



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A. N. M. A. T

DISPOSICIÓN N°

9 3 7 9

BUENOS AIRES

0 6 NOV 2015

VISTO, el expediente n° 1-47-3110-630/15-7 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por las presentes actuaciones la firma ETC INTERNACIONAL S.A. solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos del Producto para diagnóstico de uso "in Vitro" denominado FragilEase™ Fragile X PCR Kit / amplificar y detectar la secuencia repetida del trinucleótido citosina-guanina-guanina (CGG) en la región 5' no traducida del gen Fragile X Mental Retardation-1 (FMR1).

Que a fs. 163 consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que el producto reúne las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que la Dirección Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establece la Ley 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición A N M A T N° 2674/99.

Que se actúa en virtud a las atribuciones conferidas por el Decreto N° 1490/92, por el Decreto N° 1886/14 y el Decreto N° 1368/15.

[Handwritten mark]

[Handwritten initials]
LV



Ministerio de Salud
Secretaría de Políticas, Regulación
e Institutos
A. N. M. A. T

RESOLUCIÓN N°

9379

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACION NACIONAL DE
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MÉDICA

DISPONE:

ARTICULO 1º.- Autorízase la venta a laboratorios de análisis clínicos del Producto para diagnóstico de uso "in Vitro" denominado FragilEase™ Fragile X PCR Kit / amplificar y detectar la secuencia repetida del trinucleótido citosina-guanina-guanina (CGG) en la región 5' no traducida del gen Fragile X Mental Retardation-1 (FMR1) que será elaborado por Wallac Oy, Mustionkatu 6, FI-20750 Turku (FINLANDIA) e importado por ETC INTERNACIONAL S.A. a expendirse en envases conteniendo FragilEase PCR Buffer Mix (2 X 800 µl), FragilEase Polymarase (45µl), Sample Diluent (1000µl), para 96 determinaciones ó FragilEase PCR Buffer Mix (24 X 800 µl), FragilEase Polymarase (12 x 45µl), Sample Diluent (12 x 1000µl), para 1152 determinaciones; cuya composición se detalla a fojas 59 con un período de vida útil de 18 (DIECIOCHO) meses desde la fecha de elaboración conservado entre -30 a -16°C.

ARTICULO 2º.- Acéptense los rótulos y manual de instrucciones obrantes a fojas 83 a 133 , desglosándose las fojas 83 a 97 y 128 a 129 debiendo constar en los mismos que la fecha de vencimiento es la declarada por el elaborador impreso en los rótulos de cada partida.

ARTICULO 3º.- Extiéndase el Certificado correspondiente.

Handwritten signature

Handwritten initials LV



DISPOSICIÓN Nº 9379

ARTICULO 4º.- LA ADMINISTRACION NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA, se reserva el derecho de reexaminar los métodos de control, estabilidad y elaboración cuando las circunstancias así lo determinen.

ARTICULO 5º.- Regístrese; gírese a Dirección de Gestión de Información Técnica a sus efectos, por el Departamento de Mesa de Entradas notifíquese al interesado y hágasele entrega de la copia autenticada de la presente Disposición junto con la copia de los proyectos de rótulos, manual de instrucciones y el Certificado correspondiente. Cumplido, archívese.-

Expediente nº: 1-47-3110-630/15-7.

DISPOSICIÓN Nº:

av.

9379

DR. LEONARDO VERNA
SUBADMINISTRADOR NACIONAL
DECRETO N 1368/2015
A. N. M. A. T.

13907760-2 (es)

3101-0010

3101-001B

9379
06 NOV 2015



FragilEase™

Fragile X PCR kit

Instrucciones de uso. Reactivos para 96 [1152] reacciones PCR.

Fabricado por:
Wallac Oy,
Mustionkatu 6, FI-20750 Turku, Finlandia

PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*

CE

ETC INTERNACIONAL S.A.
LILIANA FX DE RAVEGUA
APODERADO


PerkinElmer
ETC INTERNACIONAL S.A.
ANIBAL E. BAGNARELLI
CO-DIRECTOR TÉCNICO
BIOQUÍMICO
M.C. 878-D

SIMBOLOS



In vitro diagnostic medical device / Dispositif médical de diagnostic *in vitro* /
In-Vitro-Diagnostikum / Producto sanitario para diagnóstico *in vitro* /
 Dispositivo medico-diagnostico *in vitro* / Para uso diagnóstico *in vitro*



Batch code / Code du lot / Chargenbezeichnung / Código de lote / Codice
 del lotto / Número do lote



Packing number / Numéro d'emballage / Packnummer / Número de envase /
 Numero confezioni / Número de embalagem



Catálogo number / Référence du catalogue / Bestellnummer / Número de
 catálogo / Numero di catalogo / Código



Use by / Utiliser jusqu'au / Verwendbar bis / Fecha de caducidad / Utilizzare
 entro / Data limite de utilização



Temperature limitation / Limites de température / Temperaturbegrenzung /
 Limite de temperatura / Limiti di temperatura / Limite de temperatura



Store in the dark / Conserver à l'abri de la lumière / Dunkel aufbewahren /
 Almacenar en ambiente oscuro / Conservare al buio / Guardar longe da luz



Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Inhalt
 ausreichend für <n> Prüfungen / Contenido suficiente para <n> ensayos /
 Contenuto sufficiente per "n" saggi / Conteúdo suficiente para <n> testes



Consult instructions for use / Consulter les instructions d'utilisation /
 Gebrauchsanweisung beachten / Consulte las instrucciones de uso /
 Consultare le istruzioni per l'uso / Consultar instruções de uso



Manufacturer / Fabricant / Hersteller / Fabricante / Fabbricante / Fabricado
 por



This way up / Haut / Diese Seite oben / Este lado arriba / Questo lato
 in alto / Este lado para cima



Recyclable/ Recyclable / Recyclebar / Reciclable / Riciclabile / Reciclável

ETC INTERNACIONAL S.A.
 LILIANA P. DE RAVEGLIA
 APODERADO

CO-DIRECTOR TECNICO
 BIOQUIMICO
 M.F. 0764

FragilEase™ Fragile X PCR kit

9 3 7 9



FINALIDAD DEL KIT

El kit FragilEase™ está diseñado para amplificar y detectar la secuencia repetida del trinucleótido citosina-guanina-guanina (CGG) en la región 5' no traducida del gen Fragile X Mental Retardation-1 (*FMR1*). La prueba consiste en un paso de amplificación de ADN, seguido por la determinación del tamaño de los fragmentos en un instrumento de electroforésis de microgel capilar y la posterior detección del número de repeticiones CGG para ayudar al diagnóstico del síndrome X frágil y trastornos asociados a X frágil, por ejemplo, síndrome de temblor y ataxia (FX-TAS) y fallo ovárico prematuro (FX-POI).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

El síndrome X frágil (FXS) y trastornos asociados son los resultados de la expansión de la repetición del trinucleótido CGG en la región 5' no traducida del gen Fragile X Mental Retardation-1 *FMR1*, NM_002024.4 en el cromosoma X [1],[2]. Un tamaño de repetición del trinucleótido de > 200 se describe como una mutación completa y provoca la metilación aberrante y el posterior silencio en la transcripción del promotor de *FMR1* [3]. Como consecuencia, la ausencia de la proteína de enlace del ARN de *FMR1* altera el desarrollo neuronal normal en recién nacidos impidiendo que se produzca plasticidad sináptica o poda neuronal en el desarrollo cerebral del recién nacido [4]. La ausencia de la proteína *FMR1* también se ha relacionado con la alteración de la ruta de señalización sináptica del receptor metabotrópico del glutamato (mGluR) [5]. El desarrollo cerebral en ausencia de la proteína *FMR1* da lugar a las diversas manifestaciones clínicas del FXS. Incluyen discapacidad mental de grave a moderada, retraso en el desarrollo, déficit de atención e hiperactividad, ansiedad con inestabilidad del estado de ánimo y comportamientos obsesivo-compulsivo y autista [6]. Las pacientes con una mutación completa en un cromosoma X tendrán con frecuencia un alelo *FMR1* normal en su otro cromosoma X. Las mujeres pueden tener manifestaciones clínicas similares a las descritas anteriormente, pero la presentación suele ser más leve puesto que con frecuencia se expresa una pequeña cantidad de proteína de *FMR1*.

Los tamaños de repetición que van de ~55 a ~200 repeticiones se clasifican como estado de premutación. Las mujeres portadoras de premutación tienen un mayor riesgo de tener hijos con FXS [7]. Las mujeres con premutación también tienen un mayor riesgo de desarrollar fallo ovárico prematuro asociado a X frágil (FX-POI), una causa principal de infertilidad y menopausia precoz en mujeres [8]. Los hombres con premutación también están predispuestos a la manifestación tardía del síndrome de temblor y ataxia asociado a X frágil (FX-TAS) coherente con deterioro cognitivo con demencia y con ataxia [9]. Recientemente se han observado trastornos del espectro autista incluidos déficits en el desarrollo, los comportamientos de atención y social en niños con alelos *FMR1* con premutación [10].

ETC INTERNACIONAL S.A.
LILIANA G. DE BIGNARELLI
APODERADO

FragilEase es una marca comercial de PerkinElmer, Inc.

ETC INTERNACIONAL S.A.
LILIANA G. BIGNARELLI
COORDINADORA TÉCNICA
FOLIO 85

[Handwritten signatures]

PRINCIPIOS DEL ENSAYO

El ensayo de X frágil se basa en la amplificación de PCR de las secuencias de repetición en la región 5' no traducida del promotor de *FMR1*. El tamaño resultante del fragmento de PCR es directamente proporcional al número de repeticiones del trinucleótido en la muestra, lo que se determina por electroforesis de microgel capilar. La amplificación de PCR puede realizarse en ADN genómico humano purificado de distintas fuentes biológicas, incluyendo sangre total y manchas de sangre seca. [11]

1. Reacción PCR de X frágil

Este kit contiene reactivos necesarios para la amplificación de la región de repetición del trinucleótido muy rico en GC del promotor de *FMR1*. Para la determinación precisa del número de repeticiones, recomendamos el análisis simultáneo de al menos dos muestras positivas de control (ver "MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO CON EL KIT").

2. Purificación del producto PCR

Antes de determinar el tamaño de los fragmentos, deben purificarse los productos PCR para mejorar la detección.

3. Determinación del tamaño del fragmento con electroforesis de microgel capilar

El tamaño del fragmento de cada muestra se determina utilizando electroforesis de microgel capilar. Puesto que la solución de cebador contiene cebador con marcador FAM, puede realizarse la determinación de tamaño del fragmento con un sistema de electroforesis adecuado sin marcado adicional. Se utilizan curvas estándar derivadas de muestras de referencia con tamaños de repetición conocidos para la detección precisa del tamaño de repetición en los ADN de muestra.

Para 96 muestras: Tiempo para el resultado = 6 horas

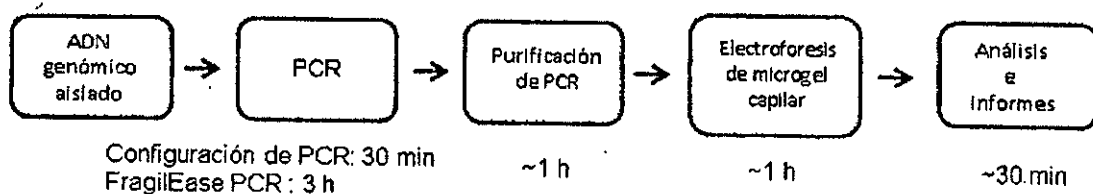


Figura 1. Los pasos principales del ensayo PCR de X frágil. En resumen, la región de repetición de *FMR1* es amplificada por PCR, después se purifica el producto PCR, se mide el tamaño del fragmento y se utiliza para determinar el tamaño de repetición respecto a estándares con longitudes de repetición conocidas.

ETC INTERNACIONAL
LILIANA F. DE
APODERADA

ETC INTERNACIONAL
ANIBAL E. BAGNANELLI
CO-DIRECTOR TÉCNICO
BIOQUÍMICO
M-D 00000

13907760-2 (es)

CONTENIDO DEL KIT

9379



Las figuras entre corchetes [] se refieren al kit de 1152 reacciones.

Cada kit FragilEase contiene reactivos para 96 [1152] reacciones PCR.

La fecha de caducidad del kit sin abrir viene indicada en una etiqueta exterior. Almacene el kit FragilEase a -30 – -16 °C.

Una vez abierto el kit FragilEase, sus componentes son estables durante un máximo de 13 semanas con hasta 13 ciclos de congelación y descongelación cuando se almacenan a las temperaturas indicadas en las etiquetas de los componentes y se utilizan tal y como se describe en la sección "PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO".

Reactivos

Componente	Cantidad	Almacenamiento y caducidad
FragilEase Polymerase (Polimerasa FragilEase)	1 vial, 45 µL [12 viales, 45 µL]	-30 – -16 °C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.
FragilEase PCR Buffer mix (Mezcla de tampón PCR FragilEase)	2 viales, 800 µL [24 viales, 800 µL]	-30 – -16 °C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. Almacenar en ambiente oscuro.
Sample Diluent (Diluyente de muestra)	1 vial, 1000 µL [12 viales, 1000 µL]	-30 – -16 °C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial.

MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO CON EL KIT

Equipo disponible de Wallac Oy o PerkinElmer, Inc. y sus distribuidores:

1. Software de análisis FraXsoft™ (nº de ref. no. 5017-0010)
2. Agitadores/incubadores capaces de mantener +25 (±1) °C, +65 (±1) °C y 1200 rpm con una órbita de 2–3 mm de diámetro. Los dispositivos deben adaptarse a una placa PCR de 96 pocillos, por ejemplo, TriNEST™ Microplate Incubator Shaker (nº de ref. no. 1296-0050) o equivalente.
3. Instrumento de electroforesis de microgel con consumibles apropiados [por ejemplo, Caliper LabChip® MultiDx (nº de ref. no. CLS 136531) or equivalente]

ETC INTERNACIONAL S.A.
FraXsoft es una marca comercial de PerkinElmer, Inc.
TriNEST es una marca comercial de PerkinElmer, Inc.
LabChip es una marca registrada de PerkinElmer, Inc.

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANIO L. E. BAGNARELLI
CO-DIRECTOR TECNICO
BIOQUIMICO
M.A. 4/8/84

Materiales disponibles de otros proveedores:

- Bloque de calor de 96 pocillos con opción de agitación (opcional, alternativa a TriNEST)
- Instrumento de electroforesis de microgel (opcional, alternativa a Caliper LabChip MultiDX)
- Espectrofotómetro UV para medir en volúmenes de microlitros
 - Thermo Scientific NanoDrop®
- Aparato de vacío para placas de filtro con una bomba y una cubeta colectora de residuos capaz de adaptarse a placas MACHEREY-NAGEL NucleoFast 96 PCR (para limpieza de placas de alto rendimiento)
 - MultiScreen® HTS Vacuum Manifold, Vacuum Filtering Flask 1L y tapón nº 8
- Termociclador de PCR de 96 pocillos con tapa calefactada que se adapta a las placas PCR de 96 pocillos
- Agitador vorticial
- Microcentrífuga capaz de alcanzar 14,000 x g
- Minicentrífuga para microtubos PCR (opcional)
- Centrífuga capaz de centrifugar la placa PCR
- Pipetas multicanal (rangos de volumen de 5–300 µL)
- Pipetas (rangos de volumen de 0.5–1000 µL)
- Temporizador
- Rodillo para sellar placas (opcional)
- Tubos PCR de 200 µL, de pared fina, o tiras con tapón (opcional)
- Placas PCR de 96 pocillos
- Tubos de 1.5 mL de polipropileno
- Recipientes de reactivo líquido de 25 mL
- Toallitas de papel
- Sellador de placas adhesivo
- NucleoFast™ 96 PCR Clean-up Kit (MACHEREY-NAGEL)
- PureLink® PCR Micro Kit (Invitrogen; para limpieza de columnas de inferior rendimiento - opcional)
- Agua de grado molecular
- Tampón de TE (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA)

Muestras de referencia recomendadas:

Hay muestras caracterizadas de referencia de X frágil disponibles de Coriell Institute for Medical Research [12] o del National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) [13]. En la tabla 1 aparecen muestras de referencia recomendadas.



ETC INTERNACIONAL
LILIANA E. DE LA CRUZ

NanoDrop es una marca registrada de Thermo Fisher Scientific Inc.
 Multiscreen es una marca registrada de Merck KGaA Darmstadt Germany.
 NucleoFast es una marca comercial de MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG.
 PureLink es una marca registrada de Life Technologies Corporation.



LILIANA E. DE LA CRUZ
CO-DIRECTOR TÉCNICO
BIOQUÍMICO
M.R. 40724



Muestras de referencia recomendadas	Cat. de muestras	Repeticiones pequeñas de alelos	Repeticiones grandes de alelos
Coriell	NA 20240	30	80
	NA 20239	20	200
NIBSC	07/172	33	113
	07/168	38	346

FASE PREANALÍTICA

FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN EL ENSAYO

Para que el rendimiento sea óptimo, las muestras de ADN deben purificarse usando un kit de purificación de ADN comercial para retirar las posibles sustancias que interfieran, como proteínas y altas concentraciones de sal. Los laboratorios podrían tener que establecer sus propios criterios de calidad para las muestras que se van a analizar con el fin de obtener resultados que cumplan las especificaciones del laboratorio.

TOMA DE LAS MUESTRAS Y ESTABILIDAD DEL ANALITO

Tipo de muestra

El ensayo FragilEase puede realizarse en ADN genómico humano purificado de distintas fuentes biológicas, como sangre total y ADN derivado de manchas de sangre seca.

Preparación de la muestra

- Para un óptimo rendimiento, el ADN debe extraerse preferiblemente en el plazo de 24 horas desde la toma de la muestra para evitar su degradación. Recomendamos usar ADN no degradado de alta calidad a una concentración de 25 ng/ μ L con las especificaciones siguientes (medidas usando un instrumento Nanodrop):
 - A260/A280 1.8-2.0
 - A260/A230 > 1.0
- El ADN purificado puede almacenarse suspendido de nuevo en Tris-EDTA (pH 7.2) hasta un año entre +2 y +8 °C, (almacenamiento a corto plazo) o hasta 7 años entre -30 y -16 °C (almacenamiento a largo plazo). Evitar las congelaciones y descongelaciones repetidas [14].

El ADN en muestras de sangre seca es estable y adecuado para análisis de PCR durante al menos 12 meses siempre que las muestras se almacenen a temperatura ambiente (+19 a +25 °C) y una humedad relativa < 93 % [14],[15]. Para almacenamiento a largo plazo (hasta 19 meses), las muestras deben colocarse en bolsas de plástico junto con un desecante y guardarlas entre -30 y -16 °C [14],[16].

ETC INTERNACIONAL S.A.
LILIANA E. DE RAVEGLIA
ACQUERADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANIBAL E. BAGNARELLI
COORDINADOR TÉCNICO
ANÁLISIS QUÍMICO

FASE POSTANALÍTICA

CUIDADOS Y PRECAUCIONES

Para diagnóstico *in vitro*.

Este kit debe ser utilizado únicamente por personal cualificado.

Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Consultar la publicación "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" del U.S. Department of Health and Human Services o las normas locales o nacionales.

Todos los residuos se deben eliminar siguiendo la normativa en vigor.

NOTAS DE PROCEDIMIENTO

1. Para el buen uso del kit FragilEase es esencial leer y entender bien todas estas instrucciones. No usar los reactivos de un kit después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del mismo.
2. Cualquier desviación del procedimiento de ensayo puede afectar a los resultados.
3. Se deben usar puntas de pipeta de baja retención para facilitar el pipeteado de soluciones viscosas para la dispensación de la mezcla de tampón PCR y ensayo PCR.
4. Se recomienda el uso de consumibles estériles y libres de DNAsa.
5. Deben seguirse procedimientos estándar de laboratorio para la configuración de PCR con el fin de evitar la contaminación.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS DE FRAGILEASE

Todos los reactivos del kit 3101-0010 / 3101-001B FragilEase están listos para el uso.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

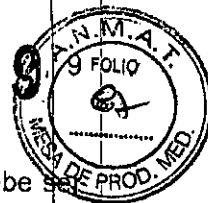
Saque los siguientes reactivos del congelador o el refrigerador de 20 a 30 minutos antes de su uso y déjelos a temperatura ambiente hasta que se necesiten. Asegúrese de que todos los reactivos están completamente descongelados antes del uso.

- Mezcla de tampón PCR FragilEase
- Diluyente de muestra
- Muestras de ADN genómico
- ADN de referencia

Antes de usarlos, agite y centrifugue todos los ADN de muestra, los ADN de referencia y los reactivos, excepto la polimerasa.

ETC INTERNACIONAL S.A.
LILIANA F. DE PARRON
MODERADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANGEL E. BAGNARELLI
CO-DIRECTOR TÉCNICO
BIOQUÍMICO
1998 01/03



1. Ensayo PCR de X frágil

- 1.1. Mida la concentración de las muestras de ADN. La concentración de ADN debe ser de 25 ng/ μL ; diluya con diluyente de muestras para obtener la concentración adecuada si es necesario.
- 1.2. Prepare una mezcla maestra de PCR para el número de reacciones necesarias (tabla 2). Recomendamos incluir un control negativo utilizando diluyente de muestras para supervisar el rendimiento de PCR.

NOTA: Prepare la mezcla maestra de PCR a temperatura ambiente, NO pipetee en hielo.

Tabla 2

Reactivo	Cantidad requerida por reacción
Mezcla de tampón PCR FragilEase	15 μL
Diluyente de muestra	2.6 μL
Polimerasa FragilEase	0.4 μL
Volumen total	18 μL

NOTA: La mezcla tampón PCR de FragilEase es viscosa. Mezcle el tubo y después centrifugue brevemente antes de usar.

- 1.3. Agite la mezcla maestra PCR durante 10–20 segundos y centrifugue. Dispense lentamente 18 μL de mezcla maestra PCR en cada pocillo o tubo.
- 1.4. Antes de hacer alicuotas, agite y centrifugue las muestras de ADN. Pipetee 2 μL de cada ADN en el pocillo o tubo adecuado para un volumen de PCR final de 20 μL . Mezcle pipeteando arriba y abajo 5 veces.

NOTA: La cantidad total de ADN por reacción debe estar entre 50–100 ng. Cantidades de ADN superiores a 150 ng por reacción PCR de 20 μL pueden dar como resultado una pobre amplificación de alelos de repetición grande. Para los ADN con más baja concentración, la cantidad de diluyente de muestra en la mezcla maestra PCR puede sustituirse por solución de ADN.

- 1.5. Selle la placa con sellador de placas adhesivo o tape los tubos.
- 1.6. Coloque la placa PCR sellada o los tubos en el termociclador. Ejecute el programa PCR indicado más adelante en la tabla 3 utilizando una función con tapa calefactada.

ETC INTERNACIONAL S.A.
LILIANA F. DE RAVEGLIA
APODERADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANTONIO E. BAGNARELLI
CO-DIRECTOR TÉCNICO
BIOQUÍMICO
1975 1976

Tabla 3

Programa PCR		
Paso 1	+95 °C	5 minutos
Paso 2	+98 °C	35 segundos
Paso 3	+59 °C	35 segundos
Paso 4	+72 °C	4 minutos
Paso 5	Repetir pasos 2-4 para un total de 25 ciclos	
Paso 6	+72 °C	10 minutos
Paso 7	+4 °C	continuo

1.7. Una vez completados los ciclos de PCR, el producto PCR FragilEase puede purificarse y analizarse de inmediato, o almacenarse de +2 °C a +8 °C durante la noche. La muestra puede almacenarse hasta 30 días de -30 a -16 °C.

2. Purificación del producto PCR

El protocolo que se describe a continuación es para limpieza de alto rendimiento usando placas MACHEREY-NAGEL NucleoFast 96 PCR. Las placas de limpieza se utilizan de acuerdo a las instrucciones del fabricante con los cambios siguientes:

- 2.1 Precaliente TriNEST o un instrumento equivalente a +65 °C.
- 2.2 Para cada reacción PCR, añada 80 µL de 1x TE pH 8.0 a los 20 µL de producto PCR FragilEase.
- 2.3 Transfiera muestras a una placa NucleoFast 96 PCR usando una pipeta multicanal.
- 2.4 Coloque la placa sin tapar en TriNEST o un instrumento equivalente e incube a +65 °C mientras agita a 1200 rpm durante 10 minutos.
- 2.5 Tras la incubación, aspire al vacío la solución a través del filtro (configuración de vacío a 250 mbar (o 25 kPa, 188 mm Hg, 7.4 pulg. Hg)) durante 15 minutos. No debe quedar líquido en los pocillos.
- 2.6 Enfríe TriNEST o un instrumento equivalente hasta +25 °C.
- 2.7 Después de la aspiración, apague el vacío y añada 50 µL 1x TE pH 8.0 a cada pocillo. No mezclar. Aspire al vacío durante 10 minutos usando la misma configuración.
- 2.8 Seque la parte inferior de la placa de filtro presionándola firmemente en una pila de toallitas de papel.
- 2.9 Añada 20 µL 1x TE pH 8.0 en la parte media del fondo de cada pocillo. Coloque la placa en TriNEST o un instrumento equivalente e incube a +25 °C durante 5 minutos mientras agita a 1200 rpm.

ETC INTERNACIONAL S.A.
 AV. NA F. DE
 APOD...

ETC INTERNACIONAL S.A.
 ANIBAL E. BAGNATELLI
 CO-DIRECTOR TÉCNICO
 BIOQUÍMICO

13907760-2 (es)

- 2.10 Tras la incubación, transfiera $>15 \mu\text{L}$ de cada ADN de PCR purificado a una placa nueva PCR de 96 pocillos.
- 2.11 El ADN purificado puede analizarse directamente o, de forma alternativa, puede almacenarse entre -30 y $-16 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta que se necesite.

NOTA: De forma alternativa, para un número menor de análisis recomendamos utilizar el PureLink PCR Micro Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3. Determinación del tamaño del fragmento con la plataforma para electroforesis de microgel capilar PerkinElmer

Para analizar el tamaño de repetición, pueden utilizarse varios sistemas distintos de electroforesis de microgel capilar, por ejemplo, el Caliper LabChip MultiDX. Consulte los manuales del instrumento o póngase en contacto con el servicio de atención al cliente: (GScustomersupport@perkinelmer.com) si desea obtener más información.

FASE POSTANALÍTICA

CÁLCULO DE RESULTADOS

Para calcular los tamaños de repetición de muestras desconocidas se recomienda utilizar muestras de referencia con tamaños de repetición bien caracterizados como estándares. Aquí se amplificaron dos muestras de ADN con X frágil Coriell de mujer (ver tabla 1) con reactivos FragilEase. Se eligió una muestra de mujer con premutación (NA20240) y una muestra de mujer con mutación completa (NA20239) para permitir la creación de una curva estándar de cuatro puntos a partir del número mínimo de muestras. Se analizaron los productos PCR con un instrumento de electroforesis de microgel (figuras 2 y 3). Los tamaños de los fragmentos medidos se representaron gráficamente respecto a una curva estándar de regresión lineal derivada de las muestras de referencia para calcular los tamaños de repetición de cualquier muestra de prueba elegida (figura 4).

ETC INTERNACIONAL S.L.
LILIANA F. DE HAVEGLIA
APODERADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANTHONY E. BAGNARELLI
COORDINADOR TÉCNICO
BIOQUÍMICO

A ↓

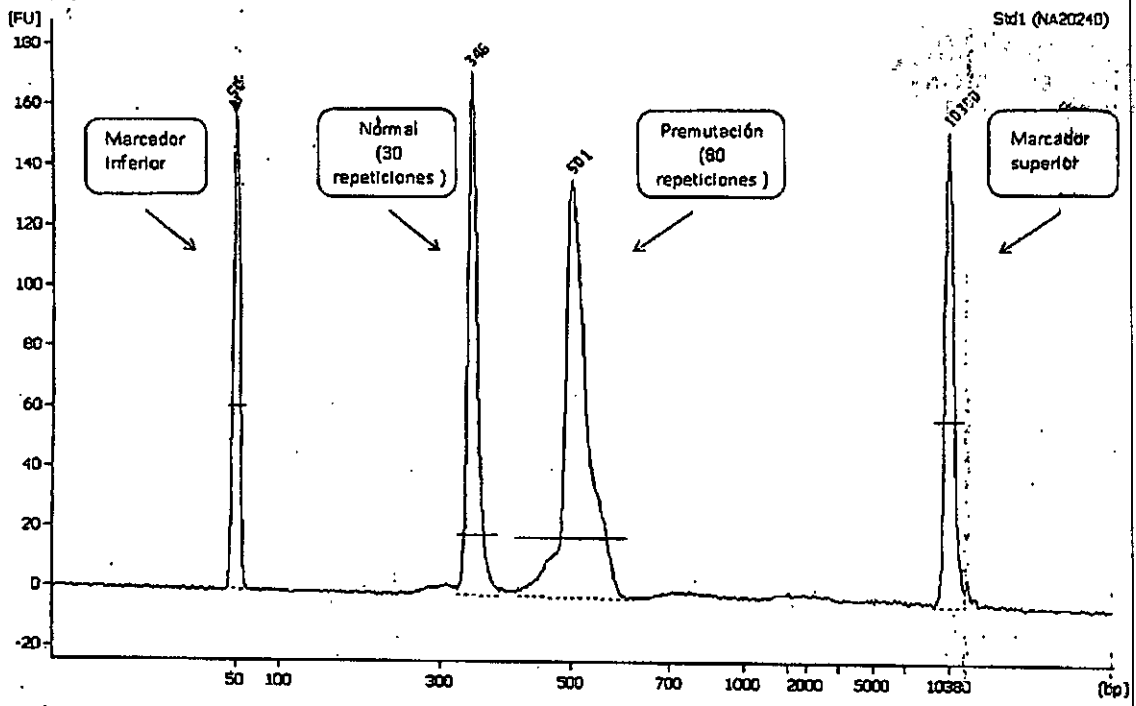


Figura 2. El electroferograma de la muestra NA20240 (30 y 80 repeticiones) tras la amplificación con reactivos FragilEase y purificación PCR. Los marcadores inferior y superior están incluidos en el kit de electroforesis para la medición precisa de los fragmentos de PCR.

[Handwritten signature]
ETC INTERNACIONAL S.A.
LILIANA F. DE RAVELINA
APODERADO

[Handwritten signature]
ETC INTERNACIONAL S.A.
ANIBAL E. BAGNARELLI
CO-DIRECTOR TECNICO
BIQUIMICO
(1975-1984)

1

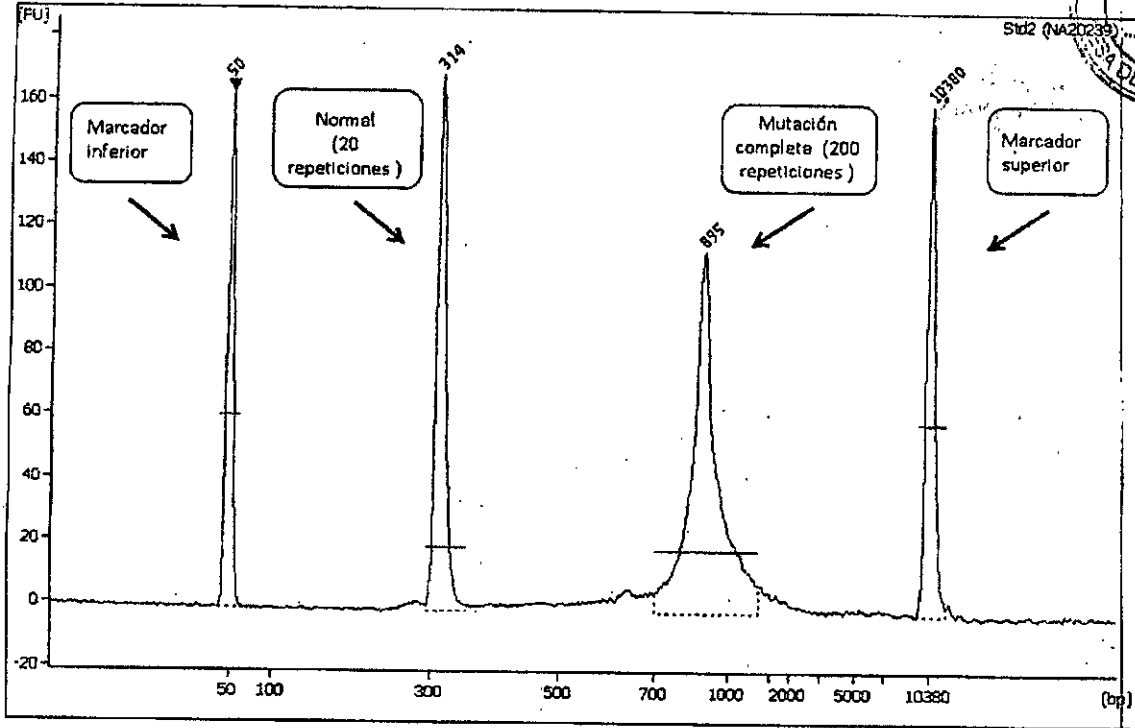
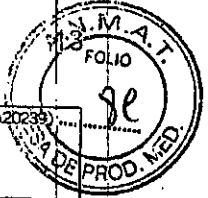


Figura 3. El electroferograma de la muestra NA20239 (20 y 200 repeticiones) tras la amplificación con reactivos FragilEase y purificación PCR. Los marcadores inferior y superior están incluidos en el kit de electroforesis para la medición precisa de los fragmentos de PCR.

ETC INTERNACIONAL S.A.
LIAMAR DE SANGUJA
BOQUERADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
LABORATORIO DE ANÁLISIS
GENÉTICOS Y QUÍMICOS
BOQUERADO

Al

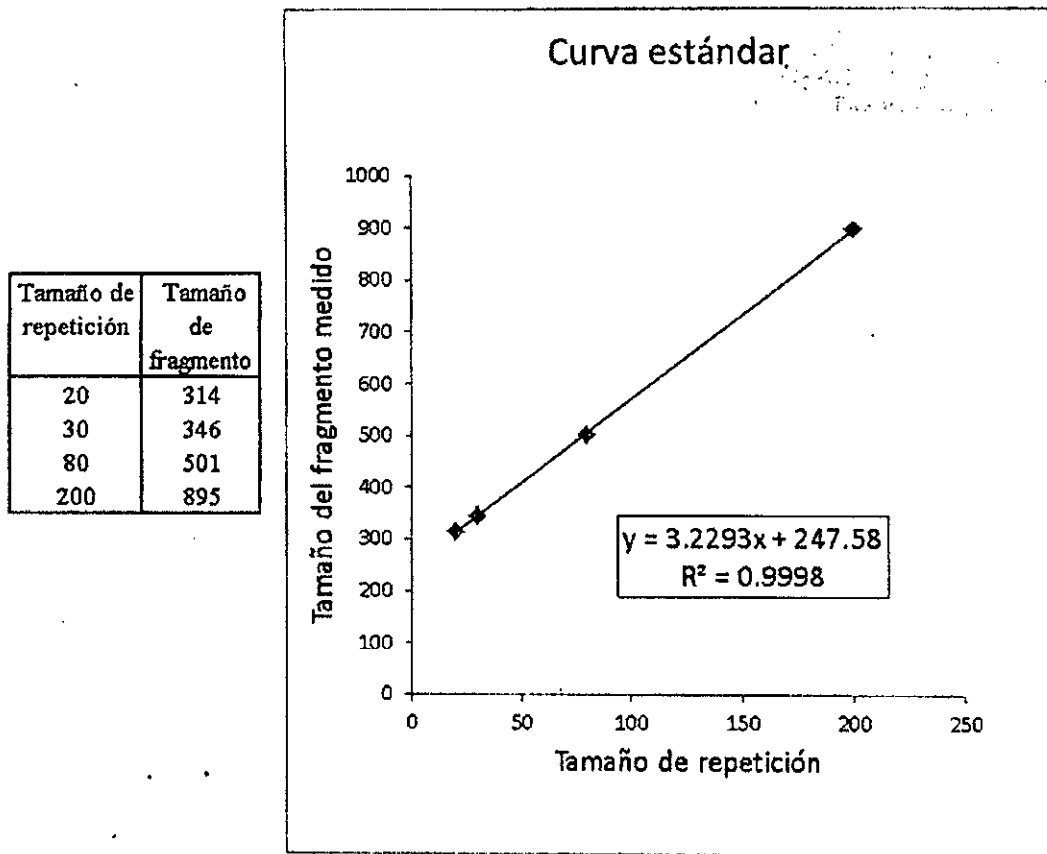


Figura 4. Un ejemplo de una curva de regresión lineal de los tamaños de fragmento medidos de las muestras NA20240 y NA20239. El valor R^2 cumple los criterios de aceptación de control de calidad de > 0.98 .

La determinación del tamaño de repetición de muestras desconocidas puede hacerse automáticamente utilizando FraXsoft (para obtener información detallada, consulte el manual del software de análisis FraXsoft (5017-0010)). FraXsoft permite importar los archivos de datos de instrumentos de electroforesis de microgel, hace los cálculos de las longitudes de repetición CGG y genera datos de control de calidad. FraXsoft deja utilizar directrices de clasificación predefinidas y también personalizadas.

Control de calidad

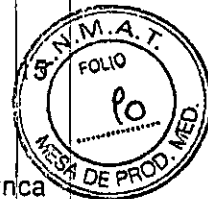
Las muestras de referencia de Fragile X con tamaños de repetición bien caracterizados deben incluirse en cada ejecución PCR para control de calidad y los objetivos posteriores de medición automatizada del tamaño de los fragmentos usando FraXsoft. Las mediciones de tamaño de fragmento deben cumplir las especificaciones analíticas del instrumento de electroforesis de microgel utilizado. Normalmente, el valor R^2 de la curva de regresión lineal derivada de las muestras de control debe ser superior a 0.98.

ETC INTERNACIONAL S.A.
LILIANE DE RAVAL
COORDINADORA

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANDREA BIGNARELLI
CO-DIRECTOR TÉCNICO
BIOQUÍMICO
M.A. 3764

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

9379



Como en los demás ensayos diagnósticos, un juicio clínico definitivo no deberá nunca basarse en el resultado de un único ensayo, sino tan sólo después de haber sido evaluados por el médico todos los datos clínicos y de laboratorio. Wallac Oy no se responsabiliza de las decisiones clínicas adoptadas por el personal facultativo.

La técnica tampoco puede detectar casos de mosaico < 5 %.

Consultar también las secciones "NOTAS DE PROCEDIMIENTO" y "TOMA DE LAS MUESTRAS Y ESTABILIDAD DEL ANALITO".

EJEMPLOS DE PLATAFORMAS DE LECTURA DE DATOS

Los productos PCR de FragilEase pueden analizarse con varias plataformas electroforéticas:

1. Análisis con gel de agarosa
2. Análisis con electroforesis de microgel, y
3. Análisis con electroforesis capilar

1. Análisis con gel de agarosa

Los fragmentos PCR pueden detectarse fácilmente en geles de agarosa estándar teñidos con un colorante interquelante (ver figuras 5 y 6). FragilEase amplifica enérgicamente las secuencias de repetición muy ricas en GC de muestras con premutación y mutación completa, que son visibles en un gel de agarosa y se resuelven en proporción a su tamaño de repetición. Las muestras de mujeres con dos alelos normales aparecen como una banda PCR porque los fragmentos PCR de esos alelos normales tienen un tamaño de fragmento cercano o igual y, por lo tanto, no se resuelven en un gel de agarosa (ver figura 5; 23 y 29 repeticiones de NA07540 y 29 y 29 repeticiones de NA07538). Puesto que FragilEase amplifica enérgicamente los alelos con mutación completa, las muestras de mujeres con una banda PCR se clasifican como normales y no tendrían que reflejarse en el análisis Southern Blot que ha sido la práctica rutinaria en el pasado. Los tamaños de fragmento de las muestras estándar pueden utilizarse para estimar los tamaños de repetición de muestras desconocidas resueltas en un gel de agarosa, pero pueden determinarse mediciones más precisas usando cualquier instrumento de electroforesis de microgel capilar disponible comercialmente.

ETC INTERNACIONAL S.A.
LILIANA F. DE RAVEGLIA
APROBADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANNALE E. BAGNARELLI
COORDINADOR TÉCNICO
LABORATORIO

4 ↓

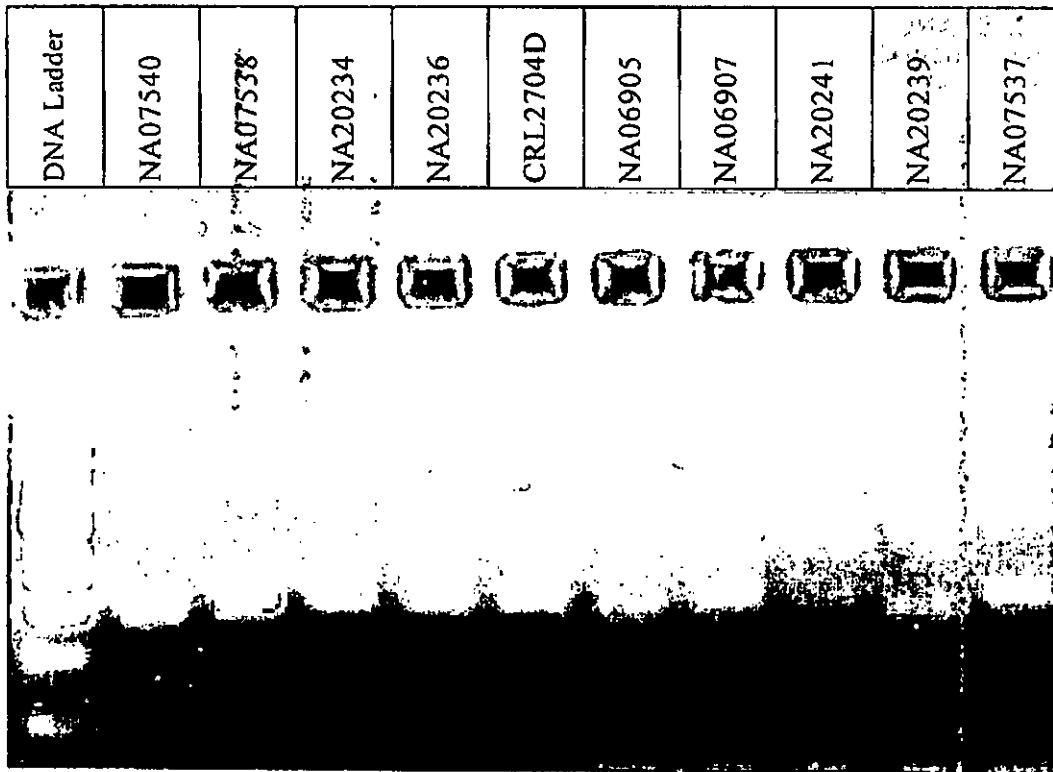
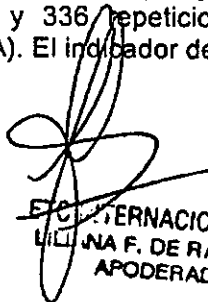



Figura 5. Gel de agarosa al 3 % de muestras de ADN de referencia X frágil de mujer teñidas con bromuro de etidio y procesadas a 5v/cm durante 45 minutos. El número de muestras y el tamaño de repetición de referencia de Coriell (Trenton, NJ) son: NA07540 (23 y 29 repeticiones), NA07538 (29 y 29 repeticiones), NA20234 (31 y 46 repeticiones), NA20236 (31 y 53 repeticiones), NA06905 (23 y 70 repeticiones), NA06907 (29 y 85 repeticiones), NA20241 (29 y 120 repeticiones), NA20239 (20 y 200 repeticiones), NA07537 (28 y 336 repeticiones). CRL2704D (31 y 59 repeticiones) es de ATCC (Manassas, VA). El indicador de peso molecular es un indicador de 100 bp (Invitrogen).


 E.C. INTERNACIONAL S.A.
 LILIANA F. DE RAVAGLIA
 APODERADO


 ANA CAROLINA ARELLI
 COLECTOR TECNICO
 BIOCQUIMICO
 M.A. 0700

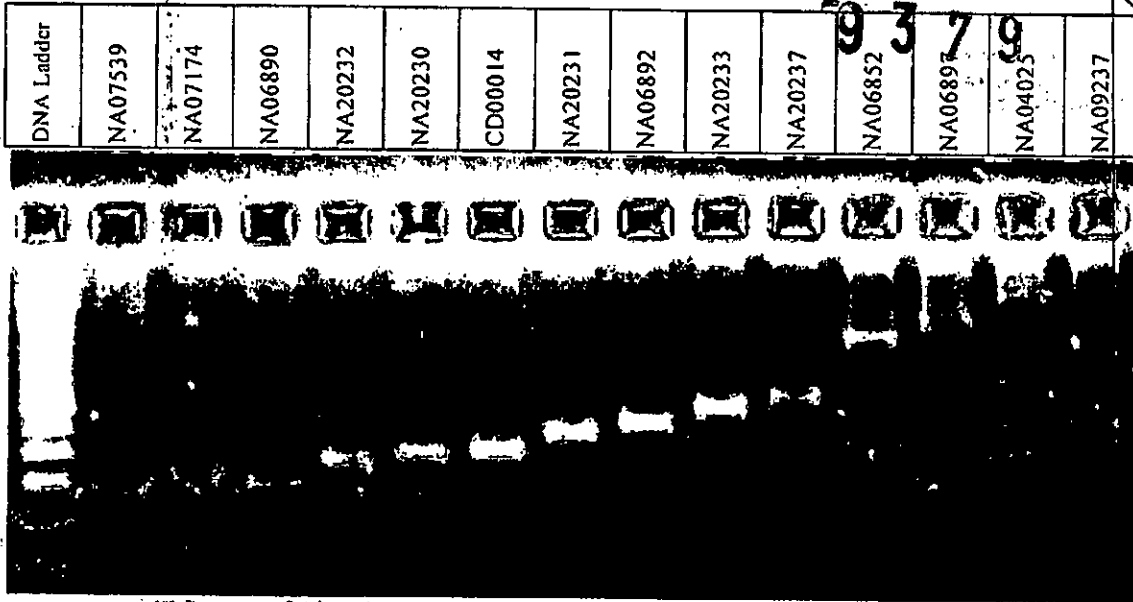
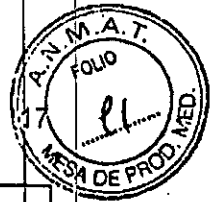


Figura 6. Gel de agarosa al 3 % de muestras de ADN de referencia X frágil de hombre teñidas con bromuro de etidio y procesadas a 5v/cm durante 45 minutos. El número de muestras y el tamaño de repetición de referencia de Coriell (Trenton, NJ) son: NA07539 (23 repeticiones), NA07174 (30 repeticiones), NA06890 (30 repeticiones), NA20232 (46 repeticiones), NA20230 (54 repeticiones), CD00014 (56 repeticiones), NA20231 (76 repeticiones), NA06892 (86 repeticiones), NA20233 (117 repeticiones), NA20237 (120 repeticiones), NA06852 (>200 repeticiones), NA06897 (477 repeticiones), NA04025 (645 repeticiones), NA09237 (930 repeticiones). El indicador de peso molecular es un indicador de 100 bp (Invitrogen). Nota: Es difícil ver bandas de fragmentos PCR grandes en este gel de agarosa al 3 %. Esos fragmentos son visibles en geles de agarosa de porcentaje más bajo o en un instrumento de electroforesis de microgel (ver figura 8).

2. Análisis con electroforesis de microgel

Puede determinarse el tamaño de los fragmentos PCR usando instrumentos de electroforesis de microgel. FragilEase amplifica enérgicamente las secuencias de repetición muy ricas en GC de muestras con mutación completa tanto para muestras de mujer (figura 7) como de hombre (figura 8). Las muestras de mujer con dos alelos normales pueden resolverse (figura 9) en el ámbito de la especificación técnica del instrumento de electroforesis de microgel usado en el análisis. Algunas muestras de mujer con tamaños de repetición cercanos o iguales en tamaño de repetición aparecerán como un pico de fragmentos PCR. Puesto que FragilEase amplifica enérgicamente los alelos con mutación completa, las muestras de mujeres con un pico de fragmentos PCR se clasifican como normales y no tendrían que reflejarse en el análisis Southern Blot.

ETC INTERNACIONAL S.A.
LILIANA F. DE RAVEGLIA
FODORADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
JUBAL E. BAGNARELLI
COORDINADOR TÉCNICO
MÉDICO
MESA DE PROD. MED.

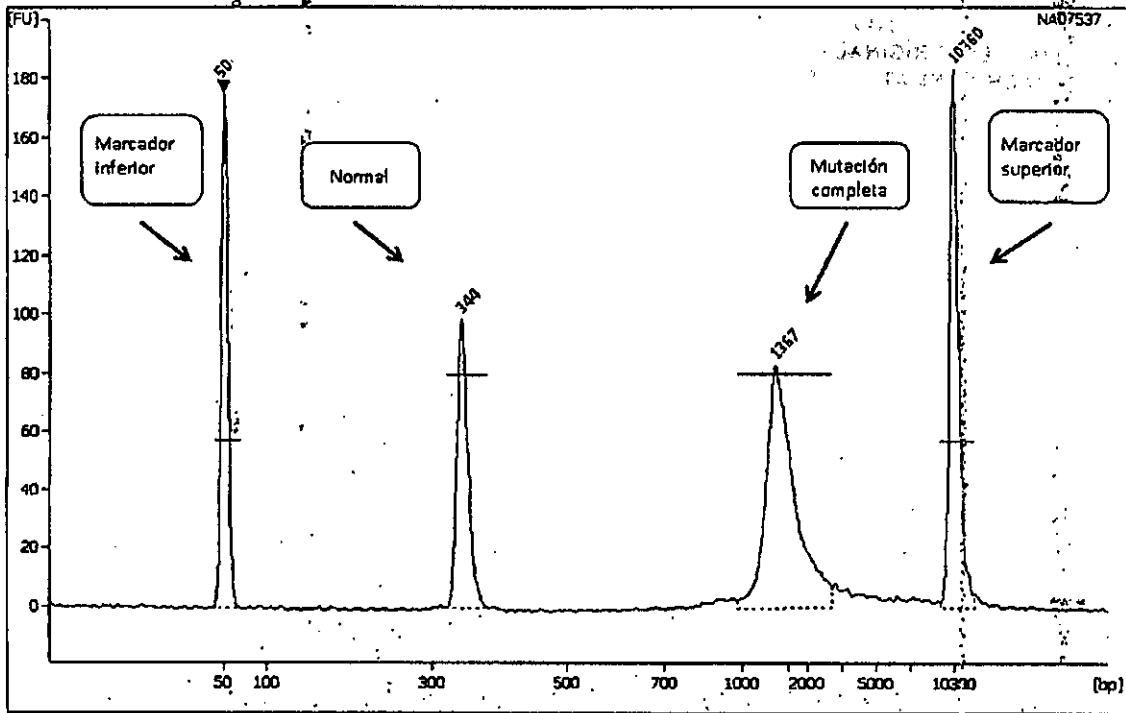


Figura 7. Análisis de microgel de la muestra X frágil de Coriell de mujer NA07537 (28 y 336 repeticiones) después de la amplificación con reactivos FragilEase y limpieza de PCR. Ver el correspondiente análisis de gel de agarosa para esta muestra en la figura 5.

ETC INTERNACIONAL S.A.
LILIANA F. [Signature]
APD [Signature]

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANIBAL B. BAGNARELLI
COORDINADOR TÉCNICO
BIOQUÍMICO
M.R. 676-b

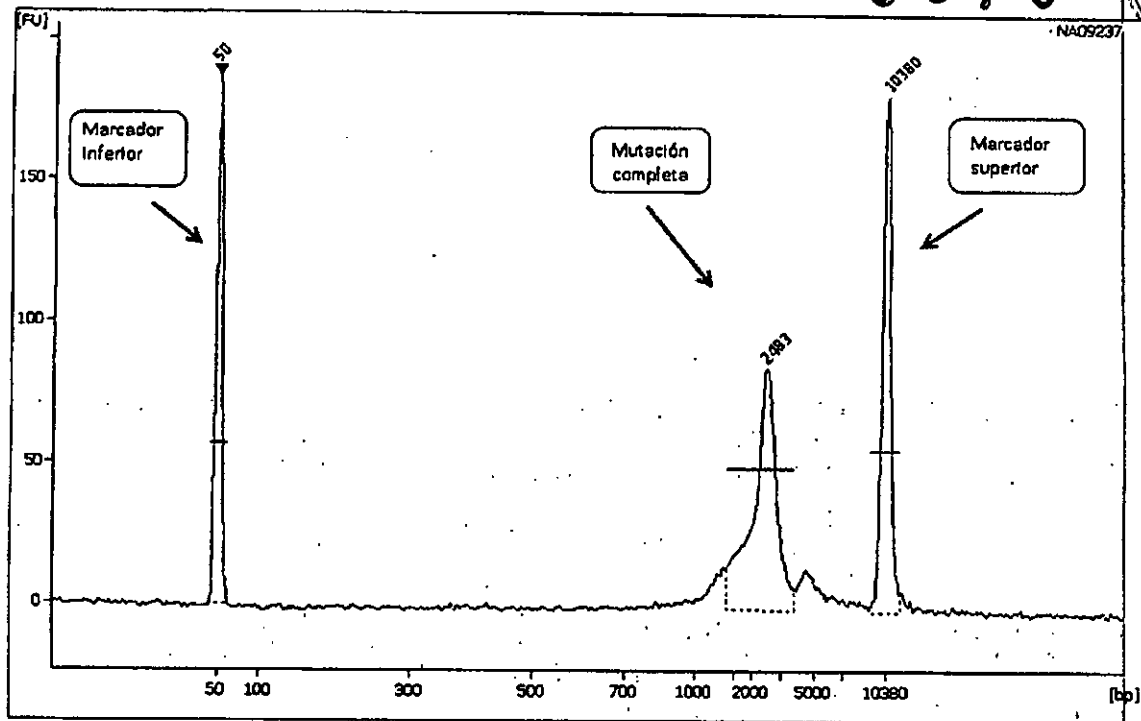
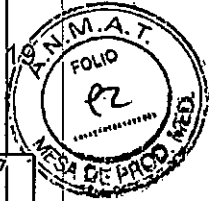


Figura 8. Análisis de microgel de la muestra X frágil de Coriell de hombre NA09237 (930 repeticiones) después de la amplificación con reactivos FragilEase y limpieza de PCR. Ver el correspondiente análisis de gel de agarosa para esta muestra en la figura 6.

ETC INTERNACIONAL S.A.
MILANO V. DE PAVEGLIA
APODERADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANIBAL E. BAGNARELLI
CO-DIRECTOR TECNICO
BIODINAMICO
MILANO 1974

Handwritten initials and a checkmark.

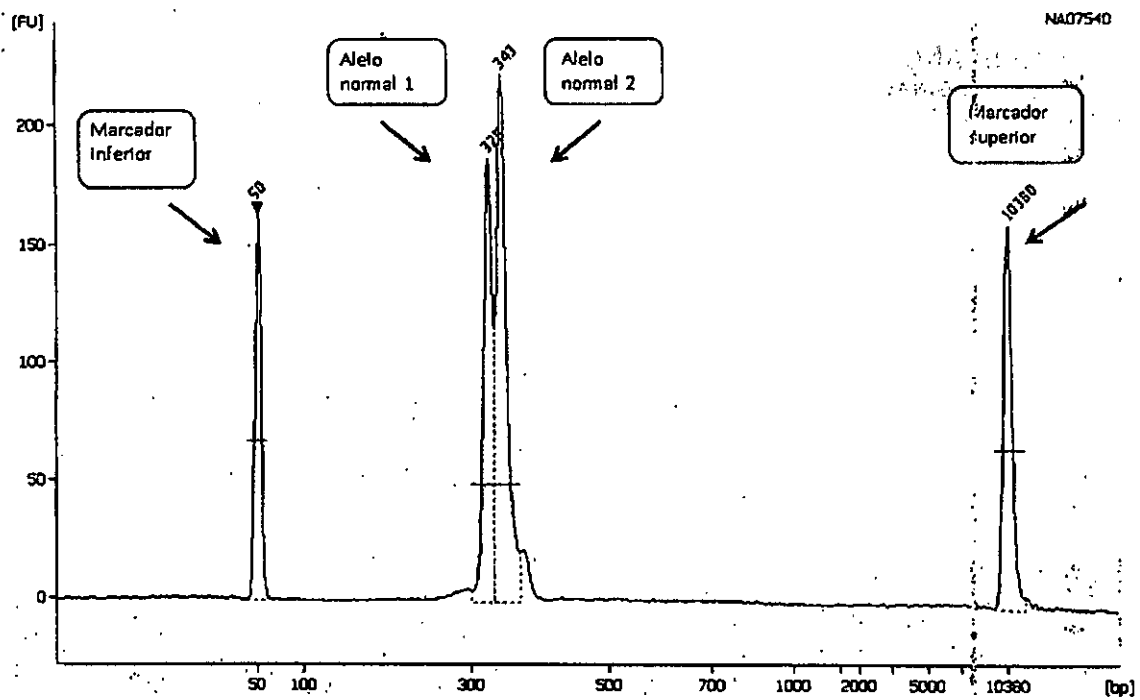


Figura 9. Análisis de microgel de la muestra X frágil de Coriell de mujer NA07540 (23 y 29 repeticiones) después de la amplificación con reactivos FragilEase y limpieza de PCR. Ver el correspondiente análisis de gel de agarosa para esta muestra en la figura 5.

3. Análisis con electroforesis capilar

Los reactivos FragilEase contienen un cebador con marcador FAM para ayudar en la detección con un instrumento adecuado de electroforesis capilar.

ETC INTERNACIONAL S.A.
LILIANA F. DE RAVEGLIA
APODERADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANIBALE BIGNARELLI
CO-DIRECTOR TECNICO
BIOQUIMICO
N.R. 378-B

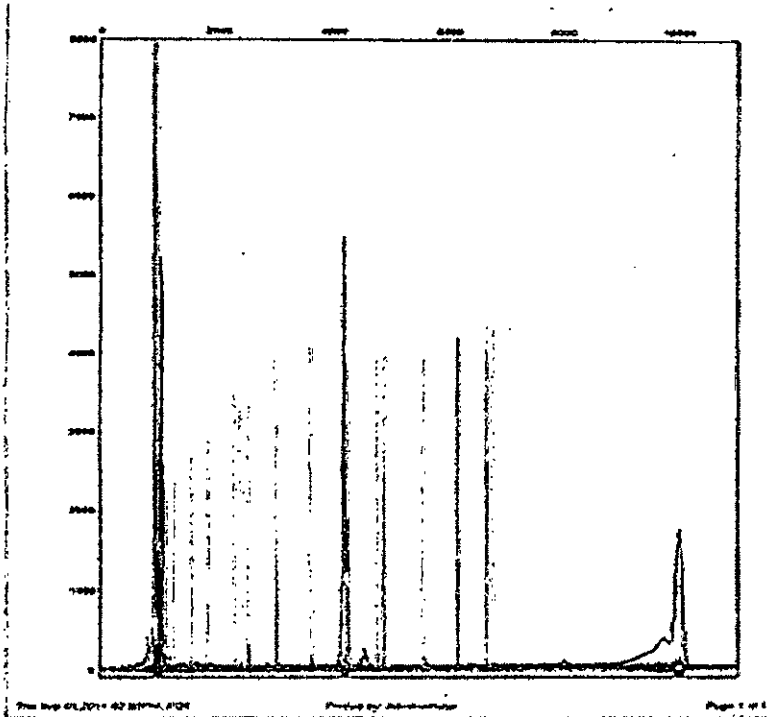
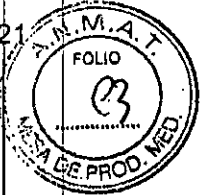


Figura 10. Electroferograma a partir de un instrumento de electroforesis capilar adecuado de una muestra de ADN de X frágil de Coriell de mujer. La muestra (NA20239) tiene un alelo normal de 20 repeticiones y un alelo con mutación completa de 200 repeticiones. El indicador de peso molecular (ladder) de ADN utilizado es LIZ 500.

ETC INTERNACIONAL S.A.
LUANA F. DE RAVEGLIA
ACREDITADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANICAL E. BAGNARELLI
CO-DIRECTOR TECNICO
BIOQUIMICO
ANAL. REG. N.

↓
A

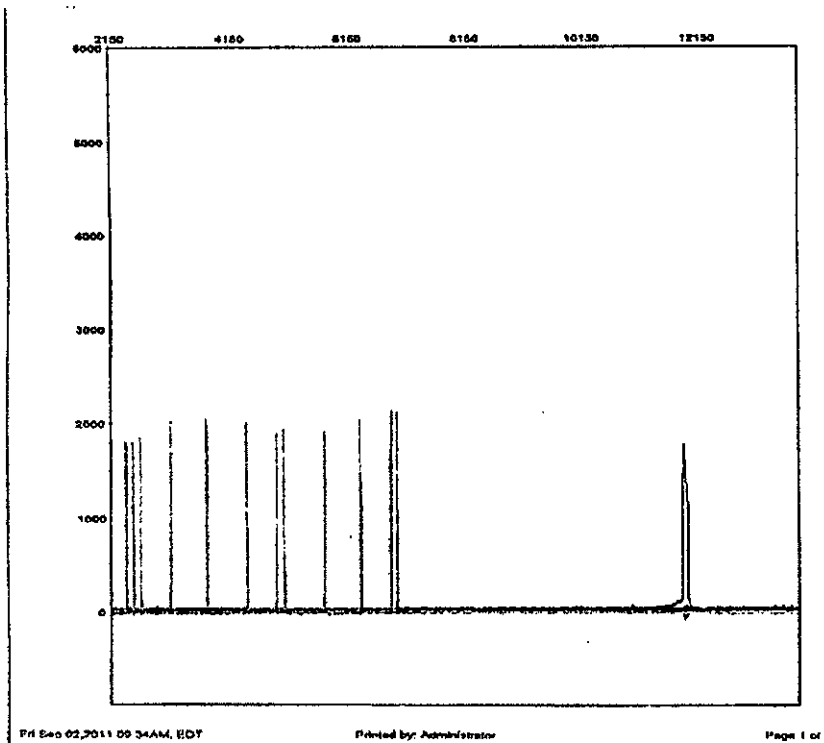


Figura 11. Electroferograma a partir de un instrumento de electroforesis capilar adecuado de una muestra de ADN de X frágil de Coriell de mujer. La muestra (NA04025) tiene un alelo con mutación completa de 645 repeticiones. El indicador de peso molecular (ladder) de ADN utilizado es LIZ 500.

CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL ENSAYO

Sensibilidad analítica

Se determinó la sensibilidad analítica para una muestra de hombre con mutación completa (342 repeticiones) mediante la dilución del ADN con una segunda muestra de hombre normal (30 repeticiones). La muestra de ADN con mutación completa y la normal se mezclaron en proporciones del 10 %, 7.5 %, 5 %, 2.5 %, 1 % y 0.5 %. Estas muestras con pseudomosaico se amplificaron usando 150, 100, 80, 60, 40, 20, 10 y 5 ng de ADN. El límite de detección de la mutación completa fue a una mezcla del 2.5 % y 40 ng de ADN de entrada (figura 12). Se obtuvo una sólida detección de la mutación completa en una mezcla al 2.5 % con mayor entrada de ADN.

ETC INTERNACIONAL S.A.
LIZIANA F. DE RAVEGLIA
APODERADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANISAL E. BAGINARELLI
CO-DIRECTOR TÉCNICO
BIOQUÍMICO
M.K. 678-B

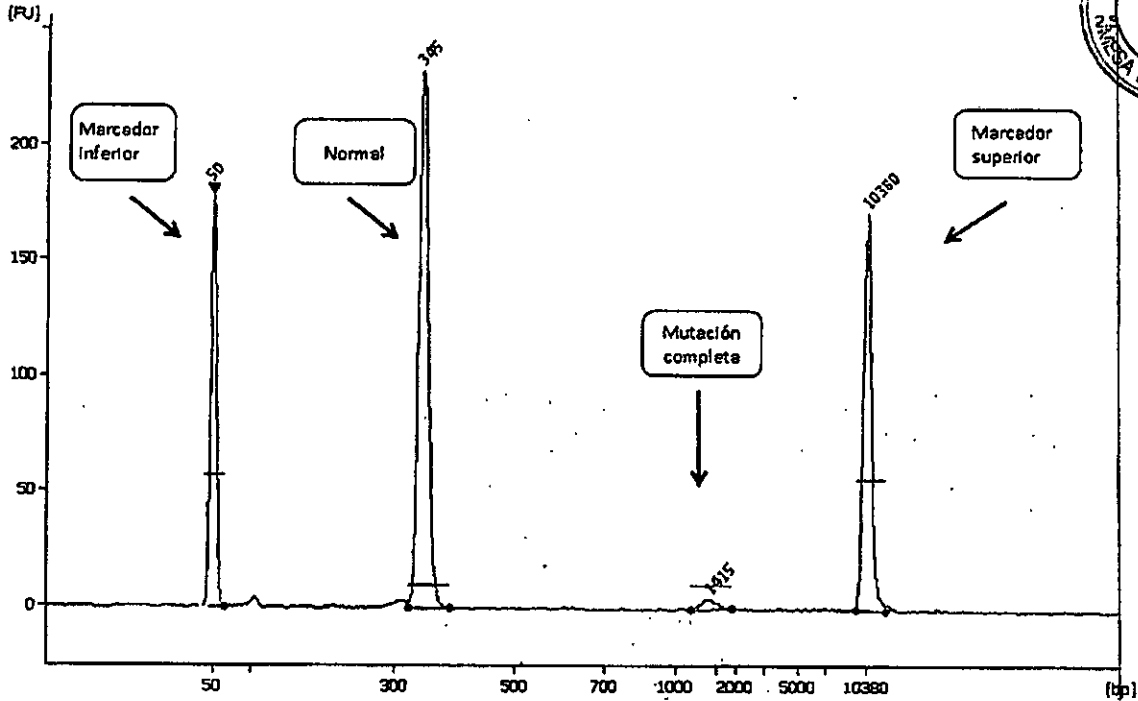


Figura 12. Detección mínima de mosaico; mezcla al 2.5 %, 40 ng de ADN de entrada.

Reproducibilidad

Se ensayó la reproducibilidad del PCR y la determinación de la repetición en ocho muestras de hombre y ocho de mujer en todas las categorías de clasificación clínica. La amplificación y el análisis fueron realizados por dos operadores usando distintos termocicladores e instrumentos de electroforesis de microgel cuatro días distintos durante un periodo de siete días para un total de ocho placas PCR de amplificación y análisis. Para cada placa, se ensayaron las 16 muestras por triplicado. Se ensayaron 384 amplificaciones de PCR en total. Los tamaños de fragmento de cada alelo se midieron en un instrumento de electroforesis de microgel y se calculó el tamaño de repetición. Todas las muestras se clasificaron en la categoría correcta. La varianza de tamaño de fragmento de los alelos normales en promedio fue de 2.2 % CV y osciló entre 0.2 % CV y 2.8 % CV. La varianza de tamaño de fragmento de los alelos con premutación en promedio fue de 2.5 % CV y osciló entre 1.9 % CV y 3.0 % CV. La varianza de tamaño de fragmento de los alelos con mutación completa en promedio fue de 4.4 % CV y osciló entre 3.6 % CV y 4.8 % CV.

Precisión de la determinación del tamaño

Se amplificaron por triplicado una variedad de muestras de referencia con tamaño de repetición de cada categoría de clasificación clínica con FragilEase y se analizaron en un instrumento de electroforesis de microgel para determinar el tamaño de fragmento. Se obtuvieron muestras de tres depósitos distintos de muestras biológicas, Coriell Institute for

ETC INTERNACIONAL S.A.
 ANA E. DE RAVEGLIA
 APROBADO

46

ETC INTERNACIONAL S.A.
 ANA E. DE RAVEGLIA
 COORDINADOR TÉCNICO
 BIOQUÍMICA
 M.A. 870-8

Medical Research (Camden, NJ, USA) [12], National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, South Mimms, Hertfordshire, UK) [13] y American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Los tamaños de repetición se calcularon a partir de los tamaños de fragmento medidos (tabla 4). Todas las muestras fueron clasificadas con un 100 % de concordancia con la clasificación de referencia. Todas las muestras se encontraban en la especificación de precisión de la determinación de tamaño de ± 10 % para el instrumento de electroforesis de microgel excepto en una muestra, 07/170, que tenía un tamaño mayor que el valor medio determinado para esta muestra. Esta muestra medida por análisis Southern Blot osciló en tamaño entre 353-960 repeticiones. Otra muestra, 07/120, tenía dos picos normales que no se resolvieron como dos picos y se notificó como un pico. Esta muestra tiene alelos normales que difieren de media nueve repeticiones. Esta diferencia de tamaño no puede ser resuelta por el instrumento de electroforesis de microgel utilizado. La especificación del instrumento para la resolución de la determinación de tamaño es ± 10 % para 150-500 bp, ± 15 % para 500-1500 bp y ± 20 % para 1500-5000 bp.



ETC INTERNACIONAL S.A.
LILIANA F. DE RAVEGLIA
ASISTENTE



ETC INTERNACIONAL S.A.
ANIBAL E. BIGNARELLI
CO-DIRECTOR TECNICO
BIOQUIMICO
M.D. 270-D


Tabla 4.

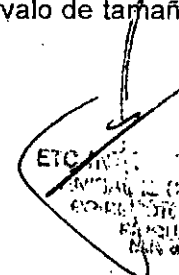


	Sample	Repeat size	
		Reference	FragilEase
Coriell	NA07174	30	28
	NA06892	86	89
	NA20233	117	112
	NA06852	342	309
	NA07538	29 29	28
	NA20240	30 80	30 84
	NA20239	20 200	17 199
	NA07537	28 336	29 316
NIBSC	07/174	114	120
	07/170	754	1022
	07/120	22 31	29
	07/122	33 113	35 119
	07/168	38 346	40 353
ATCC	CRL2704D	31	30
		59	62

Intervalo detectable del tamaño de repetición

Teóricamente, los tamaños de repetición de hasta 3000 repeticiones pueden ser detectados por un instrumento de electroforesis de microgel, ya que este tamaño todavía se encuentra dentro del marcador superior (10,380 bp) utilizado. El pico de repetición más grande detectado usando reactivos FragilEase es de 1022 repeticiones (ver tabla 4). En general, los picos de mutación completa son picos muy amplios y el punto de pico más alto se notifica como tamaño de repetición en lugar de notificar el intervalo de tamaños de pico.


 ETC INTERNACIONAL S.A.
 MELISSA F. DE RAVEGLIA
 APODERADO


 ETC INTERNACIONAL S.A.
 MELISSA F. DE RAVEGLIA
 APODERADO

4 ↓

Intervalo de entrada de ADN

Se ensayó el intervalo de entrada de ADN entre 5 ng y 150 ng para una muestra de hombre con mutación completa. Se analizaron los productos PCR en un instrumento de electroforesis de microgel. La altura de pico del producto PCR para las diferentes entradas de ADN se muestra en la figura 13. La altura de pico, una medida de la solidez del PCR, es mejor con entradas de muestra entre 40 ng y 150 ng. La cantidad de entrada de ADN recomendada es entre 50–100 ng por PCR de 20 μ L. Cantidades de ADN superiores a 150 ng por reacción PCR de 20 μ L han mostrado una pobre amplificación de alelos de repetición grande.

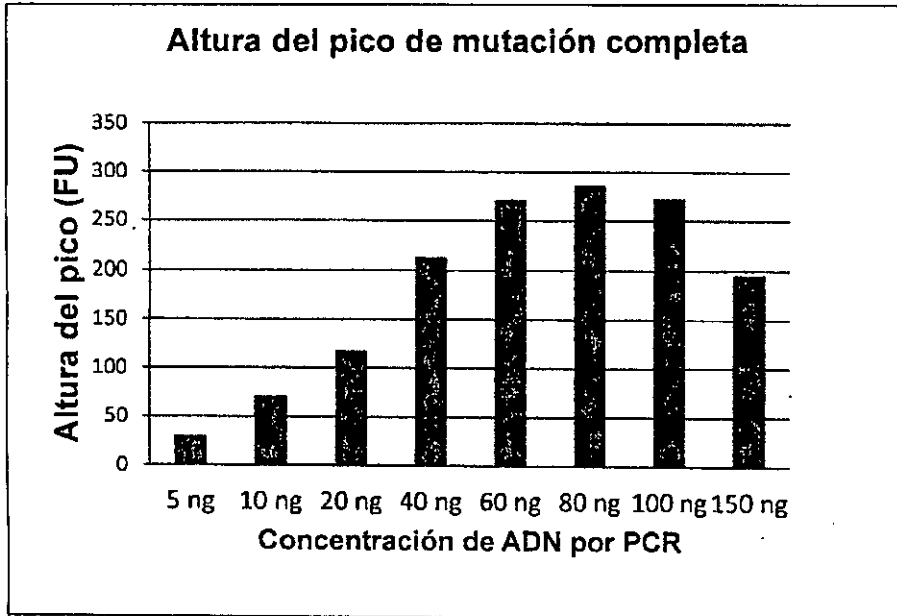


Figura 13. Determinación del pico del alelo con mutación completa para PCR con diferente ADN de entrada.

Rendimiento clínico

Se ensayaron los reactivos PCR de FragilEase en 198 muestras clínicas. Estas muestras clínicas se ensayaron en un laboratorio externo mediante métodos de PCR y Southern Blot. Los resultados del laboratorio externo se compararon directamente con los resultados obtenidos con reactivos FragilEase. El conjunto de muestras fue ciego para el ensayo FragilEase. El conjunto de muestras contenía 99 muestras de hombre y 99 de mujer. La mayoría de las muestras eran de la categoría de clasificación normal (~84 %) y el resto eran muestras representativas de las categorías mutacionales de mutación intermedia, premutación y mutación completa. Dos muestras de mujer no lograron producir ningún resultado tras dos tandas de PCR. La tasa de ensayos sin resultado fue del 1 % (2/198). Los tamaños de repetición calculados a partir de los tamaños de los picos de fragmentos medidos se clasificaron como mutaciones completas usando las directrices ACMG o las directrices CMGS/ESHG (ver tabla 5). Las muestras con mutación completa determinadas por análisis Southern Blot, así como las muestras premutación, fueron concordantes al 100% con los resultados obtenidos del ensayo FragilEase usando tanto

APODERADO

ETC INTERNATIONAL S.A.
ANIMAL E. BIGNARELLI
CO-ORDINADOR TECNICO
BIOQUIMICO

las directrices ACMG (tabla 6) como las directrices CMGS (tabla 6). Además, las muestras con mosaico fueron fácilmente detectables (ver figura 14).

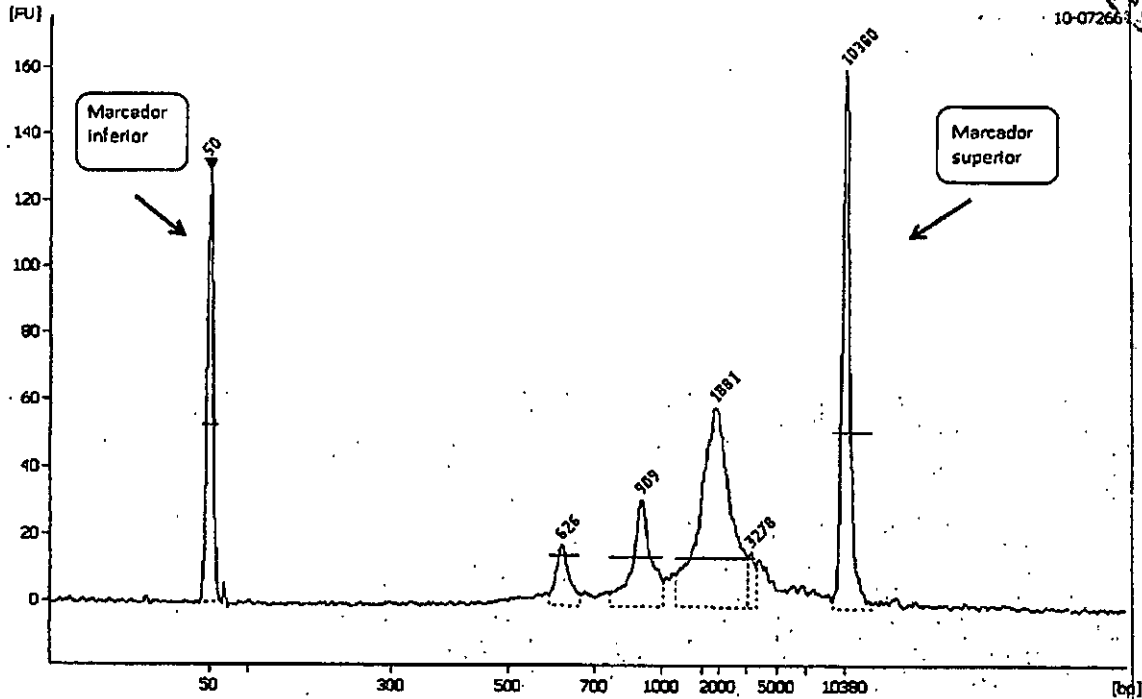


Figura 14. Mutación completa con mosaico de muestra clínica de hombre.

Tabla 5. Clasificación por categorías del American College of Medical Genetics y la Sociedad Europea de Genética Humana con respecto a tamaños de repetición.

Categoría de genotipos	Directrices ACMG	Directrices CMGS/ESHG
Normal	<45	<50
Intermedia	45-54	50-58
Premutación	55-200	59-200
Mutación completa	>200	>200

Tabla 6. Comparación de resultados clasificados por categorías (mutaciones completas) ACMG y CMGS/ESHG.

		Comparativa		
		Repeticiones >200	Repeticiones ≤ 200	Total
FragilEase	Repeticiones >200	11	0	11
	Repeticiones ≤ 200	0	185	185
	Total	11	185	196

ETC INTERNACIONAL S.A.
LILIANA F. DE RAVEGLIA
APODERADO

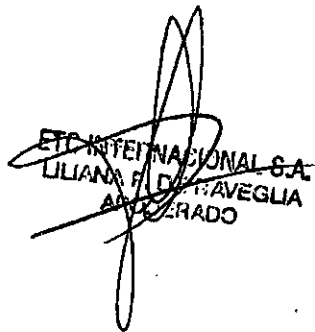
ETC INTERNACIONAL S.A.
ANISILE BACARELLI
COORDINADOR TÉCNICO
BIQUÍMICO

[Handwritten signature]

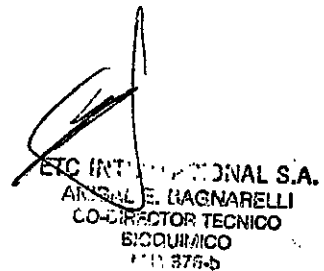
GARANTÍA

Los resultados aquí presentados se han obtenido por el procedimiento de ensayo indicado. Cualquier cambio o modificación en el procedimiento no recomendado por el fabricante puede afectar a los resultados, en cuyo caso Wallac Oy y sus filiales declinan cualquier responsabilidad y garantía otorgada, expresa o tácita, sobre la comercialización del producto y su uso.

En tal caso, Wallac Oy, sus filiales y sus distribuidores autorizados no asumen ninguna responsabilidad por los daños o perjuicios directos o indirectos.



ETC INTERNACIONAL S.A.
LILIANA R. DE NAVEGLIA
AUTORIZADO



ETC INTERNACIONAL S.A.
ARNALDO E. DAGNARELLI
CO-DIRECTOR TECNICO
BIOQUIMICO
TEL. 876-5

h



REFERENCIAS

- [1] Verkerk, A.J., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Fu, Y.H., Kuhl, D.P., Pizzutti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M.F., Zhang, F.P., et al. (1991): Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* **65**, 905-914.
- [2] Fu, Y.H., Kuhl, D.P., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Richards, S., Verkerk, A.J., Holden, J.J., Fenwick, R.G. Jr, Warren, S.T., et al. (1991): Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* **67**, 1047-1058.
- [3] Oberle, I., Rousseau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, D., Hanauer, A., Boue, J., Bertheas, M., Mandel, J. (1991): Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* **252**, 1097-1102.
- [4] Pfeiffer, B.E., Zang, T., Wilkerson, J.R., Taniguchi, M., Maksimova, M.A., Smith, L.N., Cowan, C.W., Huber, K.M., et al. (2010): Fragile X mental retardation protein is required for synapse elimination by the activity-dependent transcription factor MEF2. *Neuron* **66**, 191-197.
- [5] Bear, M.F., Huber, K.M., Warren, S.T., et al. (2004): The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends in Neurosciences* **27**, 370-377.
- [6] Hagerman, R.J., Physical and behavioral phenotype In: *Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment, and Research*, R.J. Hagerman and P.J. Hagerman, eds., pp. 3-109, The John Hopkins University Press, Baltimore, Md, USA, 3rd edition, 2002.
- [7] Nolin, S.L., Brown, W.T., Glicksman, A., Houck, G.E. Jr, Gargano, A.D., Sullivan, A., et al. (2003): Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 454-464.
- [8] Conway, G.S. (2010): Premature ovarian failure and FMR1 gene mutations: an update. *Ann. Endocrinol.* **71**, 215-217.
- [9] Garcia-Arocena, D., Hagerman, P.J. (2010): Advances in understanding the molecular basis of FXTAS. *Hum. Mol. Genet.* **19**, R83-R89.
- [10] Bourgeois, J.A., Coffey, S.M., Rivera, S.M., et al. (2009): A review of fragile X premutation disorders: expanding the psychiatric perspective. *J. Clin. Psychiatry.* **70**, 852-862.
- [11] Adler, K., Moore, J.K., Filippov, G., Wu, S., Carmichael, J., Schermer, M. (2011): A Novel Assay for Evaluating Fragile X Locus Repeats. *J. Mol. Diagn.* **13**, 614-620.
- [12] Wilson, J.A., et al. (2008): Consensus Characterization of 16 FMR1 Reference Materials: A Consortium Study. *J. Mol. Diagn.* **10**, 2-12.
- [13] Hawkins, M., et al. (2011): Preparation and validation of the first WHO international genetic reference panel for Fragile X syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **19**, 10-17.

ETC INTERNACIONAL S.A.
 URSULA DE PAVEGLIA
 APODERADO

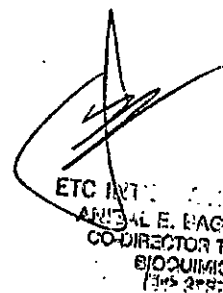
ETC INTERNACIONAL S.A.
 URSULA DE PAVEGLIA
 APODERADO

- [14] Clinical and Laboratory Standards Institute (2005): Collection, Transport, Preparation and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline. CLSI Document MM13-A. CLSI, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.
- [15] Dissing, J., Søndervang, A., Lund, S. (2010): Exploring the limits for survival of DNA in blood stains. J. Forensic Leg. Med. 17, 392-396.
- [16] Clinical and Laboratory Standards Institute (2007): Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Programs; Approved Standard – Fifth Edition; CLSI Document LA4-A5. CLSI, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.

Última revision marzo 2013



ETC INTERNACIONAL S.A.
LILIANA F. DE RAMEGLIA
APODERADO



ETC INTERNACIONAL S.A.
ARNALDO E. BAGNARELLI
CO-DIRECTOR TECNICO
BIOQUIMICO
1985-2008

l

93791



Rotulos Externo

FragilEase Fragile X PCR Kit 3101-0010

FragilEase PCR Buffer Mix solución mezcla de buffer PCR FragilEase, 2 viales 800 ul

FragilEase Polimerasa, 1 vial Polimerase FragilEase 45 ul

Sample Diluent, Diluyente de muestra 1 vial 1000ul

CE IVD Σ 1153 -30...14°C

Elaborado por - Wallac Oy, Mustionkatu 6, FI-20750 Turku - Finlandia
 Distribuidores exclusivos: ETC Internacional S.A. Administración y Depósito: Allende 3274, (C1417BMV), Buenos Aires, Argentina. Director Técnico: Fann. Roberto A. Raveglia
 Autorizado por la ANMAT Certificado N°:

FragilEase Fragile X PCR Kit 3101-001B

FragilEase PCR Buffer Mix solución mezcla de buffer PCR FragilEase, 24 viales

FragilEase Polimerasa, 12 viales Polimerase FragilEase

Sample Diluent, Diluyente de muestra 12 viales

CE IVD Σ 1152 -30...-16°C

Elaborado por - Wallac Oy, Mustionkatu 6, FI-20750 Turku - Finlandia
 Distribuidores exclusivos: ETC Internacional S.A. Administración y Depósito: Allende 3274, (C1417BMV), Buenos Aires, Argentina. Director Técnico: Fann. Roberto A. Raveglia
 Autorizado por la ANMAT Certificado N°:

ETC INTERNACIONAL S.A.
 LICENCIADA F. DE RAVEGLIA
 APODERADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
 ANITA E. MAGNARELLI
 DIRECTOR TÉCNICO
 MICROQUÍMICA
 M.J. 870-1

[Handwritten marks]



9.3.79

Rótulos Internos

FragilEase PCR Buffer Mix 1

800µL χ -30 --16°C

IVD Wallac Oy
Turku, Finland

Exp.date Lot no.

Elaborado por - Wallac Oy, Mustionkatu 6, FI-20750 Turku- Finlandia

FragilEase Polymerase

45µL χ -30 --16°C 1

IVD Wallac Oy
Turku, Finland

Exp.date Lot no.

Elaborado por - Wallac Oy, Mustionkatu 6, FI-20750 Turku- Finlandia

Sample Diluent 1

1000µL χ -30 --16°C

IVD Wallac Oy
Turku, Finland

Exp.date Lot no.

Elaborado por - Wallac Oy, Mustionkatu 6, FI-20750 Turku- Finlandia

ETC INTERNACIONAL S.A.
LILIANA F. DE RAVEGLIA
APODERADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANIBAL E. MAGNARELLI
COORDINADOR TECNICO
BIOQUIMICO



CERTIFICADO DE AUTORIZACION DE VENTA
DE PRODUCTOS PARA DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO


Expediente nº:1-47-3110-630/15-7

Se autoriza a la firma ETC INTERNACIONAL S.A. a importar y comercializar el Producto para Diagnóstico de uso "in vitro" denominado FragilEase™ Fragile X PCR Kit / amplificar y detectar la secuencia repetida del trinucleótido citosina-guanina-guanina (CGG) en la región 5' no traducida del gen Fragile X Mental Retardation-1 (FMR1), en envases conteniendo FragilEase PCR Buffer Mix (2 X 800 µl), FragilEase Polymarase (45 µl), Sample Diluent (1000 µl), para 96 determinaciones ó FragilEase PCR Buffer Mix (24 X 800 µl), FragilEase Polymarase (12 x 45 µl), Sample Diluent (12 x 1000 µl), para 1152 determinaciones. Se le asigna la categoría: Venta a laboratorios de Análisis clínicos por hallarse comprendido en las condiciones establecidas en la Ley 16.463, y Resolución M.S. y A.S. Nº 145/98. Lugar de elaboración: Wallac Oy, Mustionkatu 6, FI-20750 Turku (FINLANDIA). Periodo de vida útil: 18 (DIECIOCHO) MESES desde la fecha de elaboración, conservado entre -30 a -16°C .En las etiquetas de los envases, anuncios y Manual de instrucciones deberá constar PRODUCTO PARA DIAGNOSTICO DE USO "IN VITRO" USO PROFESIONAL EXCLUSIVO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACION NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA.

Certificado nº: **008324**

ADMINISTRACION NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA.

Buenos Aires, **06 NOV 2015**


DR. LEONARDO VERÓN
SUBSECRETARIO NACIONAL
DECRETO N 1368/2015
A.N.M.A.T.