

CONTENIDO

- e4Risk® R1. 1 x 10 mL**
- e4Risk® R2. 1 x 10 mL**
- e4Risk® Calibrator 1 x 0.5 mL**
- e4Risk® Positive control 1 x 0.5 mL**
- e4Risk® Negative control 1 x 0.5 mL**

**Turbidimetría en látex
Solo para diagnóstico in vitro**



INTRODUCCIÓN

e4Risk® es una prueba turbidimétrica basada en el principio de aglutinación del látex para la determinación cuantitativa in vitro de la isoforma E4 de la apolipoproteína E (ApoE4) en muestras de plasma humano. La prueba consta de un reactivo con partículas de látex y de otro reactivo con un anticuerpo monoclonal anti-ApoE4, que induce la aglutinación de las partículas de látex cuando ApoE4 está presente en la muestra de plasma. Esta aglutinación se puede medir con un fotómetro. El grado de turbidez es proporcional a la concentración de ApoE4 en la muestra.

COMPOSICION DE REACTIVOS

e4Risk® R1. Ref: 3135050. Anticuerpo anti-apoE4 en un tampón Bis-Tris, BSA ≤0.5%, NaN3 <0.1%.

e4Risk® R2. Ref: 3135056 Partículas de látex, en un tampón Tris, NaN3 <0,1%.

e4Risk® Calibrator. Ref: 3935006. 1 x 0,5 mL de ApoE4 humana recombinante en plasma humano. La concentración de ApoE4 se indica en el vial.

e4Risk® Positive control. Ref: 3935011. 1 x 0,5 mL. Mezcla de plasma humano de portadores *APOE ε4* y no portadores *APOE ε4*.

e4Risk® Negative control. Ref: 3935012. 1 x 0,5 mL. Mezcla de plasma humano de portadores *APOE ε4* y no portadores *APOE ε4*.

Precauciones:

Los reactivos contienen azida sódica <0,1%. Evite el contacto con la piel o las mucosas.

El calibrador y los controles contienen plasma humano. El material debe ser tratado como potencialmente infeccioso.

PREPARACION DE REACTIVOS

e4Risk® R1. Listo para usar.

e4Risk® R2. Listo para usar. Mezclar suavemente el vial antes de usar evitando la formación de espuma.

e4Risk® Calibrator. Liofilizado. Reconstituir con 0,5 mL agua destilada.

e4Risk® Positive control. Liofilizado. Reconstituir con 0,5 mL agua destilada.

e4Risk® Negative control. Liofilizado. Reconstituir con 0,5 mL agua destilada.

Curva de calibración (2 puntos): la curva del calibrador se preparará con el calibrador y agua purificada: Prepare un tubo con agua destilada (calibrador 0 µg / L). Resuspender el tubo CAL justo antes de usarlo. Deje que el tubo CAL alcance la temperatura ambiente 10 minutos antes de resuspenderlo con 0,5

mL de agua destilada. Espere 15 minutos a que se disuelva y mezcle suavemente durante 15 minutos con un agitador de rodillo sin crear burbujas.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Los reactivos sin abrir permanecerán estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta solo cuando se almacenen bien cerrados a 2-8°C y se eviten las contaminaciones durante su uso.
2. Los R1 y R2 permanecerán estables una vez abiertos por lo menos durante 2 meses cuando se almacenen bien cerrados a 2-8°C. No deje los reactivos abiertos durante un período prolongado. La evaporación puede causar la concentración del R1, lo que puede afectar a las mediciones. El calibrador reconstituido y los controles son estables después de la reconstitución durante 1 y 7 días respectivamente, a 2-8°C. El calibrador y los controles resuspendidos no se deben congelar y reutilizar.
3. No intercambie reactivos de diferentes lotes. No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad.
4. Deterioro del reactivo: presencia de partículas y turbidez.

MUESTRA

e4Risk® está diseñado para muestras de plasma humano. Otras matrices como el suero o la sangre no han sido probadas. Para la recolección de plasma, utilice técnicas de venopunción estándar en tubos EDTA. Otros anticoagulantes no se han probado y pueden interferir con los resultados. Centrifugar la sangre a 2280 rcf durante 10 min a 2-8°C y separar el plasma lo antes posible después de la extracción.

El plasma aislado es estable al menos durante 24 horas si se mantiene a temperatura ambiente (20-25°C) y hasta 7 días si se almacena a 2-8°C. Las muestras de plasma se pueden congelar y mantener a -80 ± 10°C durante al menos 3 meses. El resultado no varía después de 2 ciclos de congelación / descongelación. Las muestras de plasma congelado también se pueden almacenar a -20 ± 5°C durante al menos 3 meses y el resultado no varía después de 1 ciclo de congelación / descongelación.

MATERIALES REQUERIDOS

- Espectrofotómetro o fotómetro termoestable a 37°C con un filtro de 546 nm.

PROCEDIMIENTO

Procesamiento de la muestra:

Mantener la muestra de plasma a 2-8°C hasta su procesado.

Preparación de controles:

Resuspender los controles justo antes de usarlos. Deje que los tubos C+ y C- alcancen la temperatura ambiente durante 10 minutos antes de resuspender con 0,5 ml de agua purificada. Espere 15 minutos hasta que se disuelva y mezcle suavemente durante 15 minutos con un agitador de rodillo sin crear burbujas.

Procedimiento analítico

1. Usar agua destilada como blanco realizando la lectura a 546nm
2. Pipetear en la cubeta:

R1	550 µL
Muestra / Calibrador / Controles / Agua (blanco)(*)	25 µL
R2	550 µL

(*). Cantidad mínima 5 µL. Respetar proporciones de muestra/calibrador/controles/blanco vs R1 y R2.

3. Mezcle bien y lea la absorbancia inmediatamente (A1).
4. Incubar a 37°C durante 5 minutos y leer la absorbancia (A2).
5. Realizar calculos.

Cálculo

Calcule la diferencia de absorbancia (A₂-A₁) de cada punto de la curva de calibración y represente los valores obtenidos frente a la concentración de ApoE4 de ambos puntos de calibración. La concentración de ApoE4 en la muestra se calcula por interpolación de su valor (A₂-A₁) en la curva de calibración.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar los controles de e4Risk® para controlar el rendimiento de los procedimientos de ensayo manuales y automatizados. Se recomienda utilizar controles positivos y negativos (Ref: 3935011 y 3935012 respectivamente).

Cada laboratorio debe establecer su propio esquema de control de calidad y se deben aplicar medidas correctivas si los controles no cumplen con las tolerancias aceptables. Los valores de concentración de los controles de e4Risk® pueden variar en función de los analizadores y del lote de producción. Los siguientes rangos de concentración se consideran válidos:

- Control positivo e4Risk®: 6-14 µg/mL
- Control negativo e4Risk®: 0-3 µg/mL

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Biocross recomienda un punto corte de 4,10 µg/mL. Si bien el análisis es cuantitativo (medido en µg/mL), los resultados deben expresarse cualitativamente (portador de APOE ε4 / no portador de APOE ε4). Por lo tanto, se considera que las muestras con una concentración por encima del valor de corte provienen de portadores de APOE ε4 (pacientes con al menos un alelo ε4 del gen APOE), mientras que las muestras con una concentración por debajo del valor de corte se consideran procedentes de no portadores de APOE ε4 (pacientes sin copias del alelo ε4 del gen APOE).

RELEVANCIA CLÍNICA

e4Risk® es una prueba inmunturbidimétrica para identificar a individuos portadores de APOE ε4 en muestras de plasma humano.

Actualmente, la presencia de uno o dos alelos ε4 del gen APOE es el único biomarcador y factor de riesgo contrastado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer (EA) esporádica^{1,2}. APOE ε4 está presente en aproximadamente el 20% de la población mundial y en el 40-60% de todos los pacientes con EA esporádica^{3,4}. La presencia de un alelo ε4 del gen APOE aumenta el riesgo de padecer EA entre 3 y 5 veces, mientras que la presencia en homocigosis aumenta el riesgo entre 12-15 veces⁵. Además, la EA se manifiesta antes y progresa más rápidamente en portadores de APOE ε4 que en no portadores de APOE ε4^{6,7}.

e4Risk® proporciona información al médico sobre el riesgo del paciente de padecer EA. Además, e4Risk® puede proporcionar información relevante al médico durante el proceso de diagnóstico. La determinación de APOE ε4 en pacientes con deterioro cognitivo puede aumentar la precisión diagnóstica y acelerar el diagnóstico, reduciendo el tiempo de incertidumbre diagnóstica⁸. APOE ε4 es un factor de estratificación común en los ensayos clínicos de EA y, por lo tanto, e4Risk® se puede usar como primera prueba de cribado para seleccionar a los portadores de APOE ε4 susceptibles de ser incluidos en ensayos clínicos de EA^{9,10}. Además, existen evidencias de que los portadores de APOE ε4 responden de manera diferente a medicamentos experimentales⁹ y a medicamentos usados actualmente¹¹, por lo tanto, e4Risk® podría ser útil para seleccionar la dosis o el tipo de medicamento.

RENDIMIENTO ANALÍTICO

Rango técnico: ~1.22-146 µg/mL

LdB*/LdD*: 0.87 µg/mL / 1.22 µg/mL

Efecto Prozona: 146 µg/mL aún da resultado positivo.

Interferencias:** Bilirubina (hasta 18 mg/mL), Hemoglobina humana (hasta 200 mg/dL), lípidos-intralípid (≤ 2.5 g/mL), Factor Reumatoide (hasta 600 UI/mL), HAMA (hasta 40 ng/mL), sin interferencia.

Precisión (Control de calidad, control alto):

Promedio: 7.12 µg/mL

	SD	CV(%)
Repetibilidad	0.28	3.88
Intra-Laboratorio	0.82	11.57

* Determinado de acuerdo con las Directrices de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) documento EP17-A2 y con

proporciones de falsos positivos (α) menores al 5% y falsos negativos (β) menores del 5%; basado en 192 determinaciones con 96 replicas del blanco y 96 de baja concentración. ** Otras sustancias pueden interferir.

Valor de punto de corte recomendado: 4.10 µg/mL.

Punto de corte	Sensibilidad (%)†	Especificidad (%)†
4,10 µg/mL	97,4	99,3

†Determinados con 189 muestras de plasma humano (38 de portadores de APOE ε4).

NOTAS

1. Este método puede ser utilizado con diferentes analizadores químicos. Cualquier aplicación a un instrumento debe validarse para demostrar que los resultados cumplen con las características de rendimiento del método. Se recomienda validar periódicamente el instrumento. Póngase en contacto con el distribuidor para cualquier pregunta sobre la aplicación del método.
2. No se debe realizar un diagnóstico clínico basándose únicamente en los resultados de esta prueba, sino que debe integrarse con otros datos clínicos y de laboratorio.
3. Para instrumentos automáticos, evite la presencia de burbujas en los reactivos, ya que pueden interferir con los resultados del ensayo.
4. e4Risk® ha sido adaptado a los siguientes analizadores de química clínica de alto rendimiento Architect c16000 (Abbott), ALinity c (Abbott), ADVIA XPT (Siemens), Atellica (Siemens) y AU 5800 (Beckman Coulter). Los parámetros de configuración están disponibles bajo demanda.
5. Para más información sobre la metodología usada y la validación del test ver Calero O. et al (2018)¹² y Veiga S. et al (2020)¹³

BIBLIOGRAFÍA

1. Corder, E.H. *et al.* Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**, 921-923 (1993).
2. Michaelson, D.M. APOE ε4: the most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* **10**, 861-868 (2014).
3. Crean, S. *et al.* Apolipoprotein E epsilon4 prevalence in Alzheimer's disease patients varies across global populations: a systematic literature review and meta-analysis. *Dementia and geriatric cognitive disorders* **31**, 20-30 (2011).
4. van Duijn, C.M. *et al.* Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease. *Nature genetics* **7**, 74-78 (1994).
5. Farrer, L.A. *et al.* Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *Jama* **278**, 1349-1356 (1997).
6. Craft, S. *et al.* Accelerated decline in apolipoprotein E-epsilon4 homozygotes with Alzheimer's disease. *Neurology* **51**, 149-153 (1998).
7. Shi, Y. *et al.* ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature* **549**, 523-527 (2017).
8. Liu, Y. *et al.* APOE genotype and neuroimaging markers of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **86**, 127-134 (2015).
9. Salloway, S. *et al.* Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* **370**, 322-333 (2014).
10. Thompson, L.L. *et al.*; Alber, J. Application of an APOE disclosure model at a clinical trial site and the impact of dual disclosure of amyloid PET results. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease* **5**, S6-S7 (2018).
11. Nebes, *et al.* The greater sensitivity of elderly APOE epsilon4 carriers to anticholinergic medications is independent of cerebrovascular disease risk. *The American journal of geriatric pharmacotherapy* **10**, 185-192 (2012).
12. Calero O *et al.* A fast and cost-effective method for apolipoprotein E isotyping as an alternative to APOE genotyping for patient screening and stratification. *Scientific reports* **8**(1):5969 (2018).
13. Veiga S *et al.* Validation of a novel and accurate ApoE4 assay for automated chemistry analyzers. *Scientific reports* **10**(1): 2138 (2020).