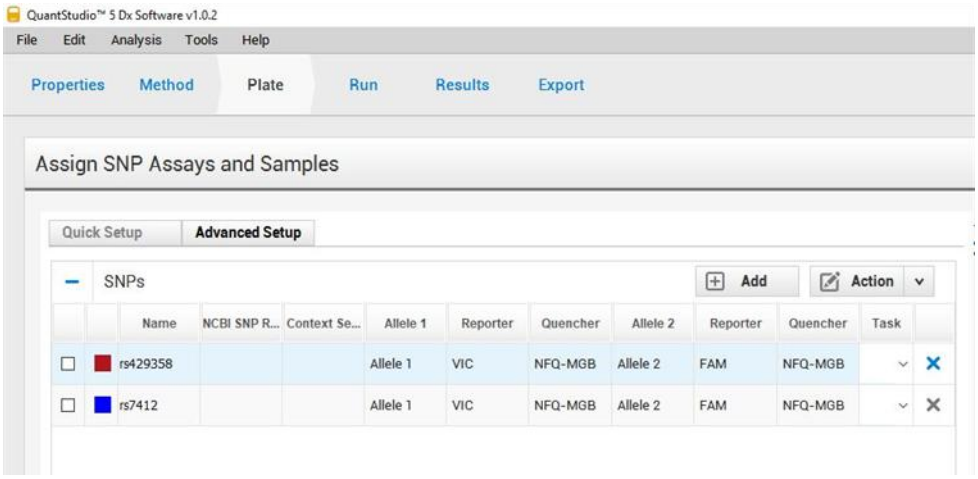

Figura 3. Configurarea SNP pentru kitul de genotipare APO-Easy, pe software-ul QS5.

6. Pentru a defini standardele pentru rs429358 (Master 1), selectați coloana 1 în designul plăcii și selectați SNP Assay1 (rs429358). După aceea, selectați A1 și B1 ("STD B (WT)") și atribuiți 2/2

în bara de activități. Selectați C1 și D1 ("STD C (MUT)") și atribuiți 1/1 în bara de activități. Selectați E1 și F1 ("STD E (HET)") și atribuiți 1/2 în bara de activități. Selectați G1 și H1 și atribuiți N în bara de activități "NTC".

7. Pentru a defini standardele pentru rs7412 (Master 2), selectați coloana 7 în designul plăcii și selectați SNP Assay2 (rs7412). După aceea, selectați A7 și B7 ("STD B (WT)") și atribuiți 1/1 în bara de activități. Selectați C7 și D7 ("STD A (MUT)") și atribuiți 2/2 în bara de activități. Selectați E7 și F7 ("STD D(HET)") și atribuiți 1/2 în bara de activități. Selectați G7 și H7 și atribuiți N în bara de activități "NTC".
8. Pentru a defini specimene pentru rs429358 (amestec Master 1), selectați coloanele de la 2 până la 4 în designul plăcii și selectați SNP Assay1 (rs429358).
9. Pentru a defini specimene pentru rs7412 (amestec Master 2), selectați coloanele de la 8 până la 10 în designul plăcii și selectați SNP Assay2 (rs7412).
10. În momentul în care placa este gata și s-a încheiat configurarea, accesați "Run" (Executare) și începeți executarea.
11. Programul de execuție qPCR va fi selectat automat de QS5-Dx și specificațiile programului trebuie să fie cele indicate în Tabelul 7 :

Tabel 7. Programul de execuție qPCR în dispozitivul QS5.

Program	Temperatură °C	Timp	Cicluri:
Activare	95	10 min	
Denaturare	95	15 sec	40
Extensie	60	1 min	

6.3. Pasul 3 Analiza rezultatelor

Înainte de analiza rezultatelor specimenului, verificați semnalul obținut pentru STD cu testul de detecție respectiv în modul de discriminare alelică. Rezultatele execuției qPCR pot fi găsite pe pagina de rezultate a software-ului QS5 Dx (Figura 4). Pe această pagină selectați Discriminare alelică (săgeata roșie). Validitatea analizei trebuie evaluată pentru fiecare mutație în parte. Selectarea rs429358 sau rs7412 se poate face prin clic pe pictograma evidențiată de săgeata verde.

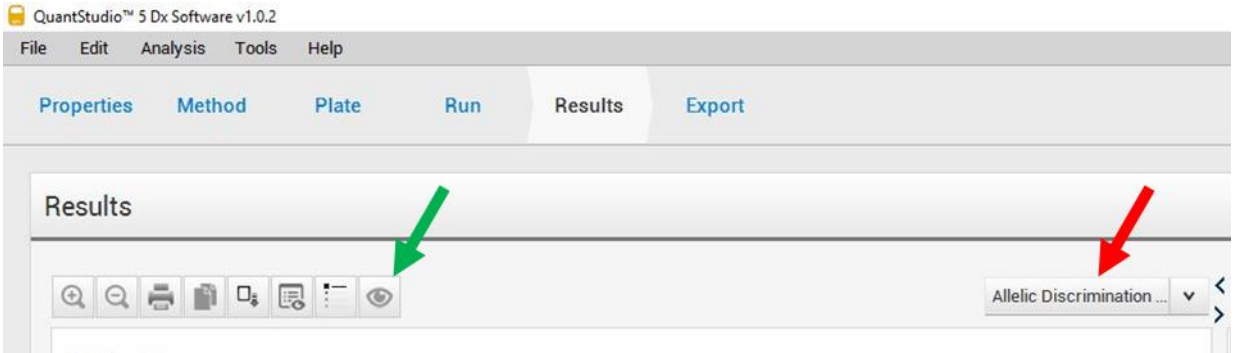

Figura 4. Pagina cu rezultatele execuției qPCR pe software-ul QS5. Săgeata roșie indică tipul de rezultat care trebuie selectat (Discriminare alelică) și săgeata verde indică pictograma pentru selectarea SNP-urilor.

Pentru STD și NTC, analiza poate continua atunci când semnalele STD corespund exemplului indicat în continuare. Asigurați-vă că standardele dvs. au un model similar celui prezentat în figura 3. Pentru rs429358, tipul sălbatic (WT) va avea semnalul în regiunea din stânga de sus a graficului, pe axa y (alela 2), corespunzând alelei homozigote2/alelei2 (e3). Standardul mutant (MUT) va avea un semnal aproape de axa x (alela 1) în zona din dreapta de jos a graficului corespunzător alelei1/alelei1 (e4). Standardul heterozigot va fi între MUT și WT, corespunzând alelei heterozigote1/alelei2 (e3/e4), așa cum se indică în **Figura 5**. NTC nu va genera niciun semnal și va fi găsit în partea stângă de jos a graficului.

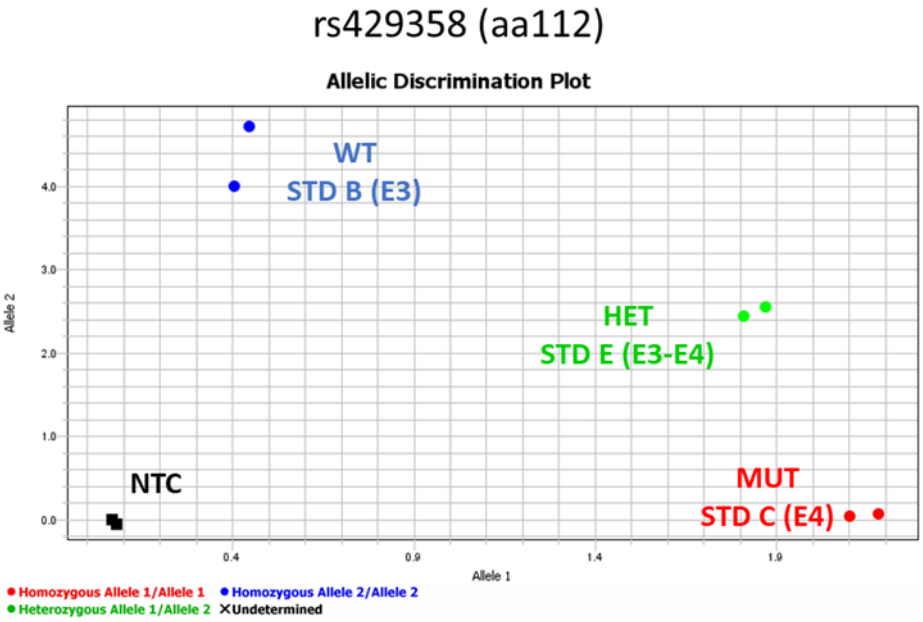

Figura 5. Modelul semnalelor standardelor pentru SNP rs429358 (amestec Master 1) după analiza qPCR.

Pentru rs7412, tipul sălbatic (WT) va avea semnalul din dreapta de jos, aproape de regiunea axei x a graficului, corespunzător alelei homozigote1/alelei1 (e3). Standardul mutant (MUT) va avea un semnal în zona din stânga de sus a axei y a graficului corespunzător alelei2/alelei2 (e2). Standardul heterozigot va fi între MUT și WT, corespunzând alelei heterozigote1/alelei2 (e2/e3), așa cum se indică în **Figura 6**. NTC nu va genera niciun semnal și va fi găsit în partea stângă de jos a graficului.

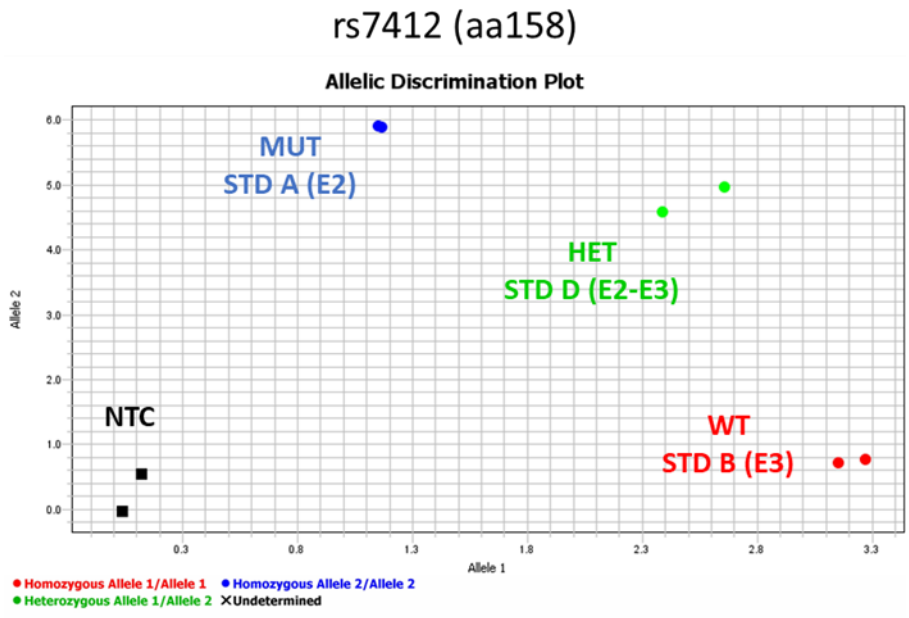

Figura 6. Modelul semnalelor standardelor pentru SNP rs7412 (amestec Master 2) după analiza qPCR.

6.4. Pasul 4 Interpretare

Odată ce controalele sunt validate, semnalele specimenelor se interpretează prin clic pe pictograma evidențiată de săgeata roșie. Pentru fiecare SNP, starea pacientului este disponibilă în coloana "Call" (săgeată verde; figura 7).

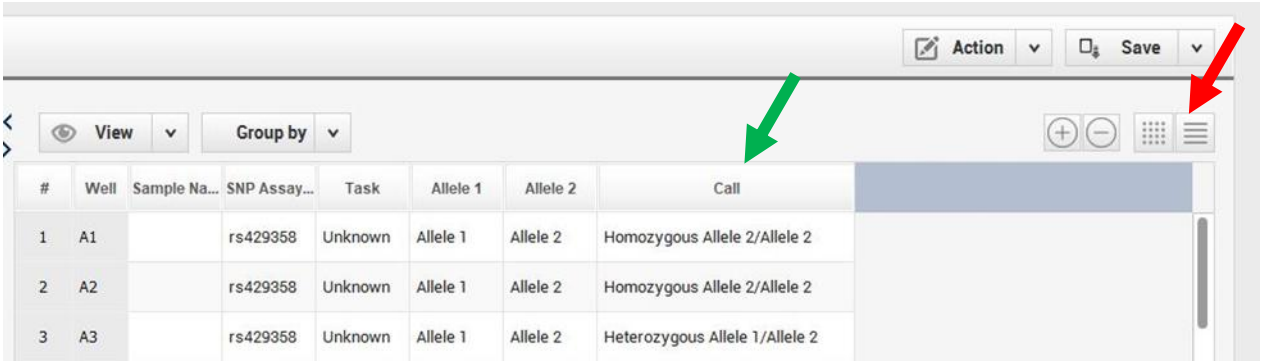

Figura 7. Interpretarea rezultatelor pe software-ul QS5. Săgeata roșie indică pictograma care interpretează semnalul și săgeata verde indică starea pacientului pentru fiecare SNP determinat de software după analiza rezultatelor.

Pentru rs429358, alela 2 homozigotă / alela 2 corespunde WT, alela 1 homozigotă / alela 1 corespunde MUT și alela 1 heterozigotă / alela 2 corespunde HET.

Pentru rs7412, alela homozigotă 1 / alela 1 corespunde WT, alela homozigotă 2 / alela 2 corespunde MUT și alela heterozigotă 1 / alela 2 corespunde HET.

După atribuirea statusului pentru fiecare SNP, genotipul specimenului poate fi determinat utilizând tabelul 8 de mai jos.

Tabel 8. Interpretarea genotipului din rezultatele SNPs rs429358 și rs7412.

rs429358	rs7412	Genotip
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. Depanare

- Evaluarea rezultatelor testului trebuie efectuată după ce au fost examinate controalele pozitive și negative și au fost considerate valide și acceptabile. În cazul în care controalele nu sunt valide, rezultatele specimenului nu pot fi interpretate.
- Dacă are loc un eșec al analizei:
  - Verificați datele de expirare ale reactivilor individuali și asigurați-vă că toți reactivii au fost depozitați conform indicațiilor de pe eticheta produsului. Dacă nu s-au respectat întocmai condițiile de depozitare, rezultatele nu sunt fiabile și kitul nu mai poate fi utilizat.
  - Asigurați-vă că pipetele utilizate sunt calibrate la zi.
  - Asigurați-vă că setările ciclatorului sunt conforme cu instrucțiunile de utilizare.

În Tabelul 9 de mai jos sunt prezentate posibilele motive și acțiuni corective pentru unele dintre constatările din timpul testului.

Tabel 9. Recomandări pentru depanarea kitului de genotipare APO-Easy.

Constatări	Motive posibile și acțiuni corective
Nu există apeluri în toate canalele pentru un specimen	Posibilitate: probleme cu calitatea ADN-ului genomic, ADNg sau substanțele de interferență Recomandare: extrageți din nou specimenul și refaceți qPCR.
Nu există semnal pe unul sau două canale	Posibilitate: dacă este vorba de un singur specimen, refaceți qPCR; dacă este vorba de toate specimenele, atunci verificați data de expirare a kitului și condițiile de depozitare.
Genotip nedeterminat pentru un SNP	Posibilitate: aportul de ADNg nu a fost suficient. Recomandare: Refaceți testul. În timpul aceluiași test, pentru același specimen, utilizați 2 µl din specimenul de ADNg cu 23 µl de amestec master și 4 µl din specimenul de ADNg cu 21 µl de amestec master.
După retestare, genotipul este încă nedeterminat	Posibilitate: prezența unei substanțe de interferență în specimen.

	Recomandare: - Adăugarea de K2EDTA în tubul PAXgene DNA ar putea interfera cu genotiparea specimenului și de aceea vă rugăm să verificați dacă EDTA a fost adăugat în tub sau dacă volumul specimenului de sânge a fost colectat corect, în conformitate cu instrucțiunile de utilizare ale producătorului. - Trigliceridele din sânge nu trebuie să depășească concentrația fiziologică (concentrație normală în sânge: 0,5 - 1,5 g/l). Dacă este prezent un exces de trigliceride în proba de sânge, acesta ar putea interfera cu genotiparea corectă a pacientului. - Albumina nu trebuie să depășească concentrația fiziologică (concentrație normală în sânge: 35 - 50 g/l). Dacă prezența albuminei în specimenul de sânge al pacientului depășește această concentrație, aceasta ar putea interfera cu rezultatele genotipării. Dacă problema persistă, contactați Departamentul de asistență tehnică.
Controalele nu au semnal	Confirmați că au fost respectate condițiile de depozitare și instrucțiunile date. Este posibil să fi apărut o problemă de pipetare. Recomandare: Refaceți testul. Dacă tot nu aveți semnal, contactați Departamentul de asistență tehnică.
Semnal în NTC	Posibilitate: cel mai probabil, amestecul de reacție a fost contaminat cu un șablon. Recomandare: Refaceți qPCR. Dacă problema persistă, nu mai utilizați kitul și contactați Departamentul de asistență tehnică.

8. Parametri analitici

Precizie: kitul de genotipare APO-Easy® are o precizie de 100% la detectarea genotipurilor APOE în comparație cu metodele de referință (secvențiere bidirecțională Sanger și secvențiere de nouă generație).

Sensibilitate: testul de genotipare APO-Easy® detectează 12,5 ng de ADNg uman atunci când este utilizat cu sistemul QuantStudio 5 Dx Real-Time PCR.

Precizie : kitul de genotipare APO-Easy® este reproductibil, cu rezultate pozitive de 100% atunci când se testează loturi diferite sau când este utilizat de operatori diferiți.

Interferențe: un exces de etanol până la 20%, un exces de bilirubină până la 200 mg/ml, un exces de K2EDTA până la 20 mg/ml, un exces de albumină până la 25 g/l, un exces de hemoglobină până la 100 g/l sau un exces de trigliceride până la 18,2 g/l în specimen **nu interferează** cu rezultatele genotipării.

9. Performanță clinică

Kitul de genotipare APO-Easy corespunde utilizării prevăzute, deoarece are un procent de concordanță pozitivă de 100% atunci când rezultatele sunt comparate cu secvențierea bidirecțională Sanger și cu secvențierea direcționată de nouă generație.

Tabelul 10. Testul de genotipare APO-Easy are o acuratețe de 100%

Genotipul APOE	APO-Easy®	Targeted NGS*	Apeluri de genotip corecte	Acuratețe	Secvențiere Sanger	Apeluri de genotip corecte	Acuratețe
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

*Targeted NGS: Secvențierea de nouă generație (NGS) direcționată

Atunci când frecvențele genotipului APOE ale subiecților cu boala Alzheimer au fost comparate cu cele ale subiecților fără boala Alzheimer și ale subiecților sănătoși combinați, prezența a două copii ale alelei ε4 (homozigot e4/e4) a crescut riscul de AD de 48,56 ori comparativ cu e2/e3. Prezența unei copii a alelei ε4 a crescut riscul de AD de 9,54 ori și de 5,78 ori pentru heterozigoții e3/e4 și, respectiv, heterozigoții e2/e4 comparativ cu e2/e3.

Tabelul 11. Comparații bazate pe genotip între AD și NAD + HC

	Grup			
Genotip	**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 (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. Riscuri reziduale și avertismente

Caracteristicile de proiectare și de performanță ale kitului de genotipare APO-Easy® au fost optimizate prin teste interne cuprinzătoare și prin accesul utilizatorilor preconizați, așa cum s-a verificat la testarea populațiilor reprezentative pentru populația de pacienți preconizată. Firalis, societatea producătoare, consideră că riscurile reziduale pentru utilizatori și pacienți sunt minime și acceptabile pentru testarea genetică.

- Rezultatele negative nu exclud riscurile pentru sănătate și nu ar trebui utilizate ca bază unică pentru deciziile privind managementul pacienților.
- Rezultatele negative și pozitive trebuie combinate cu observațiile clinice, istoricul pacientului și alte informații de testare.

Riscurile utilizării kitului de genotipare APO-Easy sunt minime dacă testul este utilizat conform scopului prevăzut. Utilizatorii pot reduce în continuare riscul urmând recomandările de mai jos:

Contaminarea specimenelor: contaminarea specimenelor cu ADN străin sau interferenți posibili poate duce la rezultate inexacte. Utilizarea spațiilor de lucru curate, a mănușilor de unică folosință și a echipamentelor special concepute pentru pregătirea specimenelor va reduce acest risc rezidual.

Contaminare încrucișată: manipularea necorespunzătoare a reactivilor sau a specimenelor ar putea duce la contaminarea încrucișată a specimenelor, ducând la rezultate eronate. Mențineți zone de lucru separate pentru pregătirea specimenelor, extracția ADN-ului și configurarea PCR și lucrați într-un mediu curat atunci când manipulați pipetele și alte echipamente, pentru a preveni contaminarea încrucișată.

Citirea rezultatelor: utilizatorii neexperimentați pot interpreta greșit rezultatele, ceea ce duce la concluzii incorecte. Interpretarea testului de genotipare APO-Easy trebuie să fie efectuată de personal foarte bine pregătit pentru a reduce la minimum orice risc de determinare incorectă a rezultatelor.

Formare profesională necorespunzătoare: utilizatorii cu formare profesională sau experiență insuficiente pot fi mai predispuși la erori în configurarea sau interpretarea testelor. Recomandăm utilizarea testului APO-Easy numai de către personalul cu înaltă calificare.

11. Limitări ale procedurii

- Reactivii nu sunt destinați utilizării în proceduri terapeutice.
- Nu este o metodă automată și nu este un dispozitiv de autotestare.
- Acest test este conceput pentru a detecta genotipul APOE din tuburile de ADN uman PAXgene, în intervalul de detecție al testului.
- Rezultatele obținute din acest test trebuie interpretate în contextul tuturor rezultatelor clinice de laborator relevante și nu trebuie utilizate singure pentru niciun diagnostic.
- Contaminarea materialelor genomice din surse externe trebuie evitată prin manipularea atentă a specimenelor, a reactivilor kitului și prin utilizareau unui mediu de lucru curat.
- Operatorii trebuie să evite contaminanții microbieni în timpul procedurilor și nu trebuie să utilizeze componentele kitului dacă se observă dovezi de proliferare microbiană.
- Acest kit este destinat utilizării cu sistemul QS5-Dx Real-Time PCR (ThermoFisher).
- Pentru a obține rezultate optime, este esențială respectarea strictă a recomandărilor prezentate în instrucțiunile de utilizare pentru kitul de testare.
- Trebuie acordată atenție datelor de expirare și condițiilor de depozitare pentru fiecare cutie din kit. A nu se utiliza dacă a expirat sau dacă a fost depozitat incorect.
- Nu amestecați sau nu înlocuiți reactivii cu cei din alte loturi sau surse.
- Utilizați numai vârfuri fără nucleaze și tuburi de microcentrifugare certificate.
- Folosiți apă fără nucleaze, păstrată în recipiente curate.
- Orice variație în procesul descris în instrucțiunile de utilizare poate cauza variații ale rezultatului.
- Genotiparea APO-Easy® nu este destinată să estimeze sau să detecteze răspunsul la tratament sau să ajute la selectarea tratamentului optim pentru pacienți.

12. Orientări privind securitatea chimică

Pentru a minimiza pericolele reprezentate de substanțele chimice:

- Citiți și înțelegeți fișele cu date de securitate (FDS) furnizate de producătorul substanțelor chimice înainte de a depozita, manipula sau lucra cu orice substanță chimică sau material periculos.
- Evitați contactul direct cu substanțele chimice.
- Purtați echipament individual de protecție adecvat atunci când manipulați substanțe chimice, cum ar fi ochelari de protecție, mănuși și îmbrăcăminte de protecție.
- Evitați inhalarea substanțelor chimice. Nu fumați și nu lăsați recipientele cu substanțe chimice deschise. A se utiliza numai cu o ventilație adecvată sau cu o hotă de tiraj.
- Pentru orientări suplimentare privind siguranța, consultați FDS.
- Verificați periodic dacă există scurgeri sau deversări de substanțe chimice. Dacă apare o scurgere sau o deversare, urmați procedurile de curățare ale producătorului, conform recomandărilor din FDS.
- Respectați toate legile și reglementările locale, de stat/provincie sau naționale referitoare la depozitarea, manipularea și eliminarea substanțelor chimice.

13. Recomandări tehnice

- Pentru asistență tehnică legată de extracția ADN-ului, consultați fișa tehnică furnizată împreună cu minikitul de ADN din sânge QIAamp DSP recomandat (ref: 61104) de Qiagen.
- Evitați orice contaminare între specimene și reactivi. În acest scop, schimbați vârfurile la fiecare etapă. Contaminarea bacteriană sau fungică a oricăror reactivi poate cauza rezultate eronate.
- Aruncați materialele consumabile și conținutul neutilizat în containere adecvate.
- Procedura este adecvată numai pentru utilizarea cu sânge integral din tuburile PAXgene DNA.

14. Responsabilitate

- Acest kit este destinat numai determinării *in vitro* a genotipului APOE din sânge uman integral din tuburile PAXgene DNA.
- Acest kit este destinat utilizării numai de către personal calificat.
- Compania Firalis nu poate fi făcută răspunzătoare pentru nicio deteriorare sau pierdere cauzată de utilizarea kitului în alt mod decât cel menționat în mod expres în aceste instrucțiuni.
- Compania Firalis nu este răspunzătoare pentru nicio încălcare a brevetelor care ar putea rezulta din utilizarea sau derivarea acestui produs.

Asistența tehnică

Pentru a beneficia de asistență tehnică, apelați Serviciul tehnic Firalis SA la +33-389 911 320 sau vizitați site-ul Firalis SA la adresa http://www.firalis.com sau contactați “contact@firalis.com”.

Notă de raportare a incidentelor grave

Un incident grav este cauza oricărei disfuncționalități sau afectări negative a caracteristicilor sau performanței unui dispozitiv și poate fi clasificat în cel puțin una dintre următoarele consecințe:

- Decesul unui pacient, utilizator sau unei alte persoane
- O deteriorare gravă, temporară sau permanentă, a stării de sănătate a unui pacient, a unui utilizator sau a unei alte persoane
- O amenințare gravă la adresa sănătății publice.

În caz de incertitudini, utilizatorii trebuie să raporteze întotdeauna.

Dacă ajungeți la concluzia că este vorba despre un incident care trebuie raportat, vă rugăm să contactați producătorul la clinical@firalis.com. De asemenea, puteți găsi informațiile de contact ale

autorității competente din țara dumneavoastră aici: https://health.ec.europa.eu/medical-devices-sector/new-regulations/contacts_en.

Atunci când raportați un incident grav, vă rugăm să compilați următoarele informații:

- Denumirea comercială a dispozitivului (TM pentru marcă comercială, © pentru drepturi de autor)
- Numele și adresa producătorului
- Numărul lotului
- Număr de serie
- Cod UDI (identificare unică a dispozitivului)
- O descriere exactă și concisă a incidentului grav și a consecințelor grave sau posibil grave pentru pacient, utilizator sau o parte terță.

Dispozitivul vizat nu trebuie eliminat ca deșeu, ci trebuie pus la dispoziția producătorului pentru analize suplimentare pentru determinarea cauzelor incidentului. Puteți adăuga cererea dvs. de returnare atunci când contactați producătorul pentru a raporta incidentul.

Rezumatul caracteristicilor de siguranță și performanță

Rezumatul privind siguranța și performanța kitului de genotipare APO-Easy® a fost validat de organismul notificat 2797 (grupul BSI) și este disponibil publicului pe site-ul web al Bazei europene de date referitoare la dispozitivele medicale (Eudamed) prin utilizarea numărului UDI-DI al kitului de genotipare APO-Easy® în baza de date. Acest identificator este disponibil cu ajutorul codului QR plasat pe eticheta ambalajului kitului.

Rezumatul privind siguranța și performanța va fi actualizat periodic cu orice informații relevante referitoare la kitul de genotipare APO-Easy®.

Referințe

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 simbolurilor utilizate în instrucțiunile de utilizare și pe etichetele kitului

	Dispozitiv de diagnosticare *in vitro*		Dispozitiv medical nesteril
	Număr de catalog		A nu se utiliza dacă ambalajul este deteriorat
	Codul lotului		Conformitate europeană evaluată de GMED
	Limitări de temperatură		Avertisment
	Termen de valabilitate		Conține suficient pentru < n > teste
	Data fabricației		Toxic sau foarte toxic
	Producător		Consultați instrucțiunile de utilizare
	Risc biologic		A nu se reutiliza

Reprezentanți autorizați

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

Nume: Pathaway Services Ltd

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

Telefon: +44 (0) 1536 647 537

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

Nume: MedEnvoy Switzerland

Adresă: Gotthardstrasse 28, 6302 Zug, Switzerland

Telefon: +41 41 562 01 42

Vă mulțumim că ați ales Firalis

Pentru orice informații suplimentare, MSDS (*Material Safety Data Sheet*) sau solicitări de instrucțiuni în alte limbi, vă rugăm să ne scrieți:

contact@firalis.com