



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

DISPOSICIÓN N°

7814

BUENOS AIRES 17 JUL 2017

VISTO, el expediente n° 1-47-3110-4799/16-1 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 de los Productos para diagnóstico de uso "in Vitro" denominados 1) **FragilEase Fragile X PCR Kit** / Kit 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) mediante amplificación por PCR y detección de repeticiones del trinucleótido por electroforesis de microgel capilar; 2) **FraXsoft™** / Software de análisis para el Kit FragilEase.

Que a fs. 142 consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que los productos reúnen 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 establecen la Ley 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99.

Σ

[Handwritten signature]



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

DISPOSICIÓN Nº 71814

Que se actúa en virtud a las facultades conferidas por el Decreto Nº 1490/92 y por el Decreto Nº 101 de fecha 16 de diciembre de 2015.

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 de los Productos para diagnóstico de uso “in Vitro” denominados 1) **FragilEase Fragile X PCR Kit** / Kit 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) mediante amplificación por PCR y detección de repeticiones del trinucleótido por electroforesis de microgel capilar; 2) **FraXsoft™** / Software de análisis para el Kit FragilEase que serán elaborados por WALLAC OY, Mustionkatu 6, FI-20750 Turku (FINLANDIA) e importados por ETC INTERNACIONAL S.A a expenderse en envases por 96 y [1152] determinaciones, conteniendo: FragilEase Polimerase (1 vial x 45µL [12 viales x 45 µL]), FragilEase PCR Buffer mix (2 viales x 800 µL [24 viales x 800 µL]) y Diluyente de muestra (1 vial x 1000 µL [12 viales x 1000 µL]); cuya composición se detalla a fojas 92 con un período de vida útil de 15 (QUINCE) meses desde la fecha de elaboración, conservado entre -30 y -16°C.



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

DISPOSICIÓN N°

7814

ARTICULO 2º.- Acéptense los rótulos y manual de instrucciones obrantes a fojas 9 a 62, desglosándose las fojas 13 a 30 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.

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: 1-47-3110-4799/16-1.

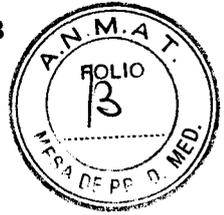
DISPOSICIÓN N°:

7814

av.

Dr. ROBERTO LEBE
Subadministrador Nacional
A. N. M. A. T.

7814



ROTULO EXTERNO

17 JUL 2017

FragilEase Fragile X PCR Kit 3101-0010

FragilEase PCR Buffer mix, 2 vials, 2 flacons, 2 Fläschchen, 2 viales, 2 flaconi, 2 frascos, 2 flaskor, 2 glas, 800 µL

FragilEase Polymerase, 1 vial, 1 flacon, 1 Fläschchen, 1 vial, 1 flacone, 1 frasco, 1 flaska, 1 glas, 45 µL

Sample Diluent, 1 vial, 1 flacon, 1 Fläschchen, 1 vial, 1 flacone, 1 frasco, 1 flaska, 1 glas, 1000 µL

CE IVD -30°C/-16°C Σ 96 i 4

Hourglass icon - LOT REF Catalog number 3101-0010

Reg MS (Brasil): 10298910124
Resp. Técnica: Patricia Ellen Nakano, CRF-SP 23.230

Kit insert version.

Barcode: 6 438 147 331307

QR code

Made in Finland

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

ROTULOS INTERNOS

FragilEase PCR Buffer Mix

800 µL -30°C/-16°C

IVD Wallac Oy Turku, Finland 2

Hourglass icon - LOT

FragilEase Polymerase

45 µL -30°C/-16°C

IVD Wallac Oy Turku, Finland 3

Hourglass icon - LOT

Handwritten scribbles

ETC INTERNACIONAL S.A.
LILIANA DE RAVEGLIA
APODERADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANIBAL E. BAGNARELLI
CO-DIRECTOR TECNICO
BIOQUIMICO
M.P. N° 278



FragilEase Polymerase 7 8 1 4

45 µL -30°C -16°C

IVD Wallac Oy
Turku, Finland 3

LOT

Sample Diluent

1000 µL -30°C -16°C

IVD Wallac Oy
Turku, Finland 2

0000-00 LOT 000000

ROTULO EXTERNO

FraXsoft™ 5017-0010
Version 1.0

LOT 0000123456

Made in Finland

Wallac Oy
Mustionkatu 6, Turku, Finland

CE

PerkinElmer

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

E

B

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

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANIBALE BAGNARELLI
CO-DIRECTOR TECNICO
BIOQUIMICO
R.P. N° 378

13907760-4 (es)

3101-0010
3101-001B



FragilEase™

Fragile X PCR kit

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

Fabricante:
Wallac Oy,
Mustionkatu 6, FI-20750 Turku, Finlandia
www.perkinelmer.com

PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*

CE

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

PerkinElmer

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANIBAL E. BAGNARELLI
CO-DIRECTOR TÉCNICO
BIOQUÍMICO
M.P. N° 378

FragilEase™ Fragile X PCR kit

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 electroforesis 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].

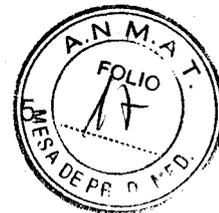
ETC INTERNACIONAL S.A.
LILIANA F. DE RAVEGLIA
APODERADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANTHONY E. BAGNARELLI
CO-DIRECTOR TÉCNICO
BIOQUÍMICO
M.P. Nº 378

FragilEase es una marca comercial de PerkinElmer, Inc.

13907760-4 (es)

7814



CONTENIDO DEL KIT

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 24 semanas con hasta 24 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.
Diluyente de muestra (Sample Diluent)	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. 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. 1296-0050) o equivalente.

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

FraXsoft es una marca comercial de PerkinElmer, Inc.
TriNEST es una marca comercial de PerkinElmer, Inc.

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANIBALE B. BAGNARELLI
CO-DIRECTOR TÉCNICO
BIOQUÍMICO
M.P. Nº 378

Tabla 1

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	07/122	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 (DBS).

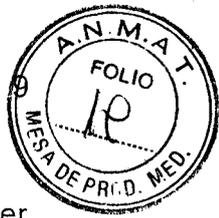
Preparación de la muestra

- 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 F. DE RAVEGLIA
APODERADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANIS E. BAGNARELLI
COORDINADOR TÉCNICO
BIOQUÍMICO
B.O. N° 378



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/ μ L; 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 μ L
Diluyente de muestra	2.6 μ L
Polimerasa FragilEase	0.4 μ L
Volumen total	18 μ L

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 μ L de mezcla maestra PCR en cada pocillo o tubo.
- 1.4. Antes de hacer alícuotas, agite y centrifugue las muestras de ADN. Pipetee 2 μ L de cada ADN en el pocillo o tubo adecuado para un volumen de PCR final de 20 μ L. 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 μ L 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 P. DE RAVEGLIA
APODERADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANTHONY BAGNARELLI
CO-DIRECTOR TECNICO
BIQUIMICO
M.P. Nº 378

13907760-4 (es)

71814



- 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 manera alternativa, para un número alto de análisis se puede utilizar Agencourt® AMPure® XP PCR Purification Kit (Beckman Coulter) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 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 plataforma para electroforesis de microgel capilar

Para analizar el tamaño de repetición, pueden utilizarse varios sistemas distintos de electroforesis de microgel capilar, por ejemplo, el Agilent 2100 Bioanalyzer. 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.A.
LILIANA R. DE RAVEGLIA
APROBADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANIBAL E. BAGNARELLI
CO-DIRECTOR TÉCNICO
BOGOTÁ
E.P. N° 378

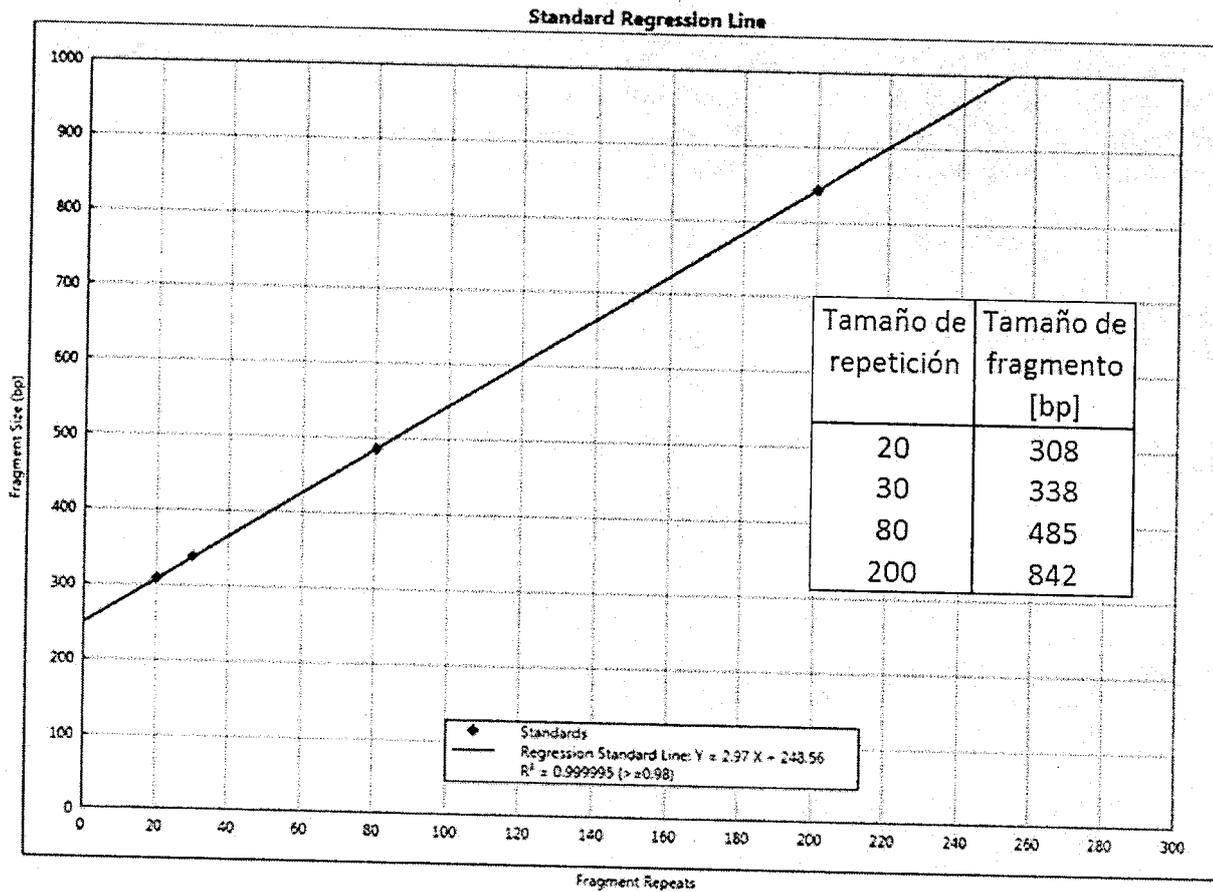
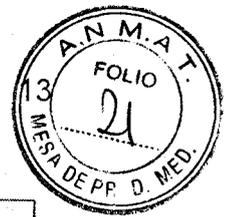


Figura 4. Un ejemplo de una curva de regresión lineal de los tamaños de fragmento medidos de las muestras NA20240 y NA20239. El valor R^2 cumple los criterios de aceptación de control de calidad de >0.98 .

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.

[Signature]
 ETC INTERNACIONAL S.A.
 LILIANA F. DE RAVEGLIA
 APODERADO

[Signature]
 ETC INTERNACIONAL S.A.
 ANISA E. BAGNARELLI
 CO-DIRECTOR TÉCNICO
 BUCARINCO
 M.P. N° 378

3014

15
 A.N.M.A.T.
 FOLIO
 22
 MESA DE PP. R. MED.

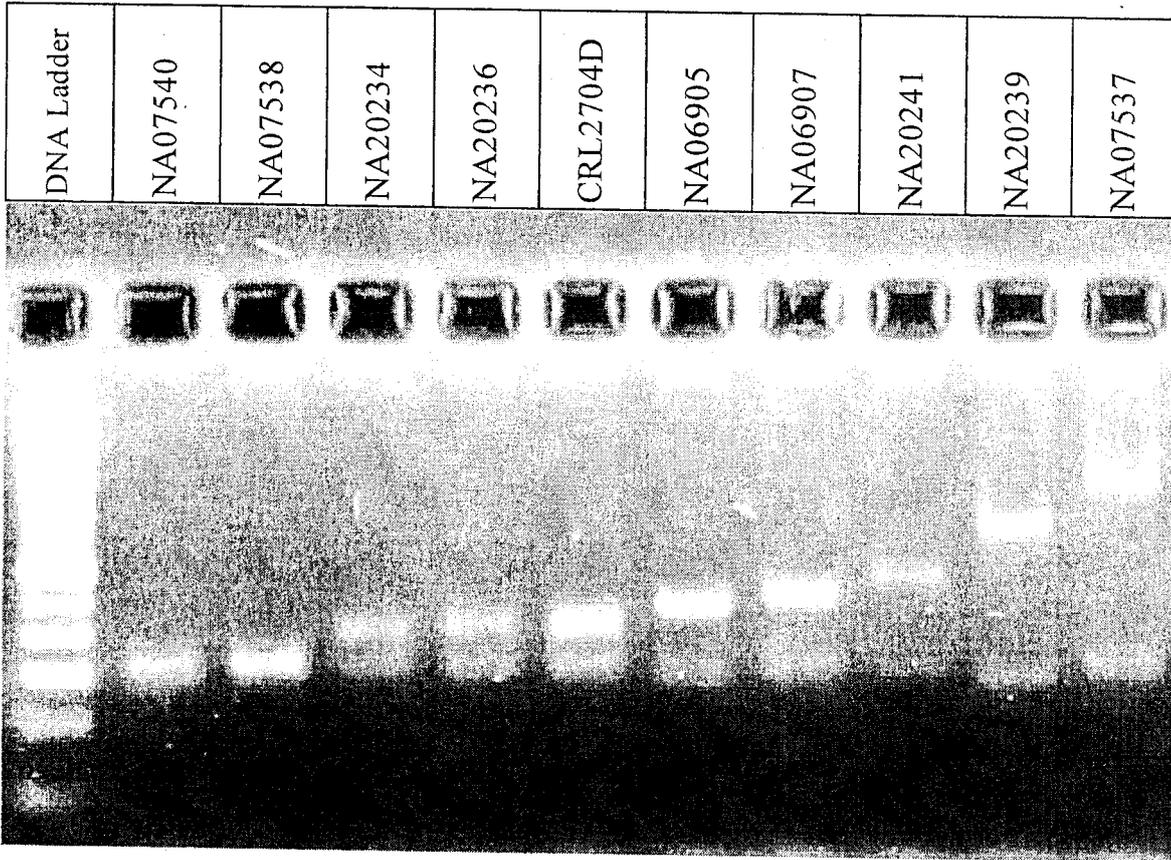


Figura 5. Gel de agarosa al 3 % de muestras de ADN de referencia X frágil de mujer teñidas con bromuro de etidio y procesadas a 5v/cm durante 45 minutos. El número de muestras y el tamaño de repetición de referencia de Coriell (Trenton, NJ) son: NA07540 (23 y 29 repeticiones), NA07538 (29 y 29 repeticiones), 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).

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

ETC INTERNACIONAL S.A.
 CARLO E. BAGNARELLI
 CO-DIRECTOR TECNICO
 QUIMICO
 M.P. N° 378

5-

CB



NA07537

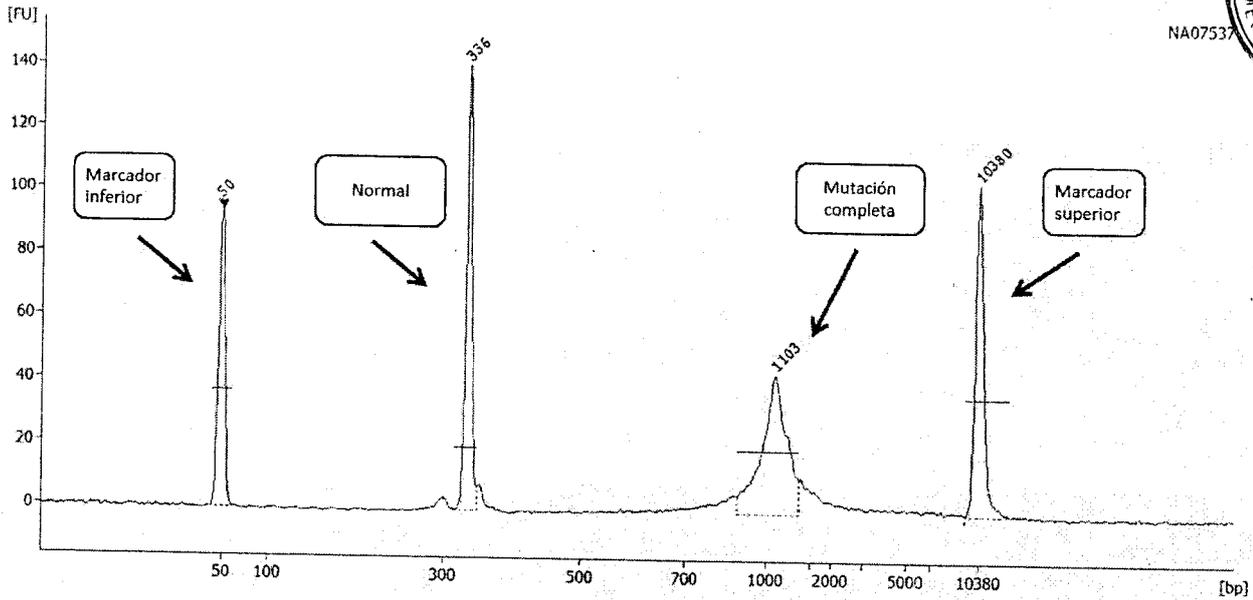


Figura 7. Análisis de microgel de la muestra X frágil de Coriell de mujer NA07537 (28 y 336 repeticiones) después de la amplificación con reactivos FragilEase y limpieza de PCR. Ver el correspondiente análisis de gel de agarosa para esta muestra en la figura 5.

[Handwritten signature]
ETC INTERNACIONAL S.A.
LUCIANA F. DE RAVEGLIA
APODERADO

[Handwritten signature]
ETC INTERNACIONAL S.A.
ARNALDO E. BAGNARELLI
COORDINADOR TECNICO
QUIMICO
M.P. Nº 378

[Handwritten mark]

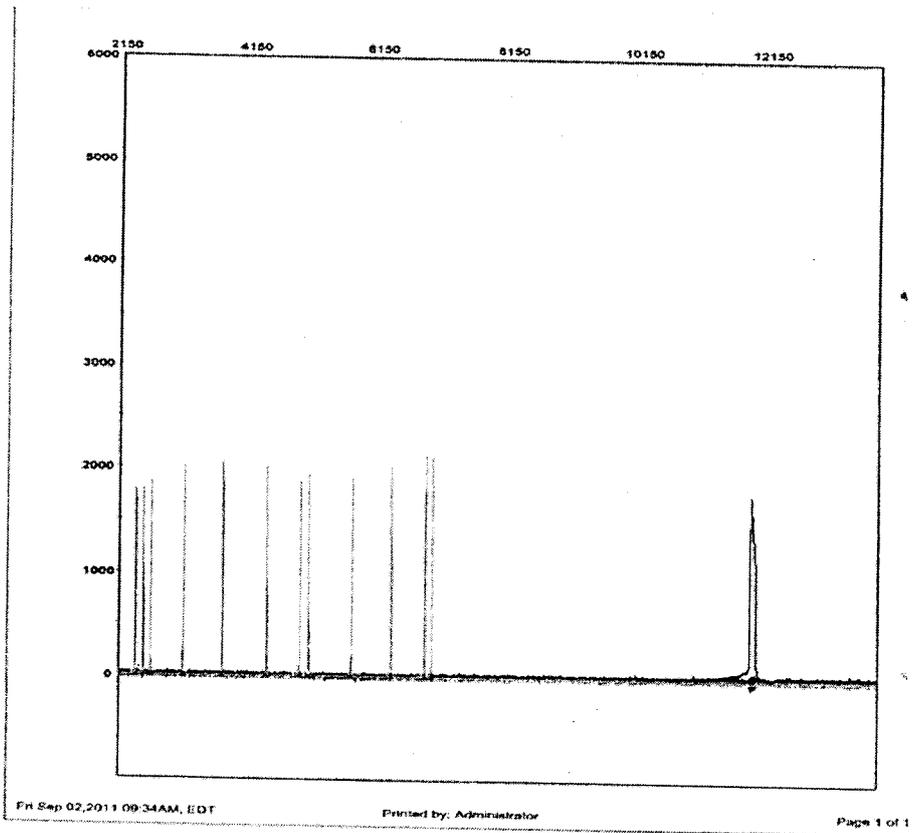


Figura 9. Electroferograma a partir de un instrumento de electroforesis capilar adecuado de una muestra de ADN de X frágil de Coriell de hombre. La muestra (NA04025) tiene un alelo con mutación completa de 645 repeticiones. El indicador de peso molecular (ladder) de ADN utilizado es LIZ 500.

CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL ENSAYO

Sensibilidad analítica

Las características analíticas del ensayo que se presentan en estas instrucciones de uso se han obtenido con el kit FragilEase PCR junto con un Caliper LabChip GX y un instrumento de electroforesis Agilent 2100 Bioanalyzer (tabla 4).

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 15 %, 7.5 %, 5 %, 2.5 % y 1 %. 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 7.5 % y 40 ng de ADN de entrada (figura 10).

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

ETC INTERNACIONAL S.A.
AMBAL E. BAGNARELLI
CO-DIRECTOR TÉCNICO
BIQUÍMICO
M.P. Nº 378

precisión de la determinación de tamaño de $\pm 10\%$ para el instrumento de electroforesis de microgel.



Tabla 4.

	Muestra	Sexo	Tamaño de repetición		
			Referencia	FragilEase Bioanalyzer	FragilEase LabChip GX
Coriell	NA07174	Hombre	30	30	31
	NA06892	Hombre	93	91	96
	NA20233	Hombre	117	118	130
	NA06852	Hombre	>200	308	308
	NA07538	Mujer	29 29	30 30	29 29
	NA20240	Mujer	30 80	31 81	32 88
	NA20239	Mujer	20 200	20 202	14 198
	NA07537	Mujer	28-29 >200	30 294	29 301
NIBSC	07/120	Mujer	22 31	22 32	18 32
	07/122	Mujer	33 113	35 117	37 128
	07/168	Mujer	38 346	40 320	44 317

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 320 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.
LILIANA F. DE RAVEGLIA
APODERADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANIBAL E. BAGNARELLI
COORDINADOR TECNICO
BIOQUIMICO
M.P. N° 378

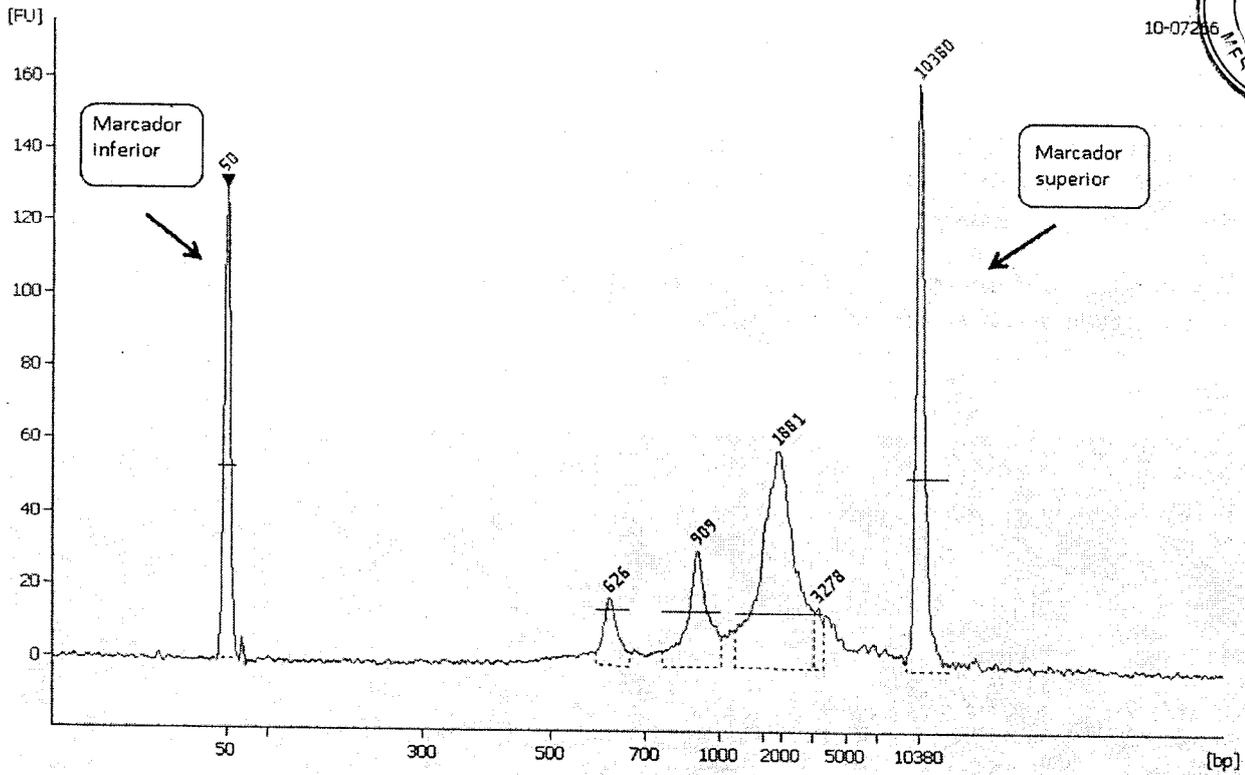


Figura 12. Mutación completa con mosaico de muestra clínica de hombre.

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.
ANGEL E. BAGNARELLI
CO-DIRECTOR TECNICO
BIOQUIMICO
M.P. N° 378

REFERENCIAS

7814



- [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.
LILIANA R. DE RAVEGLIA
APODERADO

ETC INTERNACIONAL S.A.
ANIBALE B. BAGNARELLI
COORDINADOR TECNICO
BIODIAGNOSTICO
M.P. 111 078



Allende 3274 (C1417BMV), Ciudad Autónoma de Buenos Aires,
Argentina. Tel.: (+54 11) 4 639-3488 Fax: (+54 11) 4639-6771

7-814



Proyecto Manual de Instrucciones

1) Nombre comercial del producto

5017-0130 Software FraXsoft

2) Descripción de la finalidad de uso del producto

El programa FraXsoft proporciona análisis de datos para los productos del kit FragilEase. Utiliza los datos de medición de los sistemas de electroforesis capilar microfluídicos Caliper LabChip MultiDx y Agilent Bioanalyzer 2100 así como los datos del programa ABI GeneMapper. El programa FraXsoft crea una curva estándar a partir de las muestras estándares definidas por los usuarios y calcula las repeticiones de trinucleótidos CGG para valorar el estado de la mutación X Frágil de las muestras. El programa presenta al usuario la información del número de repeticiones de CGG de las muestras calculada tanto de forma numérica como de trazado gráfico.

A continuación se enumeran las principales funciones del programa FraXsoft:

- Cálculo de la curva de estándares
- Cálculo de las repeticiones de trinucleótidos CGG correspondientes a partir de los picos de las muestras detectados en la electroforesis
- Generación de gráficos de resultados para cada muestra
- Clasificación de las muestras en clases de mutación según las directrices reconocidas o los límites definidos por el usuario
- Impresión de los informes específicos de paciente (sólo números de repeticiones de alelos y clasificación de muestras)
- Impresión de un informe de resumen que incluye la clasificación de todos los pacientes de un ensayo basándose en el tamaño del alelo más alto detectado
- Exportación de archivos CSV de las repeticiones de trinucleótidos CGG calculados para cada muestra

El programa FraXsoft ofrece una barra de navegación similar a la de Outlook que incluye seis pestañas distintas y la pestaña Ayuda. Las pestañas están ordenadas según el flujo de trabajo del análisis estándar. Cada pestaña se divide a su vez en distintas vistas, en función de las muestras o los datos que se muestren en esa fase del flujo de trabajo. Esta guía de usuario aborda en primer lugar la instalación y configuración del programa para proseguir luego con una serie de instrucciones breves dirigidas al análisis de los resultados con el programa FraXsoft. A continuación se incluye una descripción pormenorizada de cada una de las pestañas de navegación en el orden de ejecución de la lista de trabajo típica. Los cálculos y las fórmulas se describen un apartado independiente

Aspectos importantes que cabe destacar

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

ETC INTERNACIONAL S.A.
MIRBALE B. BAGNARELLI
CO-DIRECTOR TÉCNICO
BIOQUÍMICO
M.P. N° 378

Página 1 de 5



Parámetros iniciales

Seleccione el botón **Parámetros** en el panel de la izquierda y se mostrará la ventana **Valores predeterminados**. En primer lugar, seleccione la **Directriz** que desea utilizar para clasificar las muestras: ACMG o ESHG. Si desea utilizar un sistema de clasificación definido por el usuario y personalizado, lea la descripción detallada al respecto que aparece en el capítulo "Parámetros".

A continuación, confirme o introduzca los números de repeticiones de CGG de los dos estándares "Est.1" y "Est.2" que utilizará en cada ensayo. Los valores predeterminados se utilizan con Coriell NA 20240 y 20239 respectivamente, tal como se muestra en la tabla siguiente. No los modifique si va a utilizar estos estándares o introduzca los valores correspondientes para los estándares que usted elija.

ID FraXsoft	N.º cat. Coriell	Repeticiones alelo pequeño	Repeticiones alelo grande
Est.1	NA 20240	30	80
Est.2	NA 20239	20	200

El parámetro **Picos máximos del analizador** tiene un valor predeterminado de 5. Para obtener más información sobre este parámetro, consulte el apartado Parámetros. En **Sistema de archivos**, puede examinar la estructura de carpetas específicas para identificar los archivos de resultados de electroforesis y para almacenar los informes y los resultados después del análisis. Para ambos casos, la carpeta predeterminada es **FraXsoft** en **Mis documentos**.

A continuación, seleccione **Idioma** en el panel de la izquierda. Seleccione el idioma que desea utilizar para el programa FraXsoft de la lista desplegable.

Los informes en PDF de cada muestra y ensayo incluyen campos de encabezado para la información de contacto del laboratorio y el logotipo gráfico. Seleccione **Encabezado del informe en PDF** en el panel de la izquierda e introduzca la información en los campos suministrados. Borre cualquier texto emergente que se haya cargado previamente en dichos campos para que no aparezca en los informes. Si desea sustituir el logotipo gráfico predeterminado de PerkinElmer situado en la parte superior de los informes por el logotipo de su laboratorio, examine la estructura de ubicaciones de archivo del campo "Logotipo del informe" para seleccionar el archivo gráfico .jpg, .jpeg, .png, .bmp o .gif que desea mostrar en la parte superior izquierda de los informes PDF. El programa FraXsoft recordará este texto de encabezado y la ruta del archivo de imagen cada vez que se inicie la aplicación.

4- Análisis de los resultados

El programa FraXsoft se abre en una carpeta situada en la ubicación predeterminada que muestra los archivos .csv de las tablas de picos de electroforesis disponibles para los análisis. Para acceder a otras ubicaciones de archivos, seleccione una de las opciones de la carpeta de nivel superior del panel situado en la ubicación **Inicio**, a continuación, desplácese hasta la carpeta

EL PERKINELMER S.A.
LILIANA F. DE RAVEGLIA
APODERADO

La opción de directriz **personalizada** se puede utilizar para introducir límites o valores de corte diferentes para las cuatro clasificaciones de muestras tradicionales. También puede utilizarse para interpretar resultados con únicamente dos o tres clasificaciones. Las regiones de categorías personalizadas deben ser adyacentes una a la otra, no pueden existir regiones indefinidas.

El usuario debe introducir los tamaños de alelos correctos determinados por métodos de referencia para las **muestras estándares** conocidas. Los valores predeterminados se basan en las muestras NA20239 y NA20240 de Coriell Cell Repositories, Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ, EE.UU. <http://ccr.coriell.org/>). Se recomienda elegir las muestras estándares de modo que cuatro picos individuales cubran el rango de repeticiones de CGG de normal a mutación total.

Se puede utilizar la opción **Picos máximos por muestra** para limitar el número de lecturas del instrumento de electroforesis. Las intensidades de picos más altas se seleccionarán de la tabla de picos de electroforesis. El valor predeterminado es 5. Esta limitación se proporciona para eliminar la potencial aglomeración de información procedente de muestras de tipo altamente mosaico, normalmente mutaciones totales, que pueden mostrar una docena de picos o más y en las que no se obtiene ningún valor de clasificación de muestras incremental cuando se incluyen todos los picos en el informe. El programa siempre comunicará el pico con el mayor número de repeticiones de CGG, el cual determinará la clasificación de la muestra, y entonces procederá a comunicar también los tamaños de repeticiones adicionales.

La **ruta predeterminada** (para abrir archivos) y la **ruta de exportación predeterminada** (para las exportaciones) se pueden definir individualmente. En ambos casos, la ruta predeterminada en la instalación de FraXsoft es Mis documentos\FraXsoft. Probablemente resulte más cómodo que los archivos .csv de entrada y los informes de resultados se encuentren en carpetas distintas. Esto se puede configurar según las convenciones del laboratorio y la comodidad del usuario.

La vista **Administración de usuarios** ofrece al administrador las herramientas necesarias para agregar y eliminar usuarios. La vista **Cambiar contraseña** permite modificar la contraseña del usuario que tiene una sesión iniciada en ese momento.


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


ETC INTERNACIONAL S.A.
ANTHONY E. BAGNARELLI
CO-DIRECTOR TECNICO
BIOQUIMICO
E.P. 10 278



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

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

Expediente nº:1-47-3110-4799/16-1

Se autoriza a la firma ETC INTERNACIONAL S.A. a importar y comercializar los Productos para Diagnóstico de uso "in vitro" denominados 1) **FragilEase Fragile X PCR Kit** / Kit 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) mediante amplificación por PCR y detección de repeticiones del trinucleótido por electroforesis de microgel capilar; 2) **FraXsoft™** / Software de análisis para el Kit FragilEase, en Envases por 96 y [1152] determinaciones, conteniendo: FragilEase Polimerase (1 vial x 45µL [12 viales x 45 µL]), FragilEase PCR Buffer mix (2 viales x 800 µL [24 viales x 800 µL]) y Diluyente de muestra (1 vial x 1000 µL [12 viales x 1000 µL]). 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. N° 145/98. Lugar de elaboración: WALLAC OY, Mustionkatu 6, FI-20750 Turku (FINLANDIA). Periodo de vida útil: 15 (QUINCE) meses desde la fecha de elaboración conservado entre -30 y -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

Σ
J
A

PROFESIONAL EXCLUSIVO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACION NACIONAL
DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA.

Certificado nº: **008570**

ADMINISTRACION NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA
MÉDICA.

Buenos Aires, **7 JUL 2017**

DR. ROBERTO LORO
Subadministrador Nacional
A. N. M. T.

Firma y sello