



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

Disposición

Número:

Referencia: 1-47-3110-6742/17-6

VISTO el expediente N° 1-47-3110-6742/17-6 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma **ABOTT LABORATORIES ARGENTINA S.A.** solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos del Producto para diagnóstico de uso “in vitro” denominado: **VYSIS ESOPHAGEAL FISH Probe Kit (Ref. 4N19-20)**.

Que en el expediente de referencia 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 se ha dado cumplimiento a los términos que establece la Ley N° 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99.

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

Que corresponde autorizar la inscripción en el RPPTM del producto médico objeto de la solicitud.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos N° 1490/92 y sus modificatorios.

Por ello;

**EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA**

DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) del producto médico para diagnóstico de uso *in vitro* denominado: **VYSIS ESOPHAGEAL FISH Probe Kit (Ref. 4N19-20)**, de acuerdo a lo solicitado por la firma ABBOTT LABORATORIES ARGENTINA S.A. con los datos característicos que figuran al pie de la presente.

ARTICULO 2º.- Autorícense los textos de los proyectos de rótulos y Manual de Instrucciones que obran en el documento N° IF-2019-41728898-APN-DNPM#ANMAT.

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda “Autorizado por la ANMAT PM-39-647”, con exclusión de toda otra leyenda no contemplada en la normativa vigente.

ARTÍCULO 4º.- Extiéndase el Certificado de Autorización e Inscripción en el RPPTM con los datos característicos mencionados en esta 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 y el Certificado mencionado en el artículo 4º. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERISTICOS

Nombre comercial: VYSIS ESOPHAGEAL FISH Probe Kit (Ref. 4N19-20).

INDICACIÓN DE USO: ENSAYO DISEÑADO PARA DETECTAR EL NÚMERO DE COPIAS DE LOS LOCUS ERBB2 (17q12), p16 (9p21), MYC (8q24) y ZNF217 (20q 13.2) MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU* POR FLUORESCENCIA (FISH) EN MUESTRAS DE CITOLOGÍA (CEPILLADO ESOFÁGICO) Y EN MUESTRAS DE TEJIDO ESOFÁGICO EMBEBIDAS EN PARAFINA Y FIJADAS CON FORMOL (EPFF).

FORMA DE PRESENTACIÓN: Envases conteniendo: 1 vial x 200 µl.

PERIODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 12 (DOCE) MESES, desde la fecha de elaboración conservado entre -25 y -15 °C.

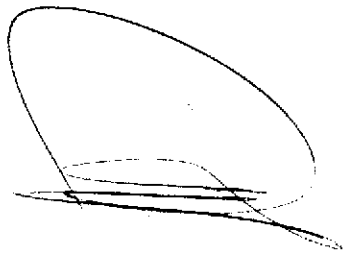
NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE: ABBOTT MOLECULAR Inc. 1300 East Touhy Avenue. Des Plaines, IL 60018. (USA).

Expediente N° 1-47-3110-6742/17-6

fd

Digitally signed by BELLOSO Waldo Horacio
Date: 2019.05.27 16:48:33 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA -
GDE
DN: cn=GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE, c=AR,
ou=SECRETARIA DE GOBIERNO DE MODERNIZACION
ou=SECRETARIA DE MODERNIZACION ADMINISTRATIVA,
serialNumber=CUIT 30715117564
Date: 2019.05.27 16:48:36 -03'00'



Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden, Germany



Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018 USA



H: H360
P: P201, P202, P281, P308+P313,
P405, P501



Vysis Esophageal FISH Probe Kit

Vysis LSI ERBB2 / p18 (CDKN2A) / MYC / ZNF 217 Probe

(1 vial, 200 µL per vial, 550 ng/µL)

GTIN 00884999008021

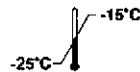
IVD

30-602053/R2

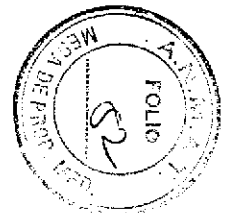
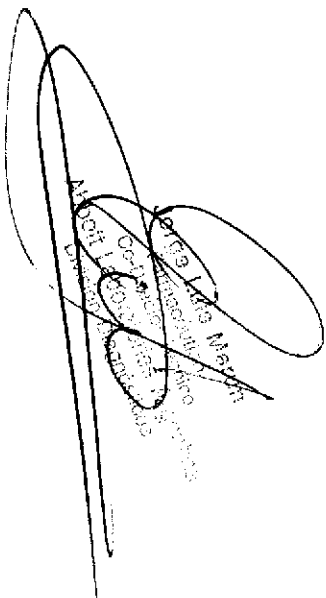
LOT



REF 04N19-020





Protect From Light



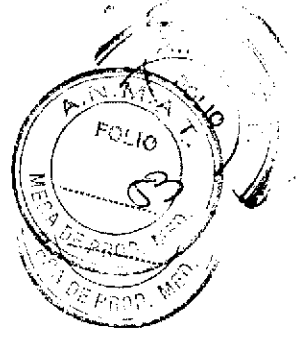
[Handwritten signature]

**Vysis LSI ERBB2 / p16 (CDKN2A) /
MYC / ZNF217 Probe
200 µL**

REF 30-231030 
LOT XXXXXX
YYY-MM-DD 

30-602178/RJ
Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA

Jorge Luis Marun
Farmacéutico
Café
Abbott Laboratories Argentina
Division Argentina
[Handwritten signature]





SOBRERRÓTULO

IMPORTADO Y DISTRIBUIDO POR:

ABBOTT LABORATORIES ARGENTINA S.A

ING. BUTTY 240, PISO 12, C1001AFB

CIUDAD AUTONOMA DE BUENOS AIRES, ARGENTINA

DIRECTOR TÉCNICO: Farm. Mónica E. Yoshida M.N. N° 11.282

AUTORIZADO POR A.N.M.A.T PM-39-647

Jorge Luis Marun
Co-Director Técnico
Abbott Laboratories Argentina
Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Vysis Esophageal FISH Probe Kit



es

Vysis Esophageal FISH Probe Kit

REF 4N19-20

B4N193

G4-7707/R03

Símbolos utilizados

- Fabricante
- Número de referencia
- Número de lote
- Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*
- Limitación de temperatura
- Peligro
- Riesgos biológicos
- Precaución, consúltense los documentos adjuntos
- Fecha de caducidad
- Consulte las instrucciones de uso
- Representante autorizado en la Unión Europea

La interpretación de los resultados FISH se debe realizar utilizando controles y técnicas de análisis adecuados¹² así como teniendo en cuenta otros datos clínicos y de diagnóstico.

Vysis Esophageal FISH Probe Kit contiene sondas de ácido nucleico marcadas con fluorescencia para su uso en ensayos de hibridación *in situ* con muestras de citología de cepillado esofágico fijadas en portaobjetos o en muestras de tejido esofágico humano fijadas con formol y embebidas en parafina. Vysis Esophageal FISH Probe Kit es una mezcla de 4 sondas de secuencias de DNA cada una de ellas marcada con un color diferente.

Las sondas están premezcladas en tampón de hibridación para que sea más fácil su manejo. El DNA bloqueante sin marcar también está incluido en las sondas para suprimir secuencias contenidas en los locus diana comunes a otros cromosomas. Una vez hibridados y visualizados, estas sondas proporcionan información sobre el número de copias de cromosomas.

La sonda ERBB2 está marcada con SpectrumGreen y cubre aproximadamente una región de 226 kb (chr17:35004678-35230380 *March 2006 UCSC Human Genome Browser*) que abarca el gen ERBB2 completo en el cromosoma 17. La sonda p16 está marcada con SpectrumRed y cubre aproximadamente una región de 222 kb (chr9:21778963- 22001169 *March 2006 UCSC Human Genome Browser*) que abarca el gen p16 completo en el cromosoma 9, así como las regiones adyacentes. La sonda MYC está marcada con SpectrumAqua y cubre aproximadamente una región de 821 kb (chr8:128432540-129253747 *March 2006 UCSC Human Genome Browser*) que abarca el gen MYC completo en el cromosoma 8, así como las regiones adyacentes. La sonda ZNF217 está marcada con SpectrumGold y cubre aproximadamente una región de 433 kb (chr20:51,411,118-51,844,324 *March 2006 UCSC Human Genome Browser*) que abarca el gen ZNF217 completo en el cromosoma 20, así como las regiones adyacentes.

FINALIDAD DE USO

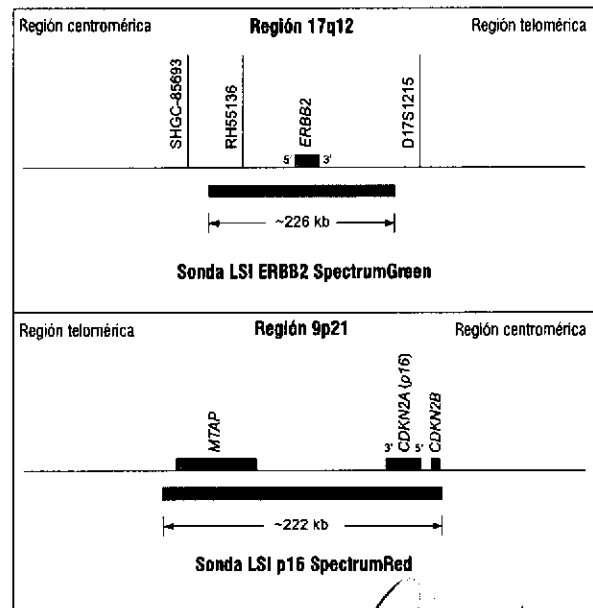
Vysis Esophageal FISH Probe Kit permite detectar el número de copias de los locus ERBB2 (17q12), p16 (9p21), MYC (8q24) y ZNF217 (20q13.2) por hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) en muestras de citología (cepillado esofágico) y en muestras de tejido esofágico embebidas en parafina y fijadas con formol (EPFF).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

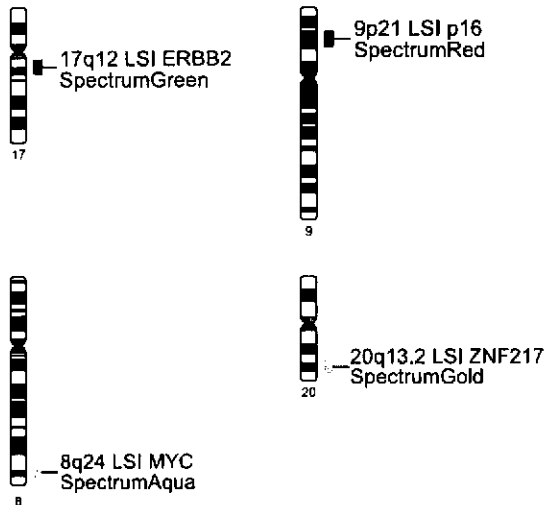
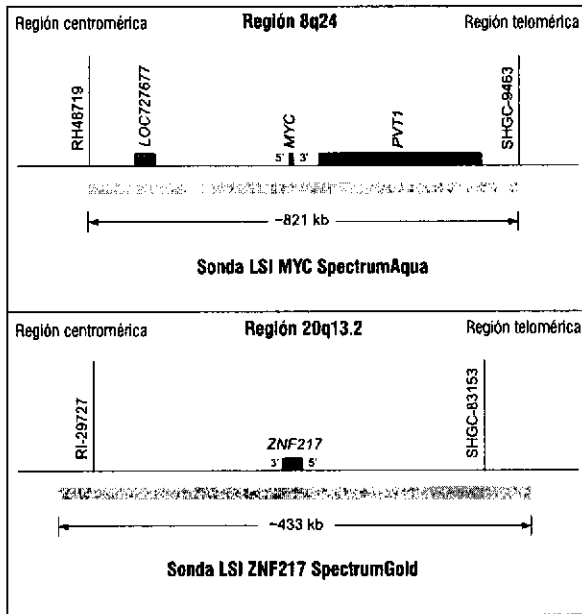
Vysis Esophageal FISH Probe Kit utiliza 4 sondas específicas del locus (LSI) para identificar las modificaciones en el número de copias de los locus cromosómicos ERBB2 (17q12), p16 (9p21), MYC (8q24) y ZNF217 (20q13.2), con un ensayo FISH multicolor. La displasia y el adenocarcinoma de esófago (EAC) en pacientes con esófago de Barrett (BE) se han asociado con estos 4 locus.^{1,2} Se cree que el BE incrementa el riesgo de EAC.^{3,4} El incremento de la incidencia de esta afección premaligna se ha vinculado a un aumento rápido de la incidencia de adenocarcinoma de esófago en los países de Europa occidental, Canadá y EE. UU.⁵⁻⁷ La incidencia de EAC ha crecido a tal velocidad que sobrepasa a cualquier otro cáncer, del 4% al 10% anualmente durante las últimas 2 décadas, mientras que la tasa de supervivencia de 5 años sigue siendo inferior al 10%.^{8,9}

DESCRIPCIÓN DE LA SONDA

FISH es una técnica que permite la visualización de secuencias de ácido nucleico específicas en una preparación celular. En particular, la hibridación *in situ* por fluorescencia incluye la hibridación (*annealing*) precisa de una sonda de DNA monocatenaria marcada con fluorescencia con secuencias complementarias a la diana. La hibridación de la sonda con la región del DNA celular se visualiza directamente mediante la microscopía de fluorescencia.^{10,11}



Handwritten signature and stamp:
 JORGE...
 Com. de...
 ABON...
 DE...
 1



REACTIVOS

1. Vysis LSI ERBB2 (17q12) SGr/p16 (9p21) SR/MYC (8q24) SA/ZNF217 (20q13.2) SGr Probe (Número de referencia: 30-231030) (200 µl por tubo). Cada tubo contiene sonda de DNA marcada con fluoróforo y DNA bloqueante en sulfato de dextrano, formamida y SSC (pH 7,0). Este conjunto de sondas se premezcla en el tampón de hibridación.

ALMACENAMIENTO

Vysis Esophageal FISH Probe Kit debe almacenarse a -15°C -20°C (±5°C), protegido de la luz.

CONDICIONES PARA EL TRANSPORTE

Vysis Esophageal FISH Probe Kit se transporta en nieve carbónica. Si recibe algún reactivo que no cumple con las recomendaciones de la etiqueta o está dañado, póngase en contacto con el Servicio de Asistencia Técnica de Abbott Molecular.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

IVD Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*

Para uso en diagnóstico *in vitro*

Vysis LSI ERBB2 (17q12) SGr/p16 (9p21) SR/MYC (8q24) SA/ZNF217 (20q13.2) SGr Probe

Consulte el capítulo Riesgos en el Manual de Operaciones del sistema ThermoBrite, si desea más información sobre las precauciones de seguridad.

Consulte el capítulo Riesgos en el Manual de Operaciones del sistema Abbott VP2000 Processor, si desea más información sobre las precauciones de seguridad.



ATENCIÓN: esta preparación contiene componentes de origen humano o potencialmente infecciosos. Al no existir métodos de análisis que garanticen la inocuidad de materiales de origen humano o de microorganismos inactivados, estos reactivos y las muestras humanas deben manejarse como materiales infecciosos en conformidad con las instrucciones especificadas en las publicaciones Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories,¹⁴ OSHA Standards on Bloodborne Pathogens,¹⁵ CLSI Document M29-A3¹⁶ y otras prácticas de bioseguridad apropiadas.¹⁷ Todos los materiales de origen humano se deben considerar infecciosos.

Estas precauciones incluyen, entre otras, las siguientes:

- Use guantes al manejar las muestras o los reactivos.
- No pipetee con la boca.
- No coma, beba, fume, aplique cosméticos ni manipule lentes de contacto en áreas donde se trabaja con estos materiales.
- Limpie y desinfecte las salpicaduras de las muestras con un desinfectante tuberculicida como hipoclorito de sodio al 1,0% u otro desinfectante adecuado.¹⁴
- Descontamine y deseche todo el material potencialmente contaminado de acuerdo con la normativa vigente.¹⁷



Peligro

Componentes peligrosos a indicar en el etiquetado: formamida

- H360 Puede perjudicar la fertilidad o dañar al feto.
- P201 Pedir instrucciones especiales antes del uso.
- P202 No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad.
- P281 Utilizar el equipo de protección individual obligatorio.
- P308+P313 EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: consultar a un médico.
- P405 Guardar bajo llave.
- P501 Elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.

Declaración sobre las fichas de datos de seguridad: las fichas de datos de seguridad contienen información importante relativa al manejo seguro, el transporte y la eliminación de este producto.

NOTA: existen fichas de datos de seguridad (MSDS) para todos los reactivos suministrados con estos equipos, disponibles en el Centro de Asistencia Técnica de Abbott Molecular.

Vysis Esophageal FISH Probe Kit está diseñado para ser utilizado con muestras de citología de cepillado esofágico y en muestras de tejido esofágico humano embebidas en parafina y fijadas con formol. Todas las muestras biológicas deben ser manejadas como agente potencialmente infeccioso. Fallos en los procedimientos de desnaturalización del portaobjetos, hibridación y detección pueden dar resultados inaceptables o erróneos. Las condiciones de hibridación pueden verse afectadas negativamente por el uso de otros reactivos que no sean los suministrados por Abbott Molecular Inc. Es importante un almacenamiento adecuado de los componentes del equipo para asegurar el plazo de conservación indicado en el etiquetado. Los resultados del ensayo se pueden ver afectados si los componentes del equipo se almacenan a otras condiciones.

Vysis Esophageal FISH Probe Kit contiene formamida, que es teratogena. Evite el contacto con la piel y las mucosas. Se precisan termómetros calibrados para medir la temperatura de soluciones, baños de agua e incubadores. Verifique siempre la temperatura de la solución de pretratamiento y de los tampones de lavado antes de cada uso, midiendo la temperatura de la solución en la jarra de Coplin con un termómetro calibrado y limpio. Todos los materiales peligrosos deben desecharse de acuerdo con la normativa vigente sobre sustancias peligrosas.

Descomposición: los fluoróforos son fotosensibles. Para evitar la descomposición, maneje las soluciones y los portaobjetos que contengan fluoróforos en condiciones de luz reducida. Lleve a cabo todos los pasos que no requieran luz, tales como períodos de incubación y lavados, en la oscuridad.

Observaciones durante el procedimiento: antes de su uso, descongele los reactivos a temperatura ambiente y a continuación, centrifugue cada tubo de 2 a 3 segundos con una microcentrífuga.

Jorge Luis Martín
 Gerente de Producto
 Abbott Laboratories Argentina
 BMS



PROCEDIMIENTO

Materiales necesarios

- Vysis Esophageal FISH Probe Kit (equipo de sondas) (número de referencia 4N19-20)

Materiales necesarios pero no suministrados

Equipo de laboratorio

- Instrumento ThermoBrite
- Incubador de aire/estufa/placa caliente (54°C a 68°C)
- Microscopio de fluorescencia equipado con filtros recomendados (consulte el apartado Microscopio y accesorios)
- Portaobjetos de vidrio para microscopio limpios y cargados positivamente
- Cubreobjetos de vidrio de 22 mm x 22 mm
- Micropipetas (1 µl a 10 µl) y puntas de pipeta estériles
- Tubos de polipropileno para microcentrifuga (0,5 ml o 1,5 ml)
- Cronómetro
- Microtomo
- Microcentrifuga
- Agitador magnético
- Probeta graduada
- Baños de agua circulantes (37°C, 74°C y 80°C).

NOTA: los baños de agua termostáticos no suministran un control adecuado de la temperatura para baños de agua a altas temperaturas.

- Baño de agua purificada (40°C a 45°C)
- Punta de diamante
- Pinzas
- Jeringa desechable (5 ml)
- Jarras de Coplin (12 ml x 50 ml); tipo propuesto: número del producto Wheaton 900570 jarra de tinción vertical
- Termómetro calibrado
- Caja de portaobjetos con tapa para microscopio o carpetas de cartón para portaobjetos
- Pehachimetro y tiras reactivas para pH de margen estrecho
- VP2000

NOTA: el protocolo del VP2000 usará el mismo equipo con excepción de las jarras de Coplin.

Reactivos del laboratorio

- Agua purificada
- Etanol (100%)
- 20X SSC (número de referencia: 2J10-32 o equivalente)
- NP-40 (número de referencia: 7J05-01 o equivalente)
- Formol tamponado neutro al 10% pH 6,8 a 7,2 a 25°C (Grado del reactivo: para la fijación de muestras anatomopatológicas)
- HCl
- NaOH
- Adhesivo de caucho
- Aceite de inmersión adecuado para un microscopio de fluorescencia

EPFF

- HemoDe (o equivalente, p. ej., d-limoneno o xileno)
- Tinción de contraste DAPI I (número de referencia: 6J49-01)
- Proteasa (pepsina, USB, 3 000 unidades/mg a 4 000 unidades/mg)
- HCl 0,1 N

Citología

- Tinción de contraste DAPI II (número de referencia: 6J50-01)
- FISH Pretreatment Reagent Kit (equipo de reactivos de pretratamiento) (número de referencia: 2J03-32) O
- Proteasa (pepsina, Amresco)
- HCl 0,01 N
- 1X Solución salina en tampón fosfato (1X PBS), pH 7,4
- MgCl₂ (2M)

Microscopio y accesorios

Microscopio: es necesario un microscopio de epifluorescencia para observar los resultados de la hibridación. Si tiene a disposición un microscopio de fluorescencia, debe inspeccionarlo para comprobar que funciona correctamente y asegurarse de que la visualización de las muestras de ensayo de hibridación *in situ* por fluorescencia es óptima. Un microscopio que se utiliza para las tinciones generales de DNA como DAPI, yoduro de propidio y quinacrina puede no ofrecer un funcionamiento adecuado para los ensayos FISH. Se aconseja que el representante técnico del fabricante lleve a cabo la limpieza habitual y los mantenimientos periódicos, especialmente la alineación de la lámpara de mercurio.

NOTA: un supuesto fallo de los reactivos en un ensayo *in situ* puede ser debido a una avería o a un mal funcionamiento del microscopio de fluorescencia, o al uso de filtros inadecuados para observar una muestra correctamente hibridada.

Fuente de iluminación: se recomienda una lámpara de mercurio de 100 vatios. Registre el número de horas que ha estado en funcionamiento la bombilla y sustitúyala antes de transcurrido el tiempo indicado. Asegúrese de que la lámpara está alineada adecuadamente.

Objetivos: utilice objetivos acromáticos de inmersión en aceite para fluorescencia con aperturas numéricas ≥ 0,75 cuando utilice un microscopio con una lámpara de mercurio de 100 vatios o una lámpara de larga duración de 100 vatios. Un objetivo de 40 aumentos, combinado con oculares de 10 aumentos, resulta adecuado para el barrido de la muestra y seleccionar las regiones para el recuento. Se deben usar objetivos acromáticos de inmersión en aceite de 63 o 100 aumentos para la evaluación de los portaobjetos.

Aceite de inmersión: el aceite de inmersión que se emplee con objetivos de inmersión debe estar formulado para autofluorescencia baja y para su utilización específica en microscopía de fluorescencia.

Filtros: la hibridación de las sondas LSI ERBB2 (17q12) SGN/p16 (9p21) SR/ MYC (8q24) SA/ZNF217 (20q13.2) SGd a sus regiones diana se marca con una señal de fluorescencia verde, roja, aguamarina y oro, respectivamente. El resto de DNA presentará fluorescencia azul con la tinción DAPI. Abbott Molecular dispone de conjuntos de filtros de paso de banda simple óptimos para la mayoría de los modelos de microscopio de fluorescencia para el uso con los equipos de sondas LSI DNA.

Los conjuntos de filtros recomendados para las sondas Vysis Esophageal FISH Probe Kit son las de paso de banda simple DAPI, de paso de banda simple Green (verde), de paso de banda simple Red (rojo), de paso de banda simple Aqua (aguamarina) y de paso de banda simple Gold (oro).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO PARA MUESTRAS EMBEBIDAS EN PARAFINA Y FIJADAS CON FORMOL (EPFF)

Preparación de los reactivos

NOTA: mida a temperatura ambiente el pH de las soluciones que así lo indiquen. Si no se indica lo contrario, utilice un pehachimetro con un electrodo de vidrio.

Solución 20X SSC

Añada 132 g de 20X SSC a 400 ml de agua purificada. Mezcle bien. Añada agua purificada hasta conseguir un volumen total de 500 ml. Mezcle y filtre con un filtro de 0,45 µm. Almacénese a temperatura ambiente. Deseche la solución pasados 6 meses, o si ésta presenta un aspecto turbio o contaminado.

Solución de pretratamiento 1X SSC

Añada 50 ml de 20X SSC a 900 ml de agua purificada. Mezcle bien. Mida el pH y ajústelo a pH 6,3±0,2 con NaOH o HCl. Añada agua purificada hasta alcanzar un volumen total de 1 litro. Mezcle y filtre con un filtro de 0,45 µm. Almacénese a temperatura ambiente. Deseche la solución una vez pasados 6 meses, o si ésta presenta un aspecto turbio o contaminado.

Soluciones de etanol (70%, 85%, 100%)

Diluya etanol al 100% con agua purificada a la concentración de 70% y 85% v/v. Cuando no las utilice, almacénelas en recipientes cerrados a temperatura ambiente. Desechélas transcurridos 6 meses.

Solución de lavado 2X SSC/0,3% NP-40

Mezcle bien 100 ml de 20X SSC con 850 ml de agua purificada. Añada 3 ml de NP-40. Mezcle bien hasta que el NP-40 se haya disuelto completamente. Mida el pH y ajústelo a pH 7,0 a 7,5 con NaOH o HCl. Añada agua purificada hasta alcanzar un volumen total de 1 litro. Mezcle y filtre con un filtro de 0,45 µm. Almacénese a temperatura ambiente. Deseche la solución una vez pasados 6 meses, o si ésta presenta un aspecto turbio o contaminado.

Preparación de los reactivos de trabajo

NOTA: los volúmenes de las soluciones se proporcionan para las jarras de Coplin de 50 ml (consulte el apartado Equipo de laboratorio). Si se utilizan otro tipo de jarras de Coplin podría ser necesario un volumen mayor. En cualquier caso, debe utilizarse el volumen suficiente de forma que se cubra el área diana sin que se sumerjan las etiquetas del portaobjetos.

Agente aclarante Hemo-De

Llene 3 jarras de Coplin con 50 ml de agente aclarante Hemo-De. Desechélo tras haberlo utilizado 1 semana.

Jorge Luis MARTÍN
 Doctor en Ciencias Exactas
 Abbott Laboratories, Coplin
 Laboratorio de Diagnóstico



Solución de pretratamiento

Dispense 50 ml de 1X SSC con pH 6,3 en una jarra de Coplin. Caliente la jarra de temperatura ambiente a $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en un baño de agua circulante antes de pretratar los portaobjetos. Asegúrese de que la temperatura de la solución sea de $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ antes de utilizarla. Deséchela tras haberla utilizado 1 día.

Solución de proteasa (1,5 mg/ml)

Añada 0,075 g de proteasa (Pepsina USB, 3 000 unidades/mg a 4 000 unidades/mg) a 50 ml de HCl 0,1 N para obtener una concentración final de 1,5 mg/ml. Mezcle suavemente. Introduzca la solución de proteasa en una jarra de Coplin y colóquela en un baño de agua a una temperatura de 37°C . Déjela un mínimo de 30 minutos, mezclando de vez en cuando, y compruebe que la temperatura del tampón sea de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ antes de su uso. Compruebe visualmente que la proteasa se haya disuelto por completo antes de su uso. Deseche la solución tras haberla utilizado 1 día.

Agua purificada

Llene 1 jarra de Coplin con 50 ml de agua purificada. Utilícese a temperatura ambiente.

Soluciones de etanol

Llene 1 jarra de Coplin con 50 ml de etanol al 100%. Llene otra jarra de Coplin con 50 ml de etanol al 85%. Llene una tercera jarra de Coplin con 50 ml de etanol al 70%. Utilícese a temperatura ambiente. Deséchelas transcurridos 7 días o si muestran dilución excesiva o evaporación.

Procedimiento de pretratamiento de la muestra (tejido embebido en parafina y fijado con formol)

NOTA: el siguiente procedimiento de pretratamiento se ha optimizado para su uso con tejido embebido en parafina y fijado con formol. Si las muestras presentan una digestión excesiva, reduzca entre 3 y 5 minutos el tiempo de digestión de la proteasa. Si las muestras presentan una digestión insuficiente, aumente entre 3 y 5 minutos el tiempo de digestión de la proteasa. Consulte el apartado Diagnóstico y solución de problemas.

Preparación de los portaobjetos de muestra

NOTA: utilice tejido esofágico fijado con formol durante un tiempo máximo de 24 horas, que se haya procesado correctamente y que proporcione secciones de tejido buenas. Sea cuidadoso con las técnicas de laboratorio para evitar la contaminación cruzada entre portaobjetos al prepararlos.

1. Corte secciones de parafina de 4 μm a 6 μm de espesor con un microtomo.
2. Coloque las secciones en un baño de agua purificada (p. ej., destilada por triplicado) a 42°C .
3. Coloque una sección en un portaobjetos cargado positivamente.
4. Deje secar al aire los portaobjetos por la noche.
5. Deje reposar los portaobjetos sin teñir entre 2 y 24 horas a una temperatura de $56^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
6. Procese los portaobjetos sin teñir según los procedimientos siguientes.

PRETRATAMIENTO MANUAL

Retirada de la parafina de los portaobjetos

1. Sumerja los portaobjetos en Hemo-De durante 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Repita el paso dos veces utilizando cada vez Hemo-De recién preparado.
3. Deshidrate los portaobjetos con etanol al 100% durante 1 minuto a temperatura ambiente. Repita el paso.
4. Proceda inmediatamente con el pretratamiento del portaobjetos.

Pretratamiento de los portaobjetos

1. Sumerja los portaobjetos en 1X SSC con pH 6,3 a una temperatura de $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 35 minutos. Si fuera necesario, se pueden colocar 2 portaobjetos juntos por las caras que no presentan la muestra, en cada ranura de la jarra de Coplin, sólo 1 portaobjetos en cada una de las ranuras finales. De los portaobjetos que se colocan en las ranuras finales, la cara que tiene la sección tisular debe quedar dirigida al centro de la jarra de Coplin.
2. Sumerja los portaobjetos en agua purificada durante 3 minutos a temperatura ambiente.

Pretratamiento con proteasa

1. Retire los portaobjetos de la jarra que contiene agua purificada.
2. Retire el exceso de agua secando los bordes del portaobjetos con una toalla de papel. No los deje secarse.
3. Sumerja los portaobjetos en la solución de proteasa a una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 minutos. Si fuera necesario, se pueden colocar 2 portaobjetos juntos por las caras que no presentan la muestra, en cada ranura de la jarra de Coplin, sólo 1 portaobjetos en cada una de las ranuras finales. De los portaobjetos que se colocan en las ranuras finales, la cara que tiene la sección tisular debe quedar dirigida al centro de la jarra de Coplin.
4. Sumerja los portaobjetos en agua purificada durante 3 minutos a temperatura ambiente.
5. Sumerja los portaobjetos en etanol al 70% durante 1 minuto.
6. Sumerja los portaobjetos en etanol al 85% durante 1 minuto.
7. Sumerja los portaobjetos en etanol al 100% durante 1 minuto.
8. Seque los portaobjetos en un calentador de portaobjetos o déjelos secar al aire.
9. Siga con el procedimiento de hibridación o almacene los portaobjetos desecados a una temperatura de $-20^{\circ}\text{C} (\pm 5^{\circ}\text{C})$ hasta 1 semana.

PRETRATAMIENTO AUTOMÁTICO (VP2000)

Si desea más información sobre la utilización del sistema Abbott VP2000 Processor, consulte el manual de operaciones de este instrumento.

Tabla 1. Protocolo VP2000

Solución	Temperatura	Tiempo
Hemo De	Ambiente	5 minutos
Hemo De	Ambiente	5 minutos
Hemo De	Ambiente	5 minutos
Etanol al 100%	Ambiente	1 minuto
Etanol al 100%	Ambiente	1 minuto
Solución de pretratamiento 1X SSC	80°C	35 minutos
Agua purificada	Ambiente	3 minutos
Solución de proteasa	37°C	18 minutos
Agua purificada	Ambiente	3 minutos
Etanol al 70%	Ambiente	1 minuto
Etanol al 85%	Ambiente	1 minuto
Etanol al 100%	Ambiente	1 minuto
Secar al aire	—	—

Siga con el procedimiento de hibridación o almacene los portaobjetos desecados a una temperatura de $-20^{\circ}\text{C} (\pm 5^{\circ}\text{C})$ hasta 1 semana.

Procedimiento de hibridación (tejido embebido en parafina y fijado con formol)

Si desea más información sobre la utilización del sistema ThermoBrite, consulte la Guía del usuario de este instrumento.

En caso de que los portaobjetos hayan permanecido almacenados a una temperatura de $-20^{\circ}\text{C} (\pm 5^{\circ}\text{C})$, proceda según se describe en los pasos 5 a 8 del procedimiento Pretratamiento con proteasa.

1. Humedezca una tarjeta indicadora de la humedad con agua y colóquela en la apertura correspondiente en el instrumento ThermoBrite.
2. Ajuste la temperatura de fusión (*Melt Temp*) a 73°C y el tiempo de fusión (*Melt Time*) a 5 minutos. Fije la temperatura de hibridación (*Hyb Temp*) a 37°C y el tiempo de hibridación (*Hyb Time*) entre 16 y 20 horas.
3. Marque las áreas de hibridación con una punta de diamante por la parte de atrás del portaobjetos y colóquelos en el instrumento ThermoBrite.
4. Deje que la mezcla de sondas equilibre a temperatura ambiente.
5. Agite la mezcla de sondas en el Vortex para asegurarse de que la solución se haya mezclado bien. Centrifugue rápido la sonda para que la solución se deposite en el fondo del tubo y se eliminen las burbujas.
6. Deposite 10 μl de la mezcla de sondas sobre el portaobjetos y tápelos inmediatamente con el cubreobjetos.
7. Selle los bordes del cubreobjetos con adhesivo de caucho.
8. Inicie el programa co-hybridization (hibridación).



Al final del periodo de hibridación (de 16 a 20 horas), proceda con el paso **Lavado de los portaobjetos** descrito a continuación.

Lavado de los portaobjetos (tejido embebido en parafina y fijado con formol)

NOTA: se recomienda procesar 4 portaobjetos por cada jarra de Coplin para mantener las temperaturas adecuadas de las soluciones. Si tiene menos de 4, añada portaobjetos vacíos (que estén a temperatura ambiente) hasta que tenga un total de 4.

1. Dispense 50 ml de 2X SSC/0,3% NP-40 en una jarra de Coplin. Antes del uso, caliente la jarra de temperatura ambiente a 73°C ± 1°C en un baño de agua durante al menos 30 minutos.
2. Asegúrese de que la temperatura de la solución de lavado sea de 73°C ± 1°C antes de utilizarla. La solución se puede utilizar 1 día, después debe desecharse.
3. Dispense 50 ml de 2X SSC/0,3% NP-40 en otra jarra de Coplin. Utilícelase a temperatura ambiente para que se desprenda el cubreobjetos. La solución se puede utilizar 1 día, después debe desecharse.
4. Retire el adhesivo de caucho de 1 portaobjetos tratando de mover el cubreobjetos lo menos posible y sumerja el portaobjetos en 2X SSC/0,3% NP-40 a temperatura ambiente. Repita este paso con los otros portaobjetos y déjelos reposar de 2 a 5 minutos para que el cubreobjetos se desprenda del portaobjetos.
5. Sumerja el portaobjetos en la solución de lavado precalentada 2X SSC/0,3% NP-40. Repita el mismo procedimiento con los demás portaobjetos. Si tiene menos de 4, añada portaobjetos vacíos, que estén a temperatura ambiente, hasta que tenga un total de 4. Cronometre después de haber sumergido el cuarto portaobjetos.

NOTA: para mantener la temperatura adecuada de la solución 2X SSC/0,3% NP-40, lave 4 portaobjetos simultáneamente.

6. Sáquelos transcurridos 2 minutos.

NOTA: asegúrese de que la temperatura de la solución de lavado sea de 73°C ± 1°C antes de lavar otra serie de 4 portaobjetos.

Visualización de la hibridación

1. Deje secar al aire los portaobjetos durante un tiempo máximo de 2 horas en la oscuridad.

NOTA: los portaobjetos deben secar en posición vertical u horizontal sobre los bordes y no paralelos a la superficie.

2. Aplique 10 µl de tinción de contraste DAPI I al área diana del portaobjetos y después tápelos con un cubreobjetos. Deje que la tinción de contraste DAPI I penetre en el tejido durante 15 minutos antes de observarlo en el microscopio.
3. Lleve a cabo el recuento de la muestra en un microscopio de fluorescencia antes de que transcurran 24 horas o almacénela a una temperatura de -20°C (±5°C) hasta 1 semana.

Si utiliza este filtro de Vysis...	Se produce la excitación y emisión de...
Verde	Fluoróforo SpectrumGreen
Rojo	Fluoróforo SpectrumRed
Aguamarina	Fluoróforo SpectrumAqua
Oro	Fluoróforo SpectrumGold
DAPI	DAPI

Evaluación del portaobjetos

Utilice un objetivo de 10 aumentos o de 25 aumentos para ver el área hibridada y localizar las regiones que le interesen con ayuda del filtro DAPI. Realice el cribado de los portaobjetos empezando en 1 esquina y avanzando ordenadamente de 1 punto de visión al siguiente.

Examine las regiones elegidas con un objetivo de entre 40 aumentos y 63 aumentos, observando la morfología nuclear. Seleccione para la evaluación las áreas de tejido bien digeridas (los bordes del núcleo observados a través del DAPI) deben, por lo general, poder diferenciarse y el núcleo debe presentar un estado bueno).

Evaluación de la señal FISH

Con un objetivo de 63 a 100 aumentos, seleccione los núcleos que no se superpongan para el recuento de señales dentro del área diana. No cuente los núcleos cuya tinción de contraste sea inadecuada y no permita identificar los bordes de los núcleos. Recuento las señales de hibridación para cada una de las 4 sondas con los filtros Vysis correspondientes.

Almacenamiento

Almacene los portaobjetos a -20°C (±5°C), protegidos de la luz.

Limitaciones de uso

La interpretación de los resultados FISH se debe realizar utilizando controles y técnicas de análisis adecuadas, así como teniendo en cuenta otros datos clínicos y de diagnóstico.

Los laboratorios deben establecer un punto de corte de referencia analítico propio que defina los patrones de las señales para las anomalías de su interés.

Resultados esperados

Los núcleos diploides normales o los conjuntos de cromosomas en metafase se espera que muestren 8 señales fluorescentes (2 verdes, 2 rojas, 2 aguamarinas y 2 oro). Estas señales se corresponden a los 2 loci diana en cromosomas homólogos a los que están unidos cada una de las sondas fluorescentes: verde, ERBB2 (17q12); roja, p16 (9p21); aguamarina, MYC (8q24) y oro, ZNF217 (20q13.2).

Un número anómalo de copias del ...	se indica por un número superior o inferior a 2 copias de esta señal de la sonda:
gen ERBB2 (17q12)	Verde
gen p16 (9p21)	Rojo
gen MYC (8q24)	Aguamarina
gen ZNF217 (20q13.2)	Oro

Tenga en cuenta que al cortar las muestras embebidas en parafina se pueden seccionar los núcleos, lo que hace que algunos núcleos tengan menos señales que antes del corte. Por ejemplo, algunos núcleos normales contendrán menos de 2 señales ERBB2, p16, MYC y ZNF217 debido al seccionamiento del núcleo.

Tabla 2. Guía para la solución de problemas

Problema	Causa probable	Solución
• No hay señales o son muy débiles.	• Utilización de un conjunto de filtros inadecuado para visualizar los portaobjetos. • El microscopio no funciona correctamente. • Se han utilizado lámparas inadecuadas (xenón o tungsteno). • Lámpara de mercurio demasiado vieja. • Lámpara de mercurio mal alineada. • Lente colectora sucia o resquebrajada. • Espejo de la lámpara sucio o roto. • Lavado posthibridación a temperatura equivocada.	• Utilice los filtros recomendados. • Póngase en contacto con el representante técnico del fabricante del microscopio. • Utilice una lámpara de mercurio (se recomienda que sea de 100 vatios). • Sustitúyala por una lámpara nueva. • Vuelva a alinear la lámpara. • Limpie o sustituya las lentes. • Limpie o sustituya el espejo. • Compruebe que la temperatura de la solución de lavado sea de 73°C ± 1°C. • Disminuya la temperatura de la solución de lavado hasta el límite inferior del intervalo de temperatura. • Deposite el cubreobjetos tocando primero la superficie de la mezcla de hibridación.
	• Se formaron burbujas de aire bajo el cubreobjetos que impidieron el acceso de la sonda.	

Jorge Luis Marín
 Director de Laboratorio de Genética
 Hospital de Niños de Buenos Aires
 Fundación de Genética

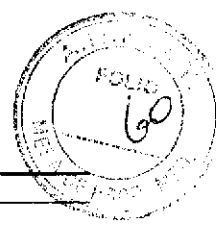


Tabla 2. Guía para la solución de problemas (cont.)

Problema	Causa probable	Solución
<ul style="list-style-type: none"> No hay señales o son muy débiles. 	<ul style="list-style-type: none"> Cantidad insuficiente de solución de hibridación para la sección. Digestión con proteasa inadecuada. 	<ul style="list-style-type: none"> Incrementa la cantidad de solución de hibridación a 20 µl por corte. Verifique que la temperatura de la solución sea de 37°C ± 1°C. Verifique que el pH de HCl 0,1 N sea 1,0 ± 0,2. Aumente el tiempo de digestión de la proteasa en incrementos de 3 a 5 minutos. En caso de que no se disponga de un nuevo portaobjetos, se podrá usar el mismo siguiendo el siguiente protocolo: <ul style="list-style-type: none"> Ponga el cubreobjetos del portaobjetos con tinción de contraste DAPI en remojo con solución de lavado 2X SSC/0,3% NP-40 a temperatura ambiente. Enjuague el portaobjetos en agua purificada. Coloque el portaobjetos en solución de proteasa a una temperatura de 37°C ± 1°C entre 3 y 5 minutos. Enjuague el portaobjetos en agua purificada. Siga con el procedimiento de hibridación según se describe en el apartado Procedimiento del ensayo para muestras embebidas en parafina y fijadas con formol.
	<ul style="list-style-type: none"> Sección demasiado fijada (los bordes celulares serán nítidos). 	<ul style="list-style-type: none"> Los tiempos de fijación de tejido prolongados podrían degradar de forma progresiva la intensidad de la señal y podrían requerir un tiempo de digestión superior.
	<ul style="list-style-type: none"> Pérdida de DNA (tinción con DAPI pobre). 	<ul style="list-style-type: none"> Verifique las condiciones de fijación.
<ul style="list-style-type: none"> Fondo sucio. 	<ul style="list-style-type: none"> Condiciones restrictivas (astringencia) de la solución de lavado inadecuadas. 	<ul style="list-style-type: none"> Compruebe el pH de las soluciones de lavado. Si el pH está fuera del intervalo de 7,0 a 7,5, deseche el tampón de lavado. Compruebe que la temperatura de la solución de lavado sea de 73°C ± 1°C. Aumente la temperatura de la solución de lavado hasta el límite superior del intervalo de temperatura.
<ul style="list-style-type: none"> Variación de la intensidad de la señal entre las secciones tisulares. 	<ul style="list-style-type: none"> Inherente en muchas secciones tisulares. 	<ul style="list-style-type: none"> Compruebe la tinción DAPI. Si la tinción DAPI en las zonas con pocos núcleos es buena, entonces haga el recuento del portaobjetos.

Tabla 2. Guía para la solución de problemas (cont.)

Problema	Causa probable	Solución
<ul style="list-style-type: none"> Variación de la intensidad de la señal entre las secciones tisulares. 	<ul style="list-style-type: none"> Sonda distribuida irregularmente en el portaobjetos debido a que hay burbujas de aire bajo el cubreobjetos. Sección demasiado grande. 	<ul style="list-style-type: none"> Repita la hibridación en la siguiente sección adyacente del mismo bloque de tejido y asegúrese de que no haya burbujas de aire debajo del cubreobjetos. Deposite el cubreobjetos tocando primero la superficie de la mezcla de hibridación. Aumente el volumen de la mezcla de sondas de hibridación a 20 µl en secciones tisulares grandes.
<ul style="list-style-type: none"> Pérdida tisular o morfología tisular degradada. 	<ul style="list-style-type: none"> Sección tisular poco fijada (tinción con DAPI pobre). No se han utilizado los portaobjetos apropiados. Incubación inapropiada del portaobjetos. Pretratamiento excesivo. Desnaturalización excesiva (tiempo de fusión). La sección tisular se ha desgarrado al retirar el cubreobjetos tras la hibridación. 	<ul style="list-style-type: none"> Reduzca el tiempo de digestión de la proteasa en incrementos de 3 a 5 minutos. Utilice portaobjetos cargados positivamente. Compruebe la temperatura del ThermoBrite/estufa/placa caliente/incubador (de 54°C a 68°C). En caso de que la parafina de los portaobjetos no esté derretida, aumente la temperatura (máximo hasta 68°C). Verifique que la temperatura de pretratamiento sea de 80°C ± 1°C. Disminuya el tiempo de pretratamiento. Disminuya el tiempo de digestión de la proteasa. Reduzca el tiempo de digestión de la proteasa (con un portaobjetos nuevo). Reduzca el tiempo de fusión (<i>Melt Time</i>) en incrementos de 1 minuto, a un tiempo de fusión mínimo de 2 minutos (con un portaobjetos nuevo). Prolongue el tiempo de remojo del cubreobjetos en tampón de lavado.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO PARA MUESTRAS DE CITOLOGÍA

Preparación de los reactivos

NOTA: mida a temperatura ambiente el pH de las soluciones que así lo indiquen. Si no se indica lo contrario, utilice un pehachímetro con un electrodo de vidrio.

Solución 20X SSC

Añada 132 g de 20X SSC a 400 ml de agua purificada. Mezcle bien. Añada agua purificada hasta conseguir un volumen total de 500 ml. Mezcle y filtre con un filtro de 0,45 µm. Almacéne a temperatura ambiente. Deseche la solución pasados 6 meses, o si ésta presenta un aspecto turbio o contaminado.

2X SSC

Mezcle bien 100 ml de 20X SSC con 850 ml de agua purificada. Mida el pH y ajústelo a pH 7,0 ± 0,2 con NaOH o HCl. Añada agua purificada hasta alcanzar un volumen total de 1 litro. Mezcle y filtre con un filtro de 0,45 µm. Almacéne a temperatura ambiente. Deseche la solución pasados 6 meses, o si ésta presenta un aspecto turbio o contaminado.

[Handwritten signature]

Jorge Luis Marín
 Parroquiano
 Coordinador Técnico
 Unidad Laboratorial de Citología
 Hospital General de Guayaquil



Formol al 1%

Mezcle bien 37 ml de 1X PBS, 12,5 ml de formol tamponado neutro al 10% y 0,5 ml de 100X (2M) MgCl₂ para preparar 50 ml de formol al 1%. Úselo diariamente recién preparado.

Soluciones de etanol (70%, 85%, 100%)

Diluya etanol al 100% con agua purificada a la concentración de 70% y 85% v/v. Cuando no las utilice, almacénelas en recipientes cerrados a temperatura ambiente. Deséchelas transcurridos 6 meses.

Solución de lavado 2X SSC/0,1% NP-40

Mezcle bien 100 ml de 20X SSC con 850 ml de agua purificada. Añada 1 ml de NP-40. Mezcle bien hasta que el NP-40 se haya disuelto completamente. Mida el pH y ajústelo a pH 7,0±0,2 con NaOH o HCl. Añada agua purificada hasta alcanzar un volumen total de 1 litro. Mezcle y filtre con un filtro de 0,45 µm. Almacénese a temperatura ambiente. Deseche la solución pasados 6 meses, o si ésta presenta un aspecto turbio o contaminado.

Solución de lavado 0,4X SSC/0,3% NP-40

Mezcle bien 20 ml de 20X SSC con 950 ml de agua purificada. Añada 3 ml de NP-40. Mezcle bien hasta que el NP-40 se haya disuelto completamente. Mida el pH y ajústelo a pH 7,4±0,2 con NaOH o HCl. Añada agua purificada hasta alcanzar un volumen total de 1 litro. Mezcle y filtre con un filtro de 0,45 µm. Almacénese a temperatura ambiente. Deseche la solución pasados 6 meses, o si ésta presenta un aspecto turbio o contaminado.

Preparación de los reactivos de trabajo

NOTA: los volúmenes de las soluciones se proporcionan para las jarras de Coplin de 50 ml (consulte el apartado Equipo de laboratorio). Si se utiliza otro tipo de jarras de Coplin podría ser necesario un volumen mayor. En cualquier caso, debe utilizarse el volumen suficiente de forma que se cubra el área diana sin que se sumerjan las etiquetas del portaobjetos.

Solución de pretratamiento

Dispense 50 ml de 2X SSC en una jarra de Coplin. Caliente la jarra de temperatura ambiente a 73°C ± 1°C en un baño de agua circulante antes de preparar los portaobjetos. Asegúrese de que la temperatura de la solución sea de 73°C ± 1°C antes de utilizarla. Deséchela tras haberla utilizado 1 día.

Solución de proteasa (0,5 mg/ml)

Añada 0,025 g de proteasa (Pepsina, Amresco) a 50 ml de HCl 0,01 N para obtener una concentración final de 0,5 mg/ml. Mezcle suavemente. Introduzca la solución de proteasa en una jarra de Coplin y colóquela en un baño de agua a una temperatura de 37°C. Déjela un mínimo de 30 minutos, mezclando de vez en cuando, y compruebe que la temperatura del tampón sea de 37°C ± 1°C antes de su uso. Compruebe visualmente que la proteasa se haya disuelto por completo antes de su uso. Deseche la solución tras haberla utilizado 1 día.

PBS

Llene 2 jarras de Coplin con 50 ml de 1X PBS. Utilícese a temperatura ambiente. Deseche las soluciones tras haberlas utilizado 1 día.

Formol al 1%

Mezcle 12,5 ml de formol tamponado neutro al 10%, 37 ml de 1X PBS y 0,5 ml de 100X MgCl₂. Llene 1 jarra de Coplin con 50 ml de solución de formol al 1%. La escala debe ser la correcta de acuerdo al volumen requerido. Utilícese a temperatura ambiente. Deséchelo tras haberlo utilizado 1 semana. Almacénelo a una temperatura entre 2°C y 8°C cuando no lo utilice.

Soluciones de etanol

Dispense 50 ml de etanol al 100% en 1 de las 3 jarras; 50 ml de etanol al 85% en otra jarra y 50 ml de etanol al 70% en la última. Utilícese a temperatura ambiente. Deséchelas transcurridos 7 días o si muestran dilución excesiva o evaporación.

PRETRATAMIENTO MANUAL

Pretratamiento de los portaobjetos

1. Sumerja los portaobjetos en 2X SSC a una temperatura de 73°C ± 1°C durante 2 minutos. Si fuera necesario, se pueden colocar 2 portaobjetos juntos por las caras que no presentan la muestra, en cada ranura de la jarra de Coplin, sólo 1 portaobjetos en una de las ranuras finales. De los portaobjetos que se colocan en las ranuras finales, la cara que tiene la muestra de células debe quedar dirigida al centro de la jarra de Coplin.

Pretratamiento con proteasa

1. Retire los portaobjetos de la jarra de 2X SSC.
2. Retire el exceso de 2X SSC secando los bordes del portaobjetos con una toalla de papel.
3. Sumerja los portaobjetos en la solución de proteasa a una temperatura de 37°C ± 1°C durante 10 minutos. Si fuera necesario, se pueden colocar 2 portaobjetos juntos por las caras que no presentan la muestra, en cada ranura de la jarra de Coplin, sólo 1 portaobjetos en cada una de las ranuras finales. De los portaobjetos que se colocan en las ranuras finales, la cara que tiene la muestra de células debe quedar dirigida al centro de la jarra de Coplin.
4. Sumerja los portaobjetos en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Fijación de formol al 1%

1. Retire los portaobjetos de la PBS.
2. Sumerja los portaobjetos en formol al 1% durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Retire los portaobjetos del formol al 1%.
4. Sumerja los portaobjetos en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Sumerja los portaobjetos en etanol al 70% durante 1 minuto.
6. Sumerja los portaobjetos en etanol al 85% durante 1 minuto.
7. Sumerja los portaobjetos en etanol al 100% durante 1 minuto.
8. Seque los portaobjetos en un calentador de portaobjetos o déjelos secar al aire.
9. Siga con el procedimiento de hibridación o almacene los portaobjetos desecados a una temperatura de -20°C (± 5°C) hasta 1 semana.

PRETRATAMIENTO AUTOMÁTICO (VP2000)

Si desea más información sobre la utilización del sistema Abbott VP2000 Processor, consulte el manual de operaciones de este instrumento.

Tabla 3. Protocolo VP2000

Solución	Temperatura	Tiempo
Solución de pretratamiento 2X SSC	73°C	2 minutos
Solución de proteasa	37°C	10 minutos
1X PBS	Ambiente	5 minutos
Formol al 1%	Ambiente	5 minutos
1X PBS	Ambiente	5 minutos
Etanol al 70%	Ambiente	1 minuto
Etanol al 85%	Ambiente	1 minuto
Etanol al 100%	Ambiente	1 minuto
Secar al aire	—	—

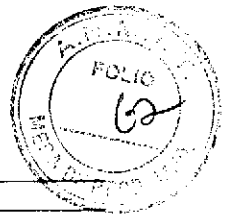
Siga con el procedimiento de hibridación o almacene los portaobjetos desecados a una temperatura de -20°C (± 5°C) hasta 1 semana.

Procedimiento de hibridación (muestras de citología)

Si desea más información sobre la utilización del sistema ThermoBrite, consulte la Guía del usuario de este instrumento. En caso de que los portaobjetos hayan permanecido almacenados a una temperatura de -20°C (± 5°C), proceda según se describe en los pasos 5 a 8 del procedimiento indicado en el apartado **Fijación de formol al 1%**.

Humedezca una tarjeta indicadora de la humedad con agua y colóquela en la apertura correspondiente en el instrumento ThermoBrite.

1. Ajuste la temperatura de fusión (*Melt Temp*) a 73°C y el tiempo de fusión (*Melt Time*) a 3 minutos. Fije la temperatura de hibridación (*Hyb Temp*) a 37°C y el tiempo de hibridación (*Hyb Time*) a un mínimo de 16 a 20 horas.
2. Marque las áreas de hibridación con una punta de diamante por la parte de atrás del portaobjetos y colóquelos en el instrumento ThermoBrite.
3. Agite la mezcla de sondas en el Vortex para asegurarse de que la solución se haya mezclado bien. Centrifugue rápido la sonda para que la solución se deposite en el fondo del tubo y se eliminen las burbujas.
4. Deposite 10 µl de la mezcla de sondas sobre el portaobjetos y tápelos inmediatamente con el cubreobjetos.
5. Selle los bordes del cubreobjetos con adhesivo de caucho.
6. Inicie el programa *co-hybridization* (cohibridación).



Al final del periodo de hibridación (de 16 a 20 horas), proceda con el paso **Lavado de los portaobjetos** descrito a continuación.

Lavado de los portaobjetos (citología)

Dispense 50 ml de 0,4X SSC/0,3% NP-40 en una jarra de Coplin. Antes del uso, caliente la jarra de temperatura ambiente a 73°C ± 1°C en un baño de agua durante al menos 30 minutos.

Asegúrese de que la temperatura de la solución de lavado sea de 73°C ± 1°C antes de utilizarla. La solución se puede utilizar 1 día, después debe desecharse.

Dispense 50 ml de 2X SSC/0,1% NP-40 en otra jarra de Coplin. Utilícese a temperatura ambiente. La solución se puede utilizar 1 día, después debe desecharse.

NOTA: para mantener la temperatura adecuada de la solución 0,4X SSC/0,3% NP-40, lave 4 portaobjetos simultáneamente. Si tiene menos de 4, añada portaobjetos vacíos, que estén a temperatura ambiente, hasta que tenga un total de 4. Cronometre después de haber sumergido el cuarto portaobjetos.

1. Sumerja el portaobjetos en la solución de lavado 0,4X SSC/0,3% NP-40 precalentada. Repita el mismo procedimiento con los demás portaobjetos.
2. Sáquelos transcurridos 2 minutos.
3. Sumerja los portaobjetos en la solución de lavado 2X SSC/0,1% NP-40 a temperatura ambiente de 5 segundos a 1 minuto. Repita el mismo procedimiento con los demás portaobjetos.

Visualización de la hibridación

1. Deje secar al aire los portaobjetos durante un tiempo máximo de 2 horas en la oscuridad.

NOTA: los portaobjetos deben secar en posición vertical u horizontal sobre los bordes y no paralelos a la superficie.

2. Aplique 10 µl de tinción de contraste DAPI II al área diana del portaobjetos y después tápelo con un cubreobjetos. Deje que la tinción de contraste DAPI II penetre en el tejido durante 15 minutos antes de observarlo en el microscopio.
3. Lleve a cabo el recuento de la muestra en un microscopio de fluorescencia antes de que transcurran 24 horas o almacénela a una temperatura de -20°C (± 5°C) hasta 1 semana.

Si utiliza este filtro de Vysis...	Se produce la excitación y emisión de...
Verde	Fluoróforo SpectrumGreen
Rojo	Fluoróforo SpectrumRed
Aguamarina	Fluoróforo SpectrumAqua
Oro	Fluoróforo SpectrumGold
DAPI	DAPI

Almacenamiento: almacene los portaobjetos a -20°C (± 5°C), protegidos de la luz.

Limitaciones de uso

La interpretación de los resultados FISH se debe realizar utilizando controles y técnicas de análisis adecuadas, así como teniendo en cuenta otros datos clínicos y de diagnóstico.

Los laboratorios deben establecer un punto de corte de referencia analítico propio que defina los patrones de las señales para las anomalías de su interés.

Resultados esperados

Los núcleos diploides normales se espera que muestren 8 señales fluorescentes (2 verdes, 2 rojas, 2 aguamarinas y 2 oro). Estas señales se corresponden a los 2 loci diana en cromosomas homólogos a los que están unidos cada una de las sondas fluorescentes: verde, ERBB2 (17q12); roja, p16 (9p21); aguamarina, MYC (8q24) y oro, ZNF217 (20q13.2).

Un número anómalo de copias del ...	se indica por un número superior o inferior a 2 copias de esta señal de la sonda:
gen ERBB2 (17q12)	Verde
gen p16 (9p21)	Rojo
gen MYC (8q24)	Aguamarina
gen ZNF217 (20q13.2)	Oro

Tabla 4. Guía para la solución de problemas

Problema	Causa probable	Solución
• No hay señales o son muy débiles.	<ul style="list-style-type: none"> • Utilización de un conjunto de filtros inadecuado para visualizar los portaobjetos. • El microscopio no funciona correctamente. • Se han utilizado lámparas inadecuadas (xenón o tungsteno). • Lámpara de mercurio demasiado vieja. • Lámpara de mercurio mal alineada. • Lente colectora sucia o resquebrajada. • Espejo de la lámpara sucio o roto. • Condiciones de hibridación incorrectas. • Lavado posthibridación a temperatura equivocada. 	<ul style="list-style-type: none"> • Utilice los filtros recomendados. • Póngase en contacto con el representante técnico del fabricante del microscopio. • Utilice una lámpara de mercurio (se recomienda que sea de 100 vatios). • Sustitúyala por una lámpara nueva. • Vuelva a alinear la lámpara. • Limpie o sustituya las lentes. • Limpie o sustituya el espejo. • Aumente el tiempo de hibridación al menos a 14 horas. • Compruebe que la temperatura de la solución de lavado sea de 73°C ± 1°C. • Disminuya la temperatura de la solución de lavado hasta el límite inferior del intervalo de temperatura. • Deposite el cubreobjetos tocando primero la superficie de la mezcla de hibridación. • Incremente la cantidad de solución de hibridación a 20 µl por diana. • Verifique que la temperatura de la solución sea de 37°C ± 1°C. • Aumente el tiempo de digestión de la proteasa en incrementos de 3 a 5 minutos. • Verifique las condiciones de fijación.
• Señal poco específica.	<ul style="list-style-type: none"> • Se formaron burbujas de aire bajo el cubreobjetos que impidieron el acceso de la sonda. • Cantidad insuficiente de solución de hibridación para la diana. • Digestión con proteasa inadecuada. • Pérdida de DNA (tinción con DAPI pobre). 	<ul style="list-style-type: none"> • Compruebe la temperatura de desnaturalización e hibridación. • Mantenga la temperatura de lavado a 73°C ± 1°C.
• Señal demasiado brillante.	<ul style="list-style-type: none"> • Condiciones de hibridación incorrectas. • Temperatura de lavado demasiado baja. • La concentración de la sonda es demasiado elevada para su microscopio. 	<ul style="list-style-type: none"> • Intente disminuir la señal con un filtro de densidad neutro en la vía de excitación.

Jorge Luis Marín
 Director de Diagnóstico
 Laboratorio de Citogenética y Cariotipos
 Hospital General de México

Tabla 4. Guía para la solución de problemas

Problema	Causa probable	Solución
• Fondo sucio.	• Condiciones restrictivas (astringencia) de la solución de lavado inadecuadas.	• Compruebe el pH de las soluciones de lavado. Si el pH está fuera del intervalo de 7,0 a 7,5, deseche el tampón de lavado. • Compruebe que la temperatura de la solución de lavado sea de 73°C ± 1°C. • Aumente la temperatura de la solución de lavado hasta el límite superior del intervalo de temperatura.
• La estructura de las células no está intacta.	• La muestra está sobredigerida.	• Reduzca el tiempo de digestión de la proteasa.

CARACTERÍSTICAS DE LA EVALUACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO

Introducción

Vysis Esophageal FISH Probe Kit se evaluó con respecto a la sensibilidad analítica y a la especificidad de las sondas LSI ERBB2 (17q12) SGN/p16 (9p21) SR/MYC (8q24) SA/ZNF217 (20q13.2) SGN según definen los patrones y normas del ACMG (American College of Medical Genetics Standards & Guidelines)¹³, así como al funcionamiento del ensayo en muestras de citología y EPFF.

Sensibilidad y especificidad analíticas

El funcionamiento de las sondas se evaluó en 100 extensiones en metafase de linfocitos de sangre humana cultivados, procedentes de 5 donantes (20 extensiones en metafase por espécimen de donante). Los portaobjetos se examinaron con un microscopio de fluorescencia equipado con filtros de paso de banda simple específicos para fluorescencia DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol), SpectrumAqua, SpectrumGreen, SpectrumGold y SpectrumRed. La evaluación de cada extensión de metafase consistió en contar el número de señales de la sonda ERBB2 (17q12) (verdes) que se encuentran en el lugar correcto (brazo q del cromosoma 17, banda 12, próxima a la región centromérica: señales verdaderas positivas) y el número de señales de la sonda ERBB2 que están localizadas en cualquier otra posición del cromosoma (señales falsas positivas). Lo mismo se hizo con la sonda roja LSI p16 (9p21) (la posición correcta está en la mitad del brazo p del cromosoma 9, banda 21), la sonda aguamarina LSI MYC (8q24) (la posición correcta está en el extremo de la región telomérica del brazo q del cromosoma 8, banda 24) y para la sonda oro LSI ZNF217 (20q13.2) (la posición correcta está en el brazo q del cromosoma 20, banda 13.2). Una vez evaluados los portaobjetos, las 4 sondas se encontraron en las localizaciones correctas del cromosoma y ninguna de las sondas mostró hibridación cruzada en ninguna de las 100 extensiones en metafase evaluadas.

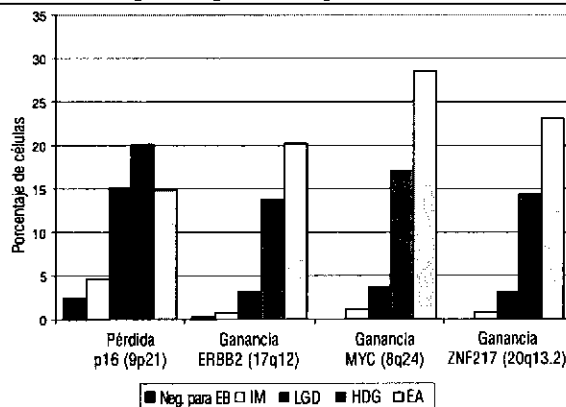
Funcionamiento del ensayo en muestras de citología

1. **Tasa de funcionamiento satisfactorio del ensayo (eficacia de la hibridación).** La tasa de funcionamiento satisfactorio se determinó con un espécimen alternativo de citología (orina). El análisis de hibridación *in situ* por fluorescencia se realizó en portaobjetos duplicados preparados a partir de muestras de 5 donantes normales, para un total de 60 ensayos. Treinta ensayos se realizaron con pretratamiento manual y otros 30 ensayos con el instrumento VP2000. Para determinar la tasa de funcionamiento satisfactorio del ensayo, los revisores evaluaron los siguientes parámetros de funcionamiento de la sonda: especificidad de la señal, intensidad de la señal, lectura de fondo del portaobjetos y lectura global para las sondas ERBB2 (17q12), p16 (9p21), MYC (8q24) y ZNF217 (20q13.2) en cada uno de los portaobjetos de muestra hibridados. De acuerdo a las características de la evaluación del funcionamiento, todos los ensayos examinados según el protocolo funcionaron satisfactoriamente.

2. **Estudio piloto: funcionamiento con muestras de citología de cepillado esofágico.** El análisis de hibridación *in situ* por fluorescencia se realizó con muestras de cepillado obtenidas por endoscopia, de 92 pacientes bajo supervisión por esófago de Barrett (EB) en la Mayo Clinic, Rochester, Minnesota.² 84 pacientes tenían antecedentes de displasia de alto grado (HGD) o adenocarcinoma de esófago (EAC) confirmados mediante una biopsia, 7 tenían antecedentes de displasia de bajo grado (LGD) y 1 antecedente únicamente de metaplasia intestinal (IM). A todos los pacientes se les practicaron biopsias sistemáticas durante la endoscopia. Los resultados histológicos para estos pacientes fueron 14 negativos para el esófago de Barrett, 16 con metaplasia intestinal, 20 con displasia de bajo grado, 22 con displasia de alto grado y 20 con atresia esofágica (EA). Una vez realizada la hibridación con la sonda marcada con fluorescencia [p16 (9p21) SR, ERBB2 (17q12) SGN, MYC (8q24) SA y ZNF217 (20q13.2) SGN], las muestras se analizaron con un microscopio de fluorescencia equipado con filtros de paso de banda simple específicos para fluorescencia DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol), SpectrumGreen, SpectrumRed, SpectrumAqua y SpectrumGold. El número de señales FISH para cada sonda se registró en 100 células consecutivas no escamosas y no inflamatorias. Tal y como se muestra en la Figura 1, el porcentaje de células con ganancia (más de 2 señales FISH) y con pérdida (menos de 2 señales) de cada locus se calculó según la clasificación histológica correspondiente.²

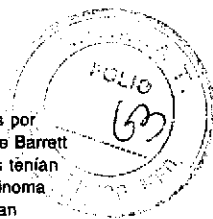
En la Figura 1 (adaptada a partir de los datos ofrecidos por Fritcher EG et al, 2008) se muestra el porcentaje medio de células con ganancia y pérdida de todos los locus según la categoría histológica. Se detectó un incremento considerable del porcentaje de células con una pérdida de 9p21 y ganancia de 8q24, 17q12 y 20q13.2 con evolución de epitelio escamoso benigno a displasia de alto grado. Se observaron incrementos adicionales en el porcentaje de células que muestran ganancias de 8q24, 17q12 y 20q13.2 con evolución a adenocarcinoma.

Figura 1. Porcentaje de células con ganancia y pérdida de cada locus según categoría histológica



Funcionamiento del ensayo en muestras de EPFF

1. **Tasa de funcionamiento satisfactorio del ensayo (eficacia de la hibridación).** La tasa de funcionamiento satisfactorio se determinó con especímenes de esofagoectomía EPFF de 10 pacientes (4 muestras benignas y 6 con adenocarcinoma de acuerdo al resultado de la evaluación histológica de tejido). El análisis de hibridación *in situ* por fluorescencia se realizó en muestras de secciones de 5 µm duplicadas, para un total de 60 ensayos. Treinta ensayos se realizaron con pretratamiento manual y otros 30 ensayos con el instrumento VP2000. Para determinar la tasa de funcionamiento satisfactorio del ensayo, los revisores evaluaron la especificidad de la señal, intensidad de la señal, lectura de fondo del portaobjetos y la lectura global para las sondas ERBB2 (17q12), p16 (9p21), MYC (8q24) y ZNF217 (20q13.2) en cada uno de los portaobjetos de muestra hibridados. De acuerdo a las características de la evaluación del funcionamiento, todos los ensayos examinados según el protocolo para muestras de tejido EPFF funcionaron satisfactoriamente.



Jorge Luis Martín
 Director General de Diagnóstico
 Abbott Laboratories Argentina



2. **Funcionamiento con muestras de tejido EPFF histológicamente normales.** Para la evaluación se prepararon 4 portaobjetos con cortes de secciones de 5 µm consecutivos de cada una de las 4 muestras de tejido EPFF esofágico benigno. Los portaobjetos se agruparon en 4 conjuntos de 4 portaobjetos cada uno, de forma que cada conjunto contenía 1 portaobjetos de cada una de las 4 muestras. Los 16 portaobjetos se hibridaron con la sonda Vysis Esophageal FISH Probe y se analizaron como sigue. En primer lugar, 3 revisores independientes contaron 1 conjunto de 4 portaobjetos para determinar la reproducibilidad del ensayo entre distintos observadores (interobservadores) en los recuentos de señales (12 evaluaciones). Los otros 3 conjuntos se asignaron a 3 revisores, 1 conjunto por revisor y el mismo revisor contó cada portaobjetos 3 veces con objeto de determinar la reproducibilidad ante un mismo observador (intraobservador) (36 evaluaciones, 12 por revisor). Las señales fluorescentes para cada una de las sondas se contaron y se registraron en 25 células consecutivas para cada muestra y determinar el número medio de señales ERBB2 (17q12), p16 (9p21), MYC (8q24) y ZNF217 (20q13.2) por célula así como calcular la reproducibilidad intraobservador e interobservadores (Tabla 5). Según se extrae claramente de la Tabla 5, el número medio de señales por célula en muestras histológicamente normales, se situó entre 1,83 y 1,89, con coeficientes de variación (CV) entre 5% y 7%. El número medio de señales por locus es inferior al valor esperado de 2 debido al seccionamiento de los núcleos durante el proceso de seccionamiento (el espesor del corte es menor al diámetro nuclear).

Tabla 5. Número medio de señales ERBB2 (17q12), p16 (9p21), MYC (8q24) y ZNF217 (20q13.2) por célula y reproducibilidad interobservadores e intraobservador

Sonda	Número medio de señales	Reproducibilidad Interobservadores ^a	
		D.E.	CV %
ERBB2	1,84	0,1	5,22
MYC	1,89	0,05	2,44
ZNF217	1,83	0,07	3,73
p16	1,85	0,13	6,93

Sonda	Número medio de señales	Reproducibilidad Intraobservador ^b	
		D.E.	CV %
ERBB2	1,86	0,05	2,56
MYC	1,93	0,05	2,54
ZNF217	1,89	0,05	2,44
p16	1,88	0,06	3,29

^a 3 revisores independientes contaron cada uno de los 4 portaobjetos
^b 4 portaobjetos por revisor, cada portaobjetos se contó 3 veces, 3 revisores

BIBLIOGRAFÍA

1. Brankley SM, Wang KK, Harwood AR, et al. The development of a fluorescence in situ hybridization assay for the detection of dysplasia and adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *J Mol Diagn.* 2006; 8(2):260-7.
2. Fritcher EG, Brankley SM, Kipp BF, et al. A comparison of conventional cytology, DNA ploidy analysis, and fluorescence in situ hybridization for the detection of dysplasia and adenocarcinoma in patients with Barrett's esophagus. *Hum Pathol.* 2008;39(8):1129-35.
3. Zhang HY, Spechler SJ and Souza RF. Esophageal adenocarcinoma arising in Barrett esophagus. *Cancer Lett.* 2009;275(2):170-7.
4. Odze RD. Update on the diagnosis and treatment of Barrett esophagus and related neoplastic precursor lesions. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(10):1577-85.
5. Pickens A and Orringer MB. Geographical distribution and racial disparity in esophageal cancer. *Ann Thorac Surg.* 2003;76(4):1367-9.
6. Pohl H and Welch HG. The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(2):142-6.
7. Umar SB and Fleischer DE. Esophageal cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2008;5(9):517-26.

8. Vizcaino AP, Moreno V, Lambert R, Parkin DM. Time trends incidence of both major histologic types of esophageal carcinomas in selected countries, 1973-1995. *Int J Cancer.* 2002;99(6):860-8.
9. American Cancer Society. Global Cancer Facts and Figures, 2007.
10. Pinkel D. Fluorescence In Situ Hybridization. In Introduction to Fluorescence In Situ Hybridization Principles and Clinical Applications. M. Andreeff and D. Pinkel Ed. Wiley-Liss. John Wiley & Sons, Inc.1999; 3-32.
11. Van Stedum S and King W. Basic FISH Techniques and Troubleshooting. In: Fan Y. Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. 2002; 204:51-63.
12. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med.* 2006;8(1):16-23.
13. ACMG Standards & Guidelines, 2008 Edition Validation requirements, Sections E9.2 and E10.2.2 standards.
14. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Also available online. Type>www.cdc.gov, search>BMBL5>look up sections III and IV.]
15. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens.*
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition.* CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
17. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual.* 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

NOTA: sonda LSI p16 (9p21)
 Adviértase que CDKN2A (inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 2A) ha sido aprobado por el Comité de Nomenclatura de Genes HUGO como el símbolo para el gen p16.

ASISTENCIA TÉCNICA

Si requiere asistencia técnica, póngase en contacto con el Centro de Asistencia Técnica de Abbott Molecular (+49-6122-580) o consulte la página web de Abbott Molecular en: <http://www.abbottmolecular.com>.

LSI, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumGold, SpectrumRed, SpectrumAqua y VP 2000 son marcas comerciales de Abbott Group of Companies en varios países. ThermoBrite es una marca comercial de Iris Sample Processing, Inc.

El resto de marcas comerciales está a nombre de sus propietarios.



Abbott Molecular Inc.
 1300 East Touhy Avenue
 Des Plaines, IL 60018 USA



Abbott GmbH & Co. KG
 Max-Planck-Ring 2
 65205 Wiesbaden
 Germany

© 2009, 2014 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
 Febrero 2014



John...
 Abbott Laboratories Argentina
 División...



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

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: 1-47-3110-6742-17-6

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 13 pagina/s.

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
DN: cn=GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE, o=AR, ou=SECRETARIA DE GOBIERNO DE MODERNIZACION,
ou=SECRETARIA DE MODERNIZACION ADMINISTRATIVA, serialNumber=CUIT 30715117564
Date: 2019.05.06 15:36:38 -03'00'

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
DN: cn=GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE, o=AR, ou=SECRETARIA DE GOBIERNO DE MODERNIZACION,
ou=SECRETARIA DE MODERNIZACION ADMINISTRATIVA, serialNumber=CUIT 30715117564
Date: 2019.05.06 15:36:39 -03'00'

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN
PRODUCTOS PARA DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO

Expediente nº 1-47-3110-6742/17-6

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) certifica que de acuerdo con lo solicitado por la firma ABBOTT LABORATORIES ARGENTINA S.A., se autoriza la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM), de nuevos productos para diagnóstico de uso in vitro con los siguientes datos característicos:

Nombre comercial: VYSIS ESOPHAGEAL FISH Probe Kit (Ref. 4N19-20).

INDICACIÓN DE USO: ENSAYO DISEÑADO PARA DETECTAR EL NÚMERO DE COPIAS DE LOS LOCUS ERBB2 (17q12), p16 (9p21), MYC (8q24) y ZNF217 (20q13.2) MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU* POR FLUORESCENCIA (FISH) EN MUESTRAS DE CITOLOGÍA (CEPILLADO ESOFÁGICO) Y EN MUESTRAS DE TEJIDO ESOFÁGICO EMBEBIDAS EN PARAFINA Y FIJADAS CON FORMOL (EPFF).

FORMA DE PRESENTACIÓN: Envases conteniendo: 1 vial x 200 µl.

PERIODO DE VIDA ÚTIL Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN: 12 (DOCE) MESES, desde la fecha de elaboración conservado entre -25 y -15 °C.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL FABRICANTE: ABBOTT MOLECULAR Inc. 1300 East Touhy Avenue. Des Plaines, IL 60018. (USA).

Condición de Venta/Categoría: venta a Laboratorios de análisis clínicos. USO PROFESIONAL EXCLUSIVO.-----

Sedes y Delegaciones

Tel. (+54-11) 4340-0800 - <http://www.argentina.gob.ar/anmat> - República Argentina

Sede Central
Av. de Mayo 869, CABA

Sede Alsina
Alsina 665/671, CABA

Sede INAME
Av. Caseros 2161, CABA

Sede INAL
Estados Unidos 25, CABA

Sede Prod. Médicos
Av. Belgrano 1480, CABA

Deleg. Mendoza
Remedios de Escalada de
San Martín 1909, Mendoza
Prov. de Mendoza

Deleg. Córdoba
Obispo Trejo 635,
Córdoba,
Prov. de Córdoba

Deleg. Paso de los Libres
Ruta Nacional 117, km.10,
CO.TE.CAR., Paso de los Libres,
Prov. de Corrientes

Deleg. Posadas
Roque González 1137,
Posadas, Prov. de
Misiones

Deleg. Santa Fé
Eva Perón 2450,
Santa Fé,
Prov. de Santa Fé

WMB

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del PRODUCTO
PARA DIAGNOSTICO USO IN VITRO PM-39-647.

Expediente Nº 1-47-3110-6742/17-6

Disposición Nº

4481 27 MAYO 2019

Dr. Waldo Beloso
Subadministrador Nacional
ANMAT