República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2019 - Año de la Exportación

Disposición

Número: DI-2019-9642-APN-ANMAT#MSYDS

CIUDAD DE BUENOS AIRES
Jueves 28 de Noviembre de 2019

Referencia: 1-47-3110-5448-18-7

VISTO el expediente Nº 1-47-3110-5448-18-7 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Medica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma BIOARS S.A. solicita autorización de modificación del registro del Producto para diagnóstico de uso "in vitro" denominado: **Sistema de sondas diseñadas para detectar ciertas secuencias de ácidos nucleicos, en muestras de células o tejido embebido en parafina y fijado en formalina, mediante técnicas FISH.**

Que lo solicitado se encuadra dentro de los alcances de la Disposición ANMAT Nº 2674/99 y la documentación aportada ha satisfecho los requisitos de la normativa aplicable.

Que en el expediente de referencia consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que se autoriza la modificación solicitada.

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

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos Nº 1490/92 y sus modificatorios.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE

MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

D I S P O N E:

ARTÍCULO 1º.- Autorizase la modificación del Certificado Nº 8452 del producto para diagnóstico de uso in vitro

denominado: **Sistema de sondas diseñadas para detectar ciertas secuencias de ácidos nucleicos, en muestras de células o tejido embebido en parafina y fijado en formalina, mediante técnicas FISH,** autorizado según Disposición N° 7362/16.

ARTICULO 2º.- Acéptese la incorporación al certificado de la referencia de los nuevos productos: 2) ZytoLight SPEC TERT Dual Color Break Apart Probe y 3) ZytoLight SPEC C19MC/19p13 Dual Color Probe a los productos ya registrados; así mismo, se aceptan las nuevas formas de presentación de 1 vial x 0,05 ml para los productos ZytoLight SPEC CD274, PDCD1LG2/CEN 9 Dual Color Probe, ZytoLight SPEC MAML2 Dual Color Break Apart Probe, ZytoLight SPEC MYB Dual Color Break Apart Probe, ZytoLight SPEC MYCN/2q11 Dual Color Probe, ZytoLight SPEC PTEN/CEN 10 Dual Color Probe y ZytoLight SPEC RREB1/MYB/CEN 6 Triple Color Probe a lo ya aprobado. Apruébense rótulos y manuales de fojas 14 a 19 y 52 a 55.

ARTICULO 3°.- Autorizase los textos de los proyectos de rótulo/s y de instrucciones de uso que obran en documento N° IF-2019-90582039-APN-DNPM#ANMAT.

ARTICULO 4°.- Practíquese la atestación correspondiente en el Certificado de Inscripción Nº 8452 cuando el mismo se presente acompañado de la presente Disposición.

ARTÍCULO 5º.- Regístrese. Inscríbase en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica al nuevo producto. Por el Departamento de Mesa de Entrada, notifíquese al interesado, haciéndole entrega de la presente Disposición, conjuntamente con rótulos e instrucciones de uso autorizados. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.

Expediente Nº 1-47-3110-5448-18-7

Digitally signed by BELLOSO Waldo Horacio
Date: 2019.11.28 12:15:39 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Waldo HORACIO BELLOSO
SubAdministrador
Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2019.11.28 12:15:44 -03:00

A.N.M.A.T.
FOLIO
14
MESA DE PROD. MED.

ZYTOVISION

ZytoLight
SPEC TERT Dual Color Break Apart Probe

REF Z-2273-50 5 (0.05 ml)

Para la detección cualitativa de translocaciones que implican la región cromosómica 5p15.33 que alberga el gen TERT mediante hibridación fluorescente in situ (FISH)

CE IVD

Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
Según la directiva de la UE 98/79 / EC

1. Uso previsto

ZytoLight SPEC TERT Dual Color Break Apart Probe (PL229) está destinado para la detección cualitativa de translocaciones que implican la región cromosómica 5p15.33 que alberga el gen TERT, en muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina mediante hibridación fluorescente in situ (FISH). La sonda está diseñada para ser utilizada en combinación con ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20).

La interpretación de los resultados debe hacerse dentro del contexto de la historia clínica del paciente con respecto a los datos clínicos y patológicos adicionales del paciente por un patólogo cualificado.

2. Relevancia Clínica

El gen TERT (transcriptasa inversa de la telomerasa, a.k.a. EST2, TCS1) codifica el componente transcriptasa inversa, un dominio catalítico de la enzima telomerasa. Las telomerasas son necesarias para mantener los extremos de los cromosomas y son inactivas en la mayoría de las células somáticas, pero activas en las células cancerosas. La remodelación del contexto genómico, debido a reordenamientos 5p15.33, anula el silenciamiento transcripcional del gen TERT. Las translocaciones TERT son la segunda aberración común encontrada en neuroblastomas. Estas translocaciones se observan en una región proximal de 50 kb o más raramente en una región de 40 kb distal al gen. Los estudios de genética molecular mostraron que los reordenamientos de la región cromosómica 5p15.33 ocurren exclusivamente en neuroblastomas de alto riesgo. Por lo tanto, se considera que los reordenamientos TERT definen un subgrupo de neuroblastomas de alto riesgo con un mal pronóstico. Los reordenamientos de TERT se encuentran en carcinomas de células renales cromófobas, linfomas no Hodgkin y linfomas de células de manto. FISH es una herramienta adecuada para la detección de estos reordenamientos TERT y, por lo tanto, puede tener relevancia pronóstica.

3. Principio del ensayo

La técnica de hibridación in situ por fluorescencia (FISH) permite la detección y visualización de secuencias específicas de ácidos nucleicos en preparaciones celulares. Los fragmentos de DNA marcados fluorescentemente, las denominadas sondas FISH, y sus cadenas de DNA diana complementarias, en las preparaciones, se co-desnaturalizan y posteriormente se vuelven a unir durante la hibridación. Posteriormente, los fragmentos de sonda inespecíficos y no unidos se eliminan mediante etapas de lavado rigurosas. Después de la contratinción del DNA con DAPI, se visualizan fragmentos de sonda hibridados usando un microscopio de fluorescencia equipado con filtros de excitación y emisión específicos para los fluorocromos con los cuales los fragmentos de sonda FISH han sido marcados directamente.

4. Reactivos suministrados

ZytoLight SPEC TERT Dual Color Break Apart Probe está compuesta por:

- Polinucleótidos marcados con ZyGreen (excitación 503 nm/emisión 528 nm) (~10.0 ng/µl), cuyas secuencias diana mapean en 5p15.33* (chr5:620,184-1.161,456) distal a la región de punto de corte de TERT (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos marcados con ZyOrange (excitación 547 nm/emisión 572 nm) (~4.5 ng/µl), cuyas secuencias diana mapean en 5p15.33* (chr5:1,353,007-1,588,209) proximal a la región de punto de corte de TERT (ver Fig. 1).
- Buffer de hibridación a base de formamida

* Según la Asamblea del Genoma Humano GRCh37 / hg19

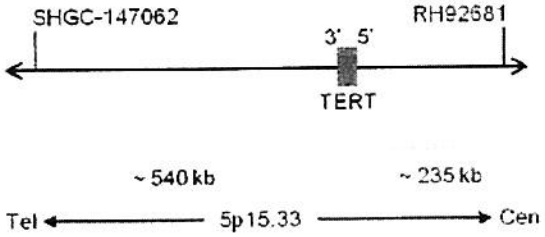


Fig. 1: Mapa de la sonda SPEC TERT Probe (No a escala)

ZytoLight SPEC TERT Dual Color Break Apart Probe está disponible en una presentación:

- Z-2273-50: 0.05 ml (5 reacciones de 10 µl cada una)

5. Materiales requeridos, pero no suministrados

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20)
- Muestras de control positivo y negativo
- Portaobjetos para microscopio, cargados positivamente
- Baño de agua (37°C, 98°C)
- Placa caliente o hibridador
- Hibridador o cámara de humedad en el horno de hibridación
- Pipetas ajustables (10 µl, 25 µl)
- Jarras o baños de tinción
- Cronómetro
- Termómetro calibrado
- Etanol o alcohol reactivo
- Xileno
- Agua desionizada o destilada
- Cubreobjetos (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Adhesivo de goma, ej., Fixogum Rubber Cement
- (Prod. No. E-4005-50/-125) o similar
- Microscopio de fluorescencia con mantenimiento adecuado (400-1000x)
- Aceite de inmersión aprobado para microscopía de fluorescencia
- Filtros apropiados

6. Almacenamiento y manipulación

Conservar a 2-8°C en posición vertical y protegido de la luz.
Utilizar protegido de la luz. Volver a las condiciones de almacenamiento inmediatamente después del uso. No utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El dispositivo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se maneja en adecuadamente.

IF-2019-90582039-APN-DNPM#ANMAT

A.N.M.A.T. FOLIO MESA DE PROD. MED.

7. Advertencias y precauciones

- ¡Lea las instrucciones de uso antes de utilizar!
- ¡No utilice los reactivos después de haber alcanzado la fecha de caducidad!
- Este producto contiene sustancias (en bajas concentraciones y volúmenes) que son perjudiciales para la salud y potencialmente infecciosas. Evite cualquier contacto directo con los reactivos. ¡Tome las medidas de protección apropiadas (use guantes desechables, gafas protectoras y prendas de laboratorio)!
- Si los reactivos entran en contacto con la piel, enjuague inmediatamente con abundante cantidad de agua.
- Una hoja de datos de seguridad del material está disponible a petición del profesional usuario.
- No reutilice los reactivos.
- Evite la contaminación cruzada de las muestras ya que esto puede dar lugar a resultados erróneos.
- La sonda no debe ser expuesta a la luz, especialmente la luz fuerte, durante un período de tiempo más largo, es decir, todos los pasos deben ser logrados, en lo posible, en la oscuridad y / o utilizando contenedores a prueba de luz!

Indicaciones de peligro y precaución:
El componente determinante del peligro es la formamida.

Peligro

H351	Se sospecha que causa cáncer.
H360FD	Puede dañar la fertilidad. Puede dañar al feto.
H373	Puede causar daño a los órganos por exposición prolongada o repetida.
P201	Obtenga instrucciones especiales antes de usar.
P202	No manipular hasta que se hayan leído y comprendido todas las precauciones de seguridad.
P260	No respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.
P280	Use guantes de protección/ropa de protección/protección ocular/protección facial.
P308+P313	En caso de exposición o peligro: Consulte a un médico.
P405	Almacene cerrado.

8. Limitaciones

- Para uso diagnóstico in vitro.
- Sólo para uso profesional.
- La interpretación clínica de cualquier tinción positiva, o su ausencia, debe realizarse dentro del contexto de la historia clínica, morfología, otros criterios histopatológicos y otras pruebas diagnósticas. Es responsabilidad de un patólogo calificado familiarizarse con las sondas FISH, reactivos, paneles de diagnóstico y métodos utilizados para producir la preparación teñida. La tinción debe realizarse en un laboratorio certificado y con licencia bajo la supervisión de un patólogo responsable de revisar las muestras teñidas y asegurar la idoneidad de los controles positivos y negativos.
- La tinción de la muestra, especialmente la intensidad de la señal y la tinción de fondo, depende de la manipulación y procesamiento de la muestra antes de la tinción. La incorrecta fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento, seccionamiento o contaminación con otros especímenes o fluidos pueden producir artefactos o resultados falsos. Los resultados inconsistentes pueden resultar de las variaciones en los métodos de fijación y de inclusión, así como de las irregularidades inherentes dentro de la muestra.
- La sonda debe utilizarse únicamente para detectar los loci descritos en 4. "Reactivos suministrados".
- El rendimiento se validó utilizando los procedimientos descritos en estas instrucciones de uso. Las modificaciones a estos procedimientos pueden alterar el rendimiento y tienen que ser validados por el usuario.

9. Sustancias interferentes

Las células sanguíneas presentes en la muestra pueden exhibir autofluorescencia que dificulte el reconocimiento de la señal.

Los siguientes fijadores son incompatibles con FISH:

- Fijador de Bouin
- Fijador B5
- Fijadores ácidos (por ejemplo, ácido pícrico)
- Fijador de Zenker
- Alcoholes (cuando se utilizan solos)
- Cloruro de mercurio
- Fijador Formaldehído/zinc
- Fijador de Hollande
- Formalina no-tamponada

10. Preparación de las muestras

Recomendaciones:

- Fijación en formol tamponado neutro al 10% durante 24 h a temperatura ambiente (18-25 °C).
- Tamaño de la muestra ≤ 0.5 cm^3.
- Utilice parafina de primera calidad.
- La incrustación debe realizarse a temperaturas inferiores a 65 °C.
- Prepare secciones de micrótomo de 2-4 µm.
- Utilice portaobjetos de microscopio con carga positiva.
- Fijar durante 2-16 h a 50-60 °C.

11. Tratamiento preparatorio del dispositivo

El producto está listo para usar. No se requiere reconstitución, mezcla o dilución. Llevar la sonda a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de usar, protegerla de la luz. Antes de abrir el vial, mezcle agitando vórtex y centrifugar brevemente.

12. Procedimiento del ensayo

Pretratamiento de la muestra

Realice el pretratamiento de la muestra (desparafinado, proteólisis) de acuerdo con las instrucciones de uso del ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

Desnaturalización e hibridación

1. Pipetee 10 µl de la sonda sobre cada muestra pretratada.
2. Cubra las muestras con un cubreobjetos de 22 mm x 22 mm (evite las burbujas atrapadas) y selle el cubreobjetos.

Se recomienda el uso de adhesivo de goma (por ej., Fixogum) para el sellado.

3. Coloque los portaobjetos sobre una placa caliente o un hibridador y desnaturalizar las muestras por 10 min a 75 °C.
4. Transfiera el portaobjetos a una cámara de humedad e hibridar durante toda la noche a 37 °C (por ejemplo, en un horno de hibridación).

Es esencial que las muestras no se sequen durante el paso de hibridación.

Post-hibridación

Realizar el procesamiento post-hibridación (lavado, contra-tinción, microscopía de fluorescencia) de acuerdo con las instrucciones de uso del ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

IF-2019-90582039-APN-DNPM#ANMAT

A.N.M.A.T. FOLIO 16 MESA DE PROD. MED.

13. Interpretación de los resultados

Con el uso de conjuntos de filtros apropiados, las señales de hibridación de la sonda aparecen en verde (distal a la región de punto de corte de TERT) y naranja (proximal a la región de punto de corte de TERT).

Situación normal: En interfases de células normales o células sin una translocación que involucra la banda 5p15.33, aparecen dos señales de fusión verde / naranja (ver la Fig. 2).

Situación anómala: un locus 5p15.33 afectado por una translocación está indicado por una señal verde y una señal naranja separadas (ver la Fig. 2).

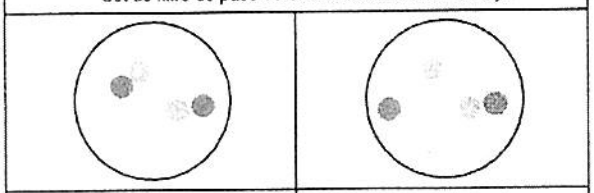
Set de filtro de paso de banda doble verde / naranja	
	
Situación Normal	Situación Anómala

Fig. 2: Resultados esperados en núcleos normales y anómalos

Se puede observar otra distribución de la señal en algunas muestras anormales, lo que podría dar como resultado un patrón de señal diferente al descrito anteriormente, que indica reordenamientos variantes. Patrones de señal inesperados deben ser investigados más a fondo.

Tener en cuenta:

- Debido a la cromatina descondensada, las señales FISH individuales pueden aparecer como pequeños grupos de señales. Por lo tanto, dos o tres señales del mismo tamaño, separadas por una distancia ≤ 1 diámetro de la señal, deben contarse como una señal.
- No evalúe los núcleos superpuestos.
- No cuente los núcleos sobre-digeridos (reconocidos por las áreas oscuras visibles dentro de los núcleos).
- No cuente núcleos con fuerte auto-fluorescencia, lo que dificulta el reconocimiento de la señal.
- Un resultado negativo o inespecífico puede ser causado por múltiples factores (véase el capítulo 17).
- Con el fin de interpretar correctamente los resultados, el usuario debe validar este producto antes de su uso en los procedimientos de diagnóstico de acuerdo con directrices nacionales y / o internacionales.

14. Procedimientos de Control de Calidad Recomendados

Con el fin de monitorear el desempeño correcto de los especímenes procesados y los reactivos de prueba, cada ensayo debe ir acompañado de controles internos y externos. Si los controles internos y / o externos fallan en demostrar la tinción apropiada, los resultados con las muestras del paciente deben ser considerados inválidos.

Control interno: Células no neoplásicas dentro de la muestra que exhiben patrón de señal normal, por ejemplo, fibroblastos.

Control externo: Muestras de control positivas y negativas validadas.

15. Características de Desempeño

Precisión: La localización de la hibridación de la sonda se evaluó sobre la extensión de la metafase de un varón cariotípicamente normal. En todas las muestras probadas, la sonda se hibridó únicamente con los loci esperados. No se observaron señales adicionales o hibridaciones cruzadas. Por lo tanto, la precisión calculada fue del 100%.

Sensibilidad analítica: Para la evaluación de la sensibilidad analítica, la sonda se evaluó sobre la extensión metafase de varones cariotípicamente normales. Todos los núcleos mostraron el patrón de señal normal en todas las muestras ensayadas. Por lo tanto, la sensibilidad analítica calculada fue del 100%

Especificidad analítica: Para la evaluación de la especificidad analítica, la sonda se evaluó sobre la extensión de la metafase de varones cariotípicamente normales. En todos los especímenes probados, todas las señales se hibridaron únicamente con los loci objetivos esperados y no en otros loci. Por lo tanto, la especificidad analítica calculada fue del 100%.

16. Eliminación de desechos

La eliminación de los reactivos debe realizarse de acuerdo con la normativa local.

17. Solución de problemas

Cualquier desviación de las instrucciones de operación puede conducir a resultados de tinción inferior o a ninguna tinción en absoluto.

Señales débiles o ninguna señal en absoluto

Causa Posible	Acción
No hay secuencias diana disponibles	Utilice controles apropiados
La muestra de células o tejidos no ha sido fijada correctamente	Optimice el tiempo de fijación y el fijado aplicar un paso posterior a la fijación como describe en el "procedimiento de ensayo" manual de ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit
Incorrecto pretratamiento térmico, hibridación, proteólisis, desnaturalización o temperatura de lavado riguroso	Compruebe la temperatura de todos los dispositivos técnicos utilizados, utilizando un termómetro calibrado
Pretratamiento proteolítico no realizado correctamente	Optimice el tiempo de incubación de pepsina, aumentar o disminuir si es necesario
Evaporación de la sonda	Cuando se utiliza un hibridador, el uso de las franjas húmedas / tanques llenos de agua es obligatorio. Cuando se utiliza un horno de hibridación, se requiere el uso de una cámara de humedad. Además, el cubreobjetos debe sellarse completamente, por ejemplo, con Fixogum, para evitar el secado de la muestra durante la hibridación.
Stringency wash buffer de baja concentración	Revise la concentración del Stringency wash buffer
Soluciones de deshidratación viejas	Prepare soluciones deshidratación frescos
Microscopio de fluorescencia mal ajustado	Ajuste correctamente
Sets de filtros utilizados inapropiados	Utilice sets de filtros apropiados para los fluoróforos de la sonda. Los sets de filtros de paso triple proporcionan menos luz en comparación con los sets de filtros de paso simple o doble. En consecuencia, las señales pueden parecer más débiles utilizando estos sets de filtros de paso triple.
Foto-daño de las sondas / fluoróforos	Realice los pasos de hibridación y lavado en la oscuridad

IF-2019-90582039-APN-DNPM#ANMAT

A.N.M.A.T. FOLIO 17 MESA DE PROD. MED.

Señales de hibridación cruzada; background (fondo) ruidoso

Causa Posible	Acción
Desparafinado incompleto	Utilice soluciones frescas; Compruebe la duración del desparafinado
Pretratamiento proteolítico muy fuerte	Reduzca el tiempo de incubación de pepsina
Volumen de la sonda por área demasiado alta	Reduzca el volumen de la sonda por sección / área, distribuir la sonda gota a gota para evitar la concentración local
Los portaobjetos se enfriaron a temperatura ambiente antes de la hibridación	Transfiera los portaobjetos rápidamente a 37 ° C
Stringency wash buffer demasiado concentrado	Revise la concentración del Stringency Wash Buffer
Temperatura de lavado después de la hibridación demasiado baja	Compruebe la temperatura; Aumente si es necesario
Deshidratación de los cortes entre las etapas individuales de incubación	Evite la deshidratación sellando los portaobjetos y realizando la incubación en ambiente húmedo

Morfología del tejido degradada

Causa Posible	Acción
La muestra de células o tejidos no ha sido fijada correctamente	Optimice el tiempo de fijación y el fijador o aplique un paso de fijación posterior como se describe en ("procedimiento de ensayo") del manual del ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit
Pretratamiento proteolítico no realizado correctamente	Optimice el tiempo de incubación de pepsina, aumente o disminuya si es necesario
Secado insuficiente antes de la aplicación de la sonda	Extienda el secado al aire

Nucleos superpuestos

Causa Posible	Acción
Espesor inapropiado de las secciones de tejido	Prepare secciones de 2-4 µm con micrótomo

Muestra flotando fuera del portaobjetos

Causa Posible	Acción
Recubrimiento del portaobjetos inadecuado	Utilice cubreobjetos adecuados
Pretratamiento proteolítico demasiado fuerte	Acorte el tiempo de incubación de pepsina

Contracoloración débil

Causa Posible	Acción
Baja concentración de DAPI	Use DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Prod. No. MT-0008-0.8) en su lugar
Tiempo de incubación con DAPI demasiado corto	Ajustar el tiempo de incubación con DAPI

INDICACIÓN AL CONSUMIDOR

1. Por cualquier información puede consultar al siguiente teléfono (011) 4555-4601 en el horario de 9.00 a 18.00 de Lunes a Viernes. Personal de BIOARS S.A. estará a vuestra disposición.
2. La mercadería viaja por cuenta y riesgo del destinatario. Todo reclamo será atendido según lo prevee el "Manual de procedimiento para reclamos técnicos y devolución de mercadería" que BIOARS S.

Establecimiento elaborador: ZytoVision GmbH, Fischkai 1, 27572 Bremerhaven (Alemania).
Establecimiento Importador: BIOARS S.A. – Estomba 961/965 – Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
Director Técnico: Dra. Claudia E. Etchevés - Bioquímica- Matrícula Nacional N° 7028
Uso Profesional Exclusivo. Autorizado por la A.N.M.A.T. N° Certificado 008452

18. Literatura

- Davis CF, et al. (2014) Cancer Cell 26, 319-30.
- Kievits T, et al. (1990) Cytogenet Cell Genet 53: 134-6.
- Nagel I, et al. (2010) Blood 116: 1317-20.
- Schilling G, et al. (2013) Leukemia Res 37: 280-6.
- Pfeifer M, et al. (2015) Nature 526: 700-4
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4

Nuestros expertos están disponibles para responder sus preguntas.
Por favor contactar helptech@zytovision.com

ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Germany
Phone: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Email: info@zytovision.com

Marcas registradas:
ZytoVision and ZytoLight son marcas registradas de ZytoVision GmbH.

A.N.M.A.T. FOLIO 18 MESA DE PROD. MED.

PROYECTO DE RÓTULOS EXTERNOS

Nombre del producto:

Zyto*Light* Probes (Sondas Zyto*Light*) – Familia: TUMORES SÓLIDOS

La forma de presentación de las sondas son frascos rotulados que vienen dentro de una bolsa plástica transparente que permite ver el rotulo interno. En dicha bolsa viene el manual de instrucciones. Por lo tanto, las sondas no tienen rótulos externos, solamente presenta el que viene colocado en los viales.

Establecimiento elaborador: ZytoVision GmbH, Fischkai 1, 27572 Bremerhaven (Alemania).
Establecimiento Importador: BIOARS S.A. – Estomba 961/965 – Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
Director Técnico: Dra. Claudia E. Etchevés - Bioquímica- Matrícula Nacional N° 7028
Uso Profesional Exclusivo. Autorizado por la A.N.M.A.T. N° Certificado: 008452

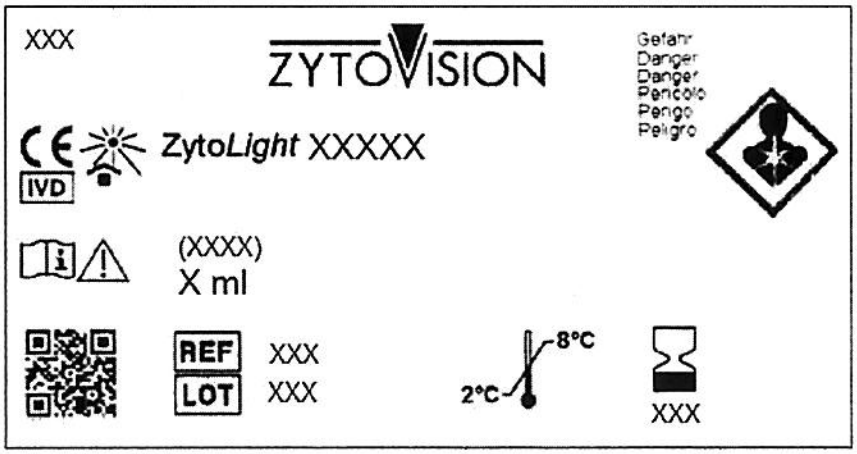
IF-2019-90582039-APN-DNPM#ANMAT

F

PROYECTO DE RÓTULOS INTERNOS

Nombre del producto:

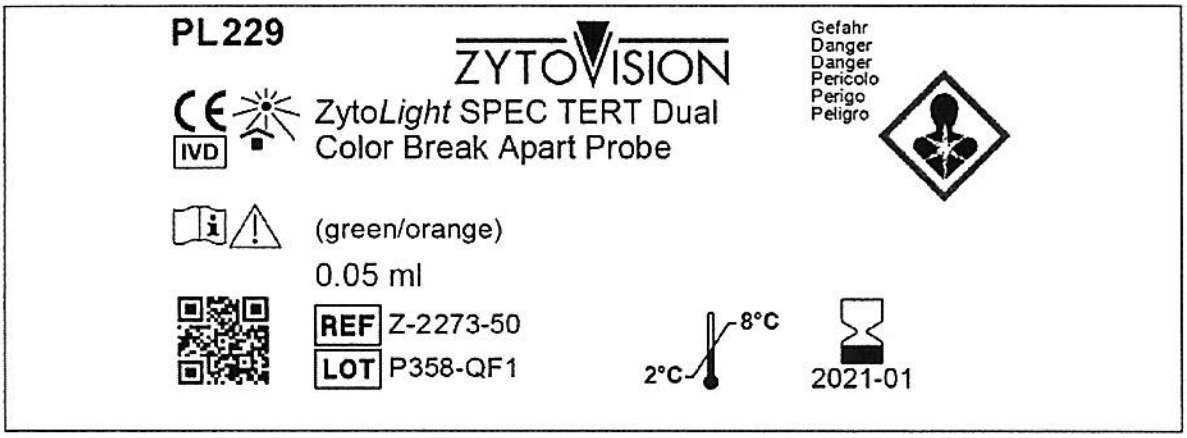
Zyto*Light* Probes (Sondas Zyto*Light*) – Familia: TUMORES SÓLIDOS



El nombre del producto (XXXXX), Volumen (X ml), Código/Ref.: (XXX), Marcación: (XXXX) cambia para cada producto. Ver Anexo con el listado con los nombres y volúmenes de los mismos.

Ejemplo

ZytoLight SPEC TERT Dual Color Break Apart Probe



Establecimiento elaborador: ZytoVision GmbH, Fischkai 1, 27572 Bremerhaven (Alemania).
Establecimiento Importador: BIOARS S.A. – Estomba 961/965 – Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
Director Técnico: Dra. Claudia E. Etchevés - Bioquímica- Matrícula Nacional N° 7028
Uso Profesional Exclusivo. Autorizado por la A.N.M.A.T. N° Certificado: 008452

ZytoLight; Producto ZytoVision .Familia Tumores solidos

DIRECTOR TECNICO

ZYTOVISION

ZytoLight
SPEC C19MC/19p13 Dual Color Probe

REF Z-2274-50 Σ 5 (0.05 ml)

Para la detección cualitativa de amplificaciones que involucran el locus C19MC en la región 19q13.42 mediante hibridación fluorescente in situ (FISH)

CE IVD

Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
Según la directiva de la UE 98/79/EC

1. Uso previsto

ZytoLight SPEC C19MC/19p13 Dual Color Probe (PL230) está destinado a la detección cualitativa de amplificaciones que involucran el locus C19MC en la región 19q13.42 en muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina mediante hibridación fluorescente in situ (FISH). La sonda está diseñada para ser utilizada en combinación con ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20).

La interpretación de los resultados debe hacerse dentro del contexto de la historia clínica del paciente con respecto a los datos clínicos y patológicos adicionales del paciente por un patólogo cualificado.

2. Relevancia clínica

La región del grupo de miARN C19MC comprende 46 genes de micro ARN que codifican microARN policíricos grandes (miARN). Se han informado amplificaciones de C19MC en entidades tumorales, como el cáncer de mama y los carcinomas paratiroideos. Según la clasificación de la OMS de 2016 de los tumores del sistema nervioso central, la amplificación de esta región define una nueva entidad de tumores embrionarios con rosetas de múltiples capas (EMTR), alterada por C19MC. La amplificación de C19MC conduce a una sobreexpresión de los miARN en esta región del grupo que impulsa la proliferación celular, promueve la supervivencia celular y aumenta la carcinogenicidad de las células, lo que proporciona evidencia funcional de que los C19MC miARN actúan como oncogenes.

Los ETMR con la amplificación del grupo de C19MC miARN son tumores cerebrales raros que se presentan principalmente en bebés y niños pequeños que muestran una supervivencia general baja.

Por lo tanto, la detección de la amplificación del grupo de C19MC miARN por hibridación de fluorescencia in situ puede ser de importante relevancia en el diagnóstico y el pronóstico.

3. Principio del ensayo

La técnica de hibridación in situ por fluorescencia (FISH) permite la detección y visualización de secuencias específicas de ácidos nucleicos en preparaciones celulares. Los fragmentos de DNA marcados fluorescentemente, las denominadas sondas FISH, y sus cadenas de DNA diana complementarias, en las preparaciones, se co-desnaturalizan y posteriormente se vuelven a unir durante la hibridación. Posteriormente, los fragmentos de sonda inespecíficos y no unidos se eliminan mediante etapas de lavado rigurosas. Después de la contratinción del DNA con DAPI, se visualizan fragmentos de sonda hibridados usando un microscopio de fluorescencia equipado con filtros de excitación y emisión específicos para los fluorocromos con los cuales los fragmentos de sonda FISH han sido marcados directamente.

4. Reactivos suministrados

ZytoLight SPEC C19MC/19p13 Dual Color Probe está compuesta por:

- Polinucleótidos marcados con ZyGreen (excitación 503 nm/emisión 528 nm) (~10.0 ng/µl), cuyas secuencias diana mapean en 19q13.42* (chr19:54,156,239-54,768,983) localizado en el locus C19MC (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos marcados con ZyOrange (excitación 547 nm /emisión at 572 nm)(~4.5 ng/µl cuyas secuencias diana mapean en 19p13.3* (chr19:658,555-1,144,465) (ver Fig. 1).
- Buffer de hibridación a base de formamida

*according to Human Genome Assembly GRCh37/hg19

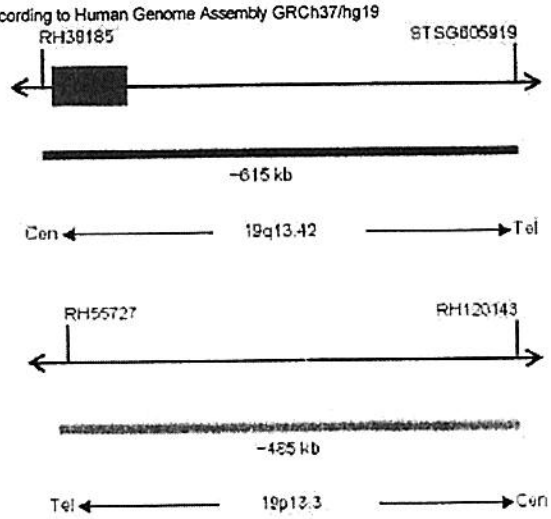


Fig. 1: Arriba: Mapa de Sonda SPEC C19MC; Abajo: Mapa de sonda 19p13 (no a escala)

ZytoLight SPEC C19MC/19p13 Dual Color Probe está disposible en una presentación:

- Z-2274-50: 0.05 ml (5 reacciones de 10 µl cada una)

5. Materiales requeridos, pero no suministrados

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20)
- Muestras de control positivo y negativo
- Portaobjetos para microscopio, cargados positivamente
- Baño de agua (37°C, 98°C)
- Hibridador o placa caliente
- Hibridador o cámara de humedad en el horno de hibridación
- Pipetas ajustables (10 µl, 25 µl)
- Jarras o baños de tinción
- Temporizador
- Termómetro calibrado
- Etanol o alcohol reactivo
- Xileno
- Agua desionizada o destilada
- Cubreobjetos (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Adhesivo de goma, ej., Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) o similar.
- Microscopio de fluorescencia con mantenimiento adecuado (400-1000x)
- Aceite de inmersión aprobado para microscopía de fluorescencia
- Filtros apropiados

IF-2019-90582039-APN-DNPM#ANMAT
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVE
DIRECTOR TECNICO
Página 7 de 10

6. Almacenamiento y manipulación

Conservar a 2-8°C en posición vertical y protegido de la luz.
Utilizar protegido de la luz. Volver a las condiciones de almacenamiento inmediatamente después del uso. No utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El dispositivo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se maneja adecuadamente.

7. Advertencias y precauciones

- Lea las instrucciones antes de usar
- No utilice los reactivos depues de haber alcanzado la fecha de caducidad
- Este producto contiene sustancias (en bajas concentraciones y volúmenes) que son perjudiciales para la salud y potencialmente infecciosas. Evite cualquier contacto directo con los reactivos. Tome las medidas de protección apropiadas (use guantes desechables, gafas protectoras y prendas de aboratorio).
- Si los reactivos entran en contacto con la piel, enjuague inmediatamente con abundante cantidad de agua.
- Una hoja de datos de seguridad del material está disponible a petición del usuario.
- No reutilice los reactivos
- Evite la contaminación cruzada de las muestras ya que esto puede dar lugar a resultados erróneos.
- La sonda no debe ser expuesta a la luz, especialmente la luz fuerte, durante un periodo de tiempo más largo, es decir, todos los pasos deben ser logrados, en lo posible, en la oscuridad y / o utilizando contenedores a prueba de luz!

Indicaciones de peligro y precaución:

El componente determinante del peligro es la formamida.

Danger

H351	Se sospecha que causa cáncer
H360FD	Puede afectar la fertilidad. Puede dañar al feto.
H373	Puede causar daño a los órganos por exposición prolongada o repetida.
P201	Obtenga instrucciones especiales antes de usar
P202	No manipule hasta que se hayan leído y comprendido todas las precauciones de seguridad
P260	No aspirar el polvo/humo/gas/niebla/vapores/aerosol.
P280	Use guantes de protección/ropa de protección/protección ocular y facial.
P308+P313	En caso de exposición o peligro, consulte a un médico.
P405	Almacene bajo llave

8. Limitaciones

- Para uso en diagnóstico in vitro.
- Sólo para uso profesional.
- La interpretación clínica de cualquier tinción positiva, o su ausencia, debe realizarse dentro del contexto de la historia clínica, morfología, otros criterios histopatológicos y otras pruebas diagnósticas. Es responsabilidad de un patólogo calificado familiarizarse con las sondas FISH, reactivos, paneles de diagnóstico y métodos utilizados para producir la preparación teñida. La tinción debe realizarse en un laboratorio certificado y con licencia bajo la supervisión de un patólogo responsable de revisar las muestras teñidas y asegurar la idoneidad de los controles positivos y negativos.
- La tinción de la muestra, especialmente la intensidad de la señal y la tinción de fondo, depende de la manipulación y procesamiento de la muestra antes de la tinción. La incorrecta fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento, seccionamiento o contaminación con otros especímenes o fluidos pueden producir artefactos o resultados falsos. Los resultados inconsistentes pueden resultar de las variaciones en los métodos de fijación y de inclusión, así como de las irregularidades inherentes dentro de la muestra.
- La sonda debe utilizarse únicamente para detectar los loci descritos en 4. "Reactivos suministrados".

El rendimiento se validó utilizando los procedimientos descritos en estas instrucciones de uso. Las modificaciones a estos procedimientos pueden alterar el rendimiento y tienen que ser validados por el usuario.

9. Sustancias interferentes

Las células sanguíneas presentes en la muestra pueden exhibir autofluorescencia que dificulte el reconocimiento de la señal.

Los siguientes fijadores son incompatibles con FISH:

- Fijador de Bouin
- Fijador B5
- Fijadores ácidos (por ejemplo, ácido pícrico)
- Fijador de Zenker
- Alcoholes (cuando se utilizan solos)
- Cloruro de mercurio
- Fijador Formaldehído/zinc
- Fijador de Hollande
- Formalina no-tamponada

A.N.M.A.T. FOLIO 53 MESA DE ENTRADAS

10. Preparación de las muestras

Recomendaciones:

- Fijación en formol tamponado neutro al 10% durante 24 h a temperatura ambiente (18-25°C).
- Tamaño de la muestra ≤ 0.5 cm3.
- Utilice parafina de primera calidad.
- La inclusión debe realizarse a temperaturas inferiores a 65 ° C.
- Prepare secciones de micrótomo de 2-4 µm.
- Utilice portaobjetos de microscopio con carga positiva.
- Fije durante 2-16 h a 50-60 ° C.

11. Tratamiento preparatorio del dispositivo

El producto está listo para usar. No se requiere reconstitución, mezcla o dilución. Llevar la sonda a temperatura ambiente (18-25 ° C) antes de usar, protegerla de la luz. Antes de abrir el vial, mezcle agitando con vórtex y centrifugue brevemente.

12. Procedimiento del ensayo

Pretratamiento de la muestra

Realice el pretratamiento de la muestra (desparafinado, proteólisis) de acuerdo con las instrucciones de uso del ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

Desnaturalización e hibridación

1. Pipetee 10 µl de la sonda sobre cada muestra tratada previamente
2. Cubra las muestras con un cubreobjetos de 22 mm x 22 mm (evite las burbujas atrapadas) y selle el cubreobjetos

Se recomienda el uso de adhesivo de goma para el sellado.

3. Coloque los portaobjetos sobre una placa caliente o un hibridador y desnaturalice las muestras por 10 min a 75°C.
4. Transfiera los portaobjetos a una cámara de humedad e hibridice durante toda la noche a 37 ° C (por ejemplo, en un horno de hibridación).

Es esencial que las muestras no se sequen durante el paso de hibridación.

Post-hibridación

Realice el procesamiento de post-hibridación (lavado, contratinción, microcospía de fluorescencia de acuerdo con las instrucciones de uso del ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

13. Interpretación de los resultados

Con el uso del set de filtros apropiados, las señales de hibridación de la sonda serán de color verde (C19MC region) y naranja (19p13.3).

Situación normal: en las interfases de las células normales o células sin aberraciones del cromosoma 19, aparecen dos señales verdes (C19MC) y dos señales naranja (19p13.3) (ver Fig. 2).

Situación anómala: en células con amplificación C19MC, será visible un número incrementado de señales verdes específicas de genes o grupos de señales verdes (ver Fig. 2).

Set de filtro de paso de banda doble verde/naranja

IF-2019-90582039-APN-DNPM#ANMAT

BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

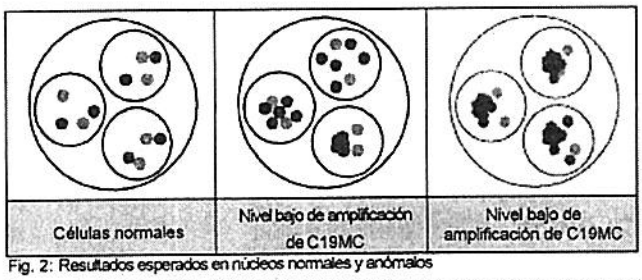


Fig. 2: Resultados esperados en núcleos normales y anómalos

Se puede observar otra distribución de la señal en algunas muestras anormales, lo que podría dar como resultado un patrón de señal diferente al descrito anteriormente, que indica reordenamientos variantes. Patrones de señal inesperados deben ser investigados más a fondo

Tener en cuenta:

- Debido a la cromatina descondensada, las señales FISH individuales pueden aparecer como pequeños grupos de señales. Por lo tanto, dos o tres señales del mismo tamaño, separadas por una distancia ≤ 1 diametro de la señal, deben contarse como una señal.
- No evalúe los núcleos superpuestos.
- No cuente los núcleos sobre-digeridos (reconocidos por las áreas oscuras visibles dentro de los núcleos).
- No cuente núcleos con fuerte auto-fluorescencia, lo que dificulta el reconocimiento de la señal.
- Un resultado negativo o inespecífico puede ser causado por múltiples factores (véase el capítulo 17).
- Con el fin de interpretar correctamente los resultados, el usuario debe validar este producto antes de su uso en los procedimientos de diagnóstico de acuerdo con directrices nacionales y / o internacionales.

14. Procedimientos de Control de Calidad Recomendados

Con el fin de monitorear el desempeño correcto de los especímenes procesados y los reactivos de prueba, cada ensayo debe ir acompañado de controles internos y externos. Si los controles internos y / o externos fallan en demostrar la tinción apropiada, los resultados con las muestras del paciente deben ser considerados inválidos.

Control interno: Células no neoplásicas dentro de la muestra que exhiben patrón de señal normal, por ejemplo, fibroblastos.

Control externo: Muestras de control positivas y negativas validadas.

15. Características de desempeño

Precisión: La localización de la hibridación de la sonda se evaluó sobre la extensión de la metafase de un varón cariotípicamente normal. En todas las muestras probadas, la sonda se hibridó únicamente con los loci esperados. No se observaron señales adicionales o hibridaciones cruzadas. Por lo tanto, la precisión calculada fue del 100%.

Sensibilidad analítica: Para la evaluación de la sensibilidad analítica, la sonda se evaluó sobre la extensión metafase de varones cariotípicamente normales. Todos los núcleos mostraron el patrón de señal normal en todas las muestras ensayadas. Por lo tanto, la sensibilidad analítica calculada fue del 100%

Especificidad analítica: Para la evaluación de la especificidad analítica, la sonda se evaluó sobre la extensión de la metafase de varones cariotípicamente normales. En todos los especímenes probados, todas las señales se hibridaron únicamente con los loci objetivos esperados y no en otros loci. Por lo tanto, la especificidad analítica calculada fue del 100%.

16. Eliminación de desechos

La eliminación de los reactivos debe realizarse de acuerdo con la normativa local.

17. Solución de problemas

Cualquier desviación de las instrucciones de operación puede conducir a resultados de tinción inferior o a ninguna tinción en absoluto.

Señales débiles o ninguna señal en absoluto

Causa Posible	Acción
No hay secuencias objetivo disponibles	Usar controles apropiados
La muestra de células o tejidos no ha sido fijada correctamente	Optimice el tiempo de fijación y el fijador o aplique un paso posterior a la fijación como se describe en el "procedimiento de ensayo" del manual de ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit
Incorrecto pretratamiento térmico, hibridación, proteólisis, desnaturalización o temperatura de lavado riguroso	Compruebe la temperatura de todos los dispositivos técnicos utilizados, utilizando un termómetro calibrado
Pretratamiento proteolítico no realizado correctamente	Optimice el tiempo de incubación de pepsina, aumente o disminuya si es necesario
Evaporación de la sonda	Cuando se utiliza un hibridador, el uso de las franjas húmedas / tanques llenos de agua es obligatorio. Cuando se utiliza un horno de hibridación, se requiere el uso de una cámara de humedad. Además, el cubreobjetos debe sellarse completamente, por ejemplo, con Fixogum, para evitar el secado de la muestra durante la hibridación.
Stringency wash buffer de baja concentración	Revise la concentración del Stringency wash buffer
Soluciones de deshidratación viejas	Prepare soluciones frescas
Microscopio de fluorescencia mal ajustado	Ajuste correctamente
Sets de filtros utilizados inapropiados	Utilice sets de filtros apropiados para los fluoróforos de la sonda. Los sets de filtros de paso triple proporcionan menos luz en comparación con los sets de filtros de paso simple o doble. En consecuencia, las señales pueden parecer más débiles utilizando estos sets de filtros de paso triple.
Foto-daño de las sondas / fluoróforos	Realice los pasos de hibridación y lavado en la oscuridad

Señales de hibridación cruzada; fondo (background) alto

Causa posible	Acción
Desparafinado incompleto	Utilice soluciones frescas; Compruebe la duración del desparafinado
Pretratamiento proteolítico muy fuerte	Reduzca el tiempo de incubación de pepsina
Volumen de la sonda por área demasiado alta	Reduzca el volumen de la sonda por sección / área, distribuya la sonda gota a gota para evitar la concentración local
Los portaobjetos se enfriaron a temperatura ambiente antes de la hibridación	Transfiera los portaobjetos rápidamente a 37 ° C
Stringency wash buffer demasiado concentrado	Revise la concentración del Stringency Wash Buffer
Temperatura de lavado después de la hibridación demasiado baja	Compruebe la temperatura; Aumente si es necesario
Deshidratación de los cortes entre las etapas individuales de incubación	Evite la deshidratación sellando los portaobjetos y realizando la incubación en ambiente húmedo

A.N.M.A.T. FOLIO 54 MESA DE ENTRADA

IF-2019-90582039-APN-DNPM#ANMAT
BIOARS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

Morfología del tejido degradada

Causa posible	Acción
La muestra de células o tejidos no ha sido fijada correctamente	Optimice el tiempo de fijación y el fijador o aplique un paso de fijación posterior como se describe en ("procedimiento de ensayo") del manual del ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit
Pretratamiento proteolítico no realizado correctamente	Optimice el tiempo de incubación de pepsina, aumente o disminuya si es necesario
Secado insuficiente antes de la aplicación de la sonda	Extienda el secado al aire

Núcleos superpuestos

Causa posible	Acción
Espesor inapropiado de las secciones de tejido	Prepare secciones de 2-4 µm con micrótomo

Muestra flotando fuera del portaobjetos

Causa posible	Acción
Recubrimiento del portaobjetos inadecuado	Utilice cubreobjetos adecuados
Pretratamiento proteolítico demasiado fuerte	Acorte el tiempo de incubación de pepsina

Contracoloración débil

Causa posible	Acción
Baja concentración de DAPI	Use DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Prod. No. MT-0008-0.8) en su lugar
Tiempo de incubación con DAPI demasiado corto	Ajuste el tiempo de incubación con DAPI

18. Bibliografía

- Kievits T, et al. (1990) Cytogenet Cell Genet 53: 134-6.
- Li M, et al. (2009) Cancer Cell 16: 533-46.
- Louis DN, et al. (2016) Acta Neuropathol 131: 803-20.
- Spence T, et al. (2014) Neuro Oncol 16: 62-71.
- Spence T, et al. (2014) Acta Neuropathol 128: 291-303.
- Vaira V, et al. (2012) J Mol Endocrinol 49: 115-24.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Our experts are available to answer your questions.
Please contact helptech@zytovision.com

ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Germany
Phone: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Email: info@zytovision.com

Trademarks:
ZytoVision® and ZytoLight® are trademarks of ZytoVision GmbH.

A.N.M.A.T. FOLIO 53 MESA DE ENTRADAS

...OANS S.A.
BIOQ. CLAUDIA ETCHEVES
DIRECTOR TECNICO

República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2019 - Año de la Exportación

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número: IF-2019-90582039-APN-DNPM#ANMAT

CIUDAD DE BUENOS AIRES
Viernes 4 de Octubre de 2019

Referencia: 3110-5448-18-7

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 10 pagina/s.

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2019.10.04 15:42:02 -03:00

Mariano Pablo Manenti
Jefe I
Dirección Nacional de Productos Médicos
Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnologia Médica

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2019.10.04 15:42:04 -03:00