



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

DISPOSICIÓN Nº **0870**

BUENOS AIRES **23 ENE 2015**

VISTO, el expediente nº 1-47-8247/14-5 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por las presentes actuaciones la firma BIOSYSTEMS S.A. solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos del Producto para diagnóstico de uso "in Vitro" denominado IgH Rearrangements Molecular Analysis Kit / permite detectar la presencia de clonalidad en procesos linfoproliferativos de células B, mediante la amplificación de los segmentos reordenados VDJ de la región hipervariable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH).

Que a fs. 119 consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que el producto 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 establece la Ley 16.463, Resolución Ministerial Nº 145/98 y Disposición A N M A T Nº 2674/99.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por el Artículo 8º inciso 11) del Decreto Nº 1490/92 y 1886/14.



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

DISPOSICIÓN N° 0870

Por ello;

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

D I S P O N E:

ARTICULO 1º.- Autorízase la venta a laboratorios de análisis clínicos del Producto para diagnóstico de uso "in Vitro" denominado IgH Rearrangements Molecular Analysis Kit / permite detectar la presencia de clonalidad en procesos linfoproliferativos de células B, mediante la amplificación de los segmentos reordenados VDJ de la región hipervariable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH) que será elaborado por Master Diagnóstica S.L., Avda. Del Conocimiento N°100, Pt Ciencias de la salud, 18007 Granada (ESPAÑA) e importado por BIOSYSTEMS S.A. a expenderse en envases conteniendo mix FR1-JH of IgH gene (Tubos color rojo: 20 x 46 µl), mix FR2-JH of IgH gene (Tubos color verde: 20 x 46 µl), mix FR3-JH of IgH gene (Tubos color violeta: 20 x 46 µl), Internal Control mix (Tubos color amarillo: 20 x 46 µl), Phire® Hot Start II DNA Polymerase (2 X 60µl), Clonal B Positive Control DNA (50 µl), Polyclonal Positive Control DNA(50 µl), para 20 test;cuya composición se detalla a fojas 50 con un período de vida útil de 15 (QUINCE) meses desde la fecha de elaboración conservado a - 20 °C.

ARTICULO 2º.- Acéptense los rótulos y manual de instrucciones obrantes a fojas 54 a 104 y 116 a 118 , desglosándose las fojas 54 a 65, 90 a 94 y 116 debiendo



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

DISPOSICIÓN N° **0870**

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 Mesa de Entradas de la Dirección Nacional de Productos Médicos 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: 1-47-8247/14-5.-

DISPOSICIÓN N°:

**0870**

av.

  
  
Ing. ROGELIO LOPEZ  
Administrador Nacional  
A.N.M.A.T.

	Av. Dorrego 673 1414 - Buenos Aires Tel.: 54-11-4854-7775 Fax: 54-11-4857-0884 e-mail: info@biosystems.com.ar	
---	---	---

### PROYECTOS DE ROTULO

#### ➤ PROYECTO DE ROTULO EXTERNO

1 - Nombre del producto:

#### ➤ KIT PARA ANALISIS MOLECULAR DEL GEN IgH

### Rótulo Externo

#### **KIT PARA ANALISIS MOLECULAR DEL GEN IgH**

- FR1-JH (6-FAM)  
20 tubos PCR color rojo (46 µl)
- FR2-JH (6-FAM)  
20 tubos PCR color verde (46 µl)
- FR3-JH (6-FAM)  
20 tubos PCR color púrpura (46 µl)
- Mezcla control interno (6-FAM)  
20 tubos PCR color amarillo (46 µl)

  
Lic. Alejandro Diez  
Apoderado  
BioSystems S.A.

  
Dra. SILVANA ZANELA  
DIRECTORA TECNICA  
MN 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.



0870



	Av. Dorrego 673 1414 - Buenos Aires Tel.: 54-11-4854-7775 Fax: 54-11-4857-0884 e-mail: info@biosystems.com.ar	
--	---	--

**PROYECTOS DE ROTULO**

➤ **PROYECTO DE ROTULO EXTERNO**

1 - Nombre del producto:

➤ **KIT PARA ANALISIS MOLECULAR DEL GEN IgH**

2 - Nombre del establecimiento elaborador:

**MASTER DIAGNÓSTICA** Avda. Conocimiento 100, P. T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España).

2a - Nombre del establecimiento importador:

**Biosystems S.A.**  
Av. Dorrego 673  
CKB1414- Buenos Aires  
Argentina

3 - Leyenda "Autorizado por el MS y AS": **AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:**

4 - Número de lote o partida:

5 - Fecha de Vencimiento:

6 - Constitución del equipo:

7 - Unidades métricas: **Kit para 20 Test**

8 - Leyenda "Uso in vitro"

9 - Finalidad o uso al que está destinado: **"Ver Instrucciones de Uso"**

10-Precauciones: **"Ver Instrucciones de Uso"**

11- Condiciones de conservación, almacenamiento y transporte: **-20°C**

Vic. Alejandro Dier  
Biosystems S.A.

Dra. Susana Zampieri  
DIRECTORA TÉCNICA  
AN 14 421  
BIOSYSTEMS S.A.

0870



Proyecto de Rótulo Externo


**master**  
 Diagnostics

**IgH Rearrangements Molecular Analysis Kit**


Avda. Dorrego 673  
 11200 Montevideo, Uruguay  
 Tel. 54-011-4854-7775

**REF** MAD-0038S4BP-2 (20 tests)  
**LOT** BP014  
 2014-07      (-20) °C

CE  
 IVD

EAN 8435256771679



(01)09406256771679(11)140731(10)BP014

Importado por:  
**BioSystems S.A**  
 Domicilio: **Av. Dorrego 673**  
**Tel. 54-011-4854-7775**  
 Directora Técnica: **Farm. Silvína Zanelá**  
**USO PROFESIONAL EXCLUSIVO**  
**AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:**

Dr. Alejandro Diez  
 Apoderado  
 BioSystems S.A.

  
 Dra. SILVINA ZANELA  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 MN 14.421  
 BIOSYSTEMS S.A.

Proyecto de Rótulo Interno

-Rotulo interno en la caja

Las mezclas A, B y de control interno no llevan etiqueta en el propio tubo. Tal y como indica la Ficha Técnica vienen identificadas por colores.  
Adicionalmente, en el interior de la caja hay una etiqueta que indica a que color corresponde cada mezcla.

**IgH REARRANGEMENTS  
MOLECULAR ANALYSIS KIT**

Red tube mix FR1-JH of IgH gene (\*)  
Green tube mix FR2-JH of IgH gene (\*)  
Purple tube mix FR3-JH of IgH gene (\*)  
Yellow tube Internal control mix (\*)

(\*) This mixture includes a primer labelled  
with 6-FAM fluorochrome

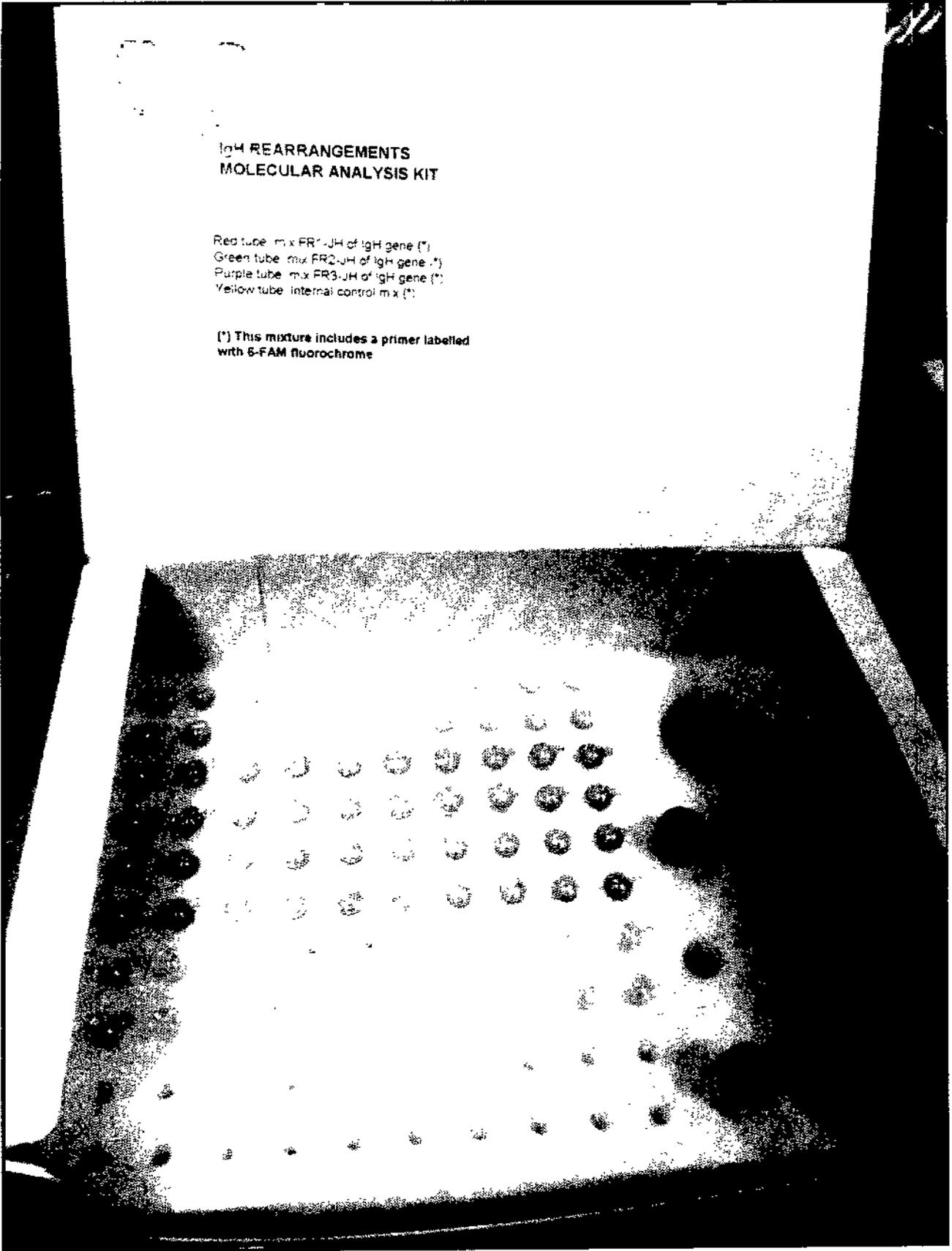
Dr. Alejandro Diez  
apoderado  
BioSystems S.A.

Dra. Silvia Zúñiga  
DIRECTORA TÉCNICA  
M. 4421  
BIOSYSTEMS

### IgH REARRANGEMENTS MOLECULAR ANALYSIS KIT

Red tube: mix FR1-JH of IgH gene (\*)  
Green tube: mix FR2-JH of IgH gene (\*)  
Purple tube: mix FR3-JH of IgH gene (\*)  
Yellow tube: internal control mix (\*)

(\*) This mixture includes a primer labelled  
with 5-FAM fluorochrome



Lic. Alejandro Diez  
Apoderado  
BioSystems S.A.

Dr. S. V. ...  
L. ...  
BIOSYSTEMS S.A.



0870

-Rotulos internos

**Phire Hot Start II DNA Polymerase**

REF MAD-F122-2(60 µl)  
LOT 00177012

(-20) °C  
 2017/12

CE  
IVD

**Clonal B Positive Control DNA**

REF MAD-003994B2(50 µl)  
LOT RAIOSM14

(-20) °C  
 2016/11

CE  
IVD

**Polyclonal Positive Control DNA**

REF MAD-003994B3(50 µl)  
LOT AMG12

(-20) °C  
 2016/03

CE  
IVD

Lic. Alejandro Diez  
Aprobado  
BioSystems S.A.

Dra. SILVANA ZANELLA  
DIRECTORA TECNICA  
IN 10421  
BIO SYSTEMS S.A.

## KIT PARA ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN IgH

N° CAT. MAD-003994BP-2/5 (20 DETERMINACIONES)

El diagnóstico de los linfomas malignos es una de las áreas que más dificultad reviste dentro de la histopatología. Si bien muchos casos se diagnostican a través de los datos histomorfológicos e inmunohistoquímicos, ocasionalmente el diagnóstico diferencial entre un proceso reactivo y un linfoma maligno es difícil de establecer. En estos casos, la detección de clonalidad mediante análisis molecular por PCR de reordenamientos de los genes de las inmunoglobulinas (Ig) y TCR, es un instrumento de gran valor en el diagnóstico de los procesos linfoproliferativos B y T. Los reordenamientos para Ig y TCR se dan en las regiones hipervariables de dichos genes, cada linfocito maduro presenta un reordenamiento específico con una longitud y secuencia únicas en estas regiones. Por tanto si lo que se amplifica es el ADN de una población linfocida normal o reactiva, el resultado serán múltiples fragmentos dentro de un rango de tamaño determinado, con una distribución Gaussiana. Cuando se amplifica ADN procedente de un proceso tumoral, clonal, todos los fragmentos resultantes serán idénticos en secuencia y tamaño, obteniéndose una banda o pico único mayoritario.

Este kit permite detectar la presencia de clonalidad en procesos linfoproliferativos de células B, mediante la amplificación de los segmentos reordenados VDJ de la región hipervariable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH), empleando múltiples cebadores consenso que hibridan con regiones conservadas dentro de dichos genes.

### Características del kit:

- Contiene una mezcla de amplificación para cada uno de los segmentos FR1-JH, FR2-JH y FR3-JH y un control interno (CI) de amplificación, para comprobar la calidad del ADN.
- Las mezclas de amplificación se presentan en formato "monotest" en tubos de PCR de 0.2 ó 0.5 ml, identificadas con diferentes colores.
- **Todas las mezclas de PCR** incluyen cebadores marcados en su extremo 5' con el fluorocromo 6-FAM, lo que permite hacer un análisis automático de fragmentos por electroforesis capilar en GeneScan.
- Todas las amplificaciones se pueden realizar con un único programa en el termociclador.
- La enzima Phire® Hot Start II ADN Polimerasa es suministrada en el kit.
- Se incluyen controles positivos de ADN clonal y policlonal.

*Este producto es para diagnóstico in vitro*

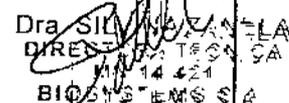
### MASTER DIAGNÓSTICA

Avda. Conocimiento, 100, P.T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España)  
master@vitroweb.com [www.masterdiagnostica.com](http://www.masterdiagnostica.com)

1/12



U. Alejandro Díez  
Apoderado  
BioSystems S.A.



Dra. SILVIA ZANUELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
M. 14 424  
BIO SYSTEMS S.A.



**Componentes incluidos en el kit:**
**0870**
**Tabla 1. Composición de reactivos:**

REACTIVO	REFERENCIA	COMPONENTES	CANTIDAD
Mezclas de amplificación (monotest en tubos de 0.2 ó 0.5 ml)	MAD-003994BP-2/-5	FR1-JH (6-FAM) (mezcla de oligonucleótidos de las regiones FR1 y JH del gen IgH, dNTP y solución tamponada)	20 tubos PCR color rojo (46 µl)
		FR2-JH (6-FAM) (mezcla de oligonucleótidos de las regiones FR2 y JH del gen IgH, dNTP y solución tamponada)	20 tubos PCR color verde (46 µl)
		FR3-JH (6-FAM) (mezcla de oligonucleótidos de las regiones FR3 y JH del gen IgH, dNTP y solución tamponada)	20 tubos PCR color púrpura (46 µl)
		Mezcla control interno (6-FAM) (oligonucleótidos específicos del gen p53 exón 5, dNTP y solución tamponada)	20 tubos PCR color amarillo (46 µl)
ADN polimerasa	MAD-F122-2	Phire® Hot Start II ADN Polimerasa *	2 x 60 µl
Controles positivos de ADN	MAD-003994B2	ADN Control positivo clonal B (50µg/ml)	1 x 50 µl
	MAD-003994B3	ADN Control positivo policlonal (100µg/ml)	1 x 50µl

**\* Aspectos legales:**

El precio de venta de este producto incluye una licencia limitada, no transferible, protegida por patentes de EEUU y otras (5.500.363 y 5.352.778), propiedad de New England Biolabs, Inc., para el uso de este producto. Ninguna otra licencia bajo estas patentes es otorgada al cliente, expresamente o por implicación, por la compra de este producto.

El precio de venta de este producto incluye una licencia limitada, no transferible, protegida por patentes de EEUU y otras, propiedad de BIO-RAD Laboratories, Inc. para el uso de este producto. Ninguna otra licencia bajo estas patentes es otorgada al cliente, expresamente o por implicación, por la compra de este producto.

Este producto está protegido por una licencia bajo patente US 5.436.149 propiedad de TaKaRa Shuzo Co. Ltd.

EL producto se vende bajo licencia de Affibody AB, Suecia.

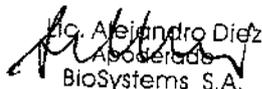
Phire® and DyNAzymo™ son marcas registradas de Finnzymes Oy, una compañía del grupo Thermo Fisher Scientific. Affibody® es una marca registrada de of Affibody AB, Suecia.

**MASTER DIAGNÓSTICA**

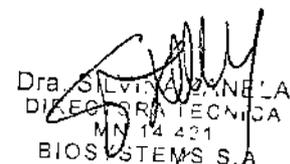
Avda. Conocimiento, 100, P.T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España)

 master@vitroweb.com [www.masterdiagnostica.com](http://www.masterdiagnostica.com)

2/12



Alejandro Diez  
Asesor de  
BioSystems S.A.



Dra. SILVIA AZNAR  
DIRECTORA TÉCNICA  
M.º 14 421  
BIOSYSTEMS S.A.

**Material necesario no suministrado en el kit:**

**Instrumentación específica:**

Termociclador  
Microcentrífuga  
Baño termostático/estufa  
Fuente de alimentación  
Cubeta de electroforesis para ADN  
Transiluminador para luz ultravioleta  
Sistema de documentación de geles  
Equipo de secuenciación con electroforesis capilar

**Material fungible:**

Xileno (opcional)  
Etanol 100%  
Tampón PBS (para extracción de linfocitos a partir de sangre total)  
Tampón TE 1x (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0)  
Tubos eppendorf 1,5/0,6/0,2 ml libres de ADNsa/RNasa  
Reactivos para llevar a cabo la extracción de ADN genómico a partir de muestras de sangre, botones celulares, tejidos frescos, o tejidos fijados en formalina tamponada e incluidos en parafina. Todos los reactivos están incluidos en el **Kit de Master Diagnóstica S.L.: KIT DE EXTRACCIÓN DE DNA TOTAL Ref: MAD-003951M**  
Reactivos para llevar a cabo la electroforesis del ADN amplificado (geles de agarosa o poli(acrilamida) y reactivos auxiliares de electroforesis). *Todos los reactivos están incluidos en los Kits de Master Diagnóstica S. L.: ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA y POLIACRILAMIDA Ref: MAD-003980M y MAD-003990M respectivamente.*  
Reactivos para análisis de fragmentos por GeneScan: Polímero POP-4, estándar de peso molecular GeneScan 400HD ROX, tampón EDTA y formamida desionizada.

**Precauciones:**

Durante todo el desarrollo de la técnica es aconsejable el empleo de guantes desechables. Dada la elevada sensibilidad de la técnica de amplificación de ADN se recomienda que la reacción de amplificación se lleve a cabo utilizando puntas de pipeta con filtro para evitar contaminación. La mayor fuente de contaminación suele ser el propio producto amplificado, por lo cual es recomendable llevar a cabo la manipulación de los productos amplificados y la posterior electroforesis en zonas de trabajo separadas de la zona donde se procesan las muestras y emplear pipetas distintas en cada caso. Es conveniente delimitar tres áreas de trabajo: la zona de procesamiento y preparación de las muestras de ADN, la zona de amplificación y la zona de detección (electroforesis). El flujo de trabajo debe ir siempre en una única dirección, desde la zona de preparación de las muestras y amplificación hasta la zona de detección y nunca en dirección opuesta. Se recomienda incluir controles negativos de amplificación que contengan todos los reactivos manejados en el kit, con excepción de la muestra de ADN, con objeto de detectar y controlar cualquier posible contaminación de los reactivos con ADN tanto procedente de muestras problema como de productos amplificados.

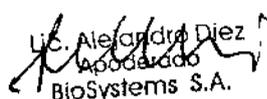
**Almacenamiento y transporte:**

El Kit se transporta y almacena a -20°C. Una vez descongelada la solución de lisis se puede guardar a 4°C sin necesidad de volver congelar. Los ADN control incluidos en cada kit también se deben almacenar a 4°C una vez descongelados.

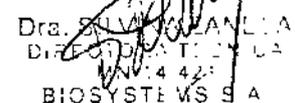
**MASTER DIAGNÓSTICA**

Avda. Conocimiento, 100, P.T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España)  
master@vitroweb.com [www.masterdiagnostica.com](http://www.masterdiagnostica.com)

3/12



Lic. Alejandro Diez  
apodado  
BioSystems S.A.



Dra. Silvia Manilla  
DIRECCIÓN DE LA  
N.º 4 425  
BIOSYSTEMS S.A.

## PROCEDIMIENTO TÉCNICO

### 1. EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO

Antes de comenzar con la extracción de ADN, descongelar los reactivos suministrados en el kit: aceite mineral, solución de lisis y un vial de solución de proteasa. Tras su uso, el aceite mineral y la solución de lisis se pueden almacenar a 4° C. La solución de proteasa se debe almacenar congelada a -20 °C y evitar repetidas congelaciones/descongelaciones.

#### 1.1. SECCIONES DE TEJIDO INCLUIDO EN PARAFINA

1. Tomar 1-4 secciones de tejido (según la cantidad de material presente en cada sección) de 10 µm de grosor y colocar en tubo de microcentrífuga de 1,5 ml valiéndose de una aguja o unas pinzas finas.
2. Añadir 500 µl de **aceite mineral** (incluido en el kit) y calentar en bloque térmico 2 min a 95° C. Centrifugar 2 min a 8000 rpm en microcentrífuga.
3. Eliminar el aceite mineral sin arrastrar restos de tejido.
4. Repetir los pasos 2 y 3. (Los restos de aceite mineral no interfieren en el proceso de extracción de ADN).
5. Preparar una mezcla de **solución de lisis y solución de proteasa** en proporción **50:1** (por cada 50 µl de sol. de lisis añadir 1 µl de sol. de proteasa) en volumen suficiente para procesar las muestras de tejido.
6. Al botón de tejido resultante añadir **un volumen adecuado de la mezcla anterior (50-500 µl)**, hasta conseguir que el tejido quede en suspensión en la solución. (Este punto es muy importante para conseguir un buen rendimiento de ADN y degradar los restos celulares contaminantes, que podrían interferir en la posterior amplificación de dicho ADN).
7. Agitar varias veces con la micropipeta para homogenizar, centrifugar 5 segundos para eliminar las burbujas e incubar durante **24-48 horas a 55°C** en baño termostatzado o bloque térmico.
8. Calentar a **95° C** en bloque térmico durante **8-10 min** para inactivar la proteasa.
9. Centrifugar 5 min a velocidad máxima. Tras centrifugar deben quedar dos fases, una superior que corresponde a los restos de aceite mineral y una inferior acuosa que contiene el ADN en solución. En el fondo del tubo puede quedar un pequeño botón de restos de tejido no digeridos. **RECOGER LA FASE ACUOSA** (contiene el ADN) evitando tomar restos de tejido del fondo del tubo.
10. Usar **3 µl** de esta solución de ADN para amplificar. La muestra se puede almacenar, siendo estable a 4 °C durante una semana. o a -20/-80 °C durante varios meses.

#### 1.2. TEJIDO CONGELADO

1. Cortar 1-2 secciones de tejido en criostato o bien ayudándose con una hoja de bisturí y colocar en tubo de microcentrífuga de 1,5 ml valiéndose de una aguja o unas pinzas finas.
2. Continuar con el **paso 5** del protocolo anterior para secciones parafinadas.

*Nota: Para evitar evaporación de la solución de lisis durante la incubación a 55 °C se pueden añadir unas gotas de aceite mineral incluido en el kit.*

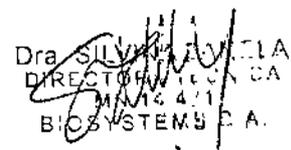
### MASTER DIAGNÓSTICA

Avda. Conocimiento, 100, P.T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España)  
master@vitroweb.com [www.masterdiagnostica.com](http://www.masterdiagnostica.com)

4/12



Alejandro Díez  
Apoderado  
BioSystems S.A.



Dra. SILVIA ÁLVAREZ  
DIRECTORA TÉCNICA  
BIO SYSTEMS S.A.

### 1.3. MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA/MÉDULA ÓSEA

**Nota:** No usar sangre total heparinizada. Se recomienda el uso de EDTA o Citrato Sódico como anticoagulantes.

1. Aislar población blanca mediante **Buffy Coat**: partir de **1,5 ml** de **sangre/médula** con EDTA y fraccionar centrifugando a **1500-2000 x g** durante **10-15 min** a temperatura ambiente. Este proceso separará una fase superior de plasma, una inferior con la población roja y una delgada interfase entre ambas con las células blancas (buffy coat). (En una centrífuga clínica típica 1500-2000 x g equivale a 3000-3400 rpm).
2. Recoger la población blanca intermedia y pasar a un tubo limpio.
3. Lavar con **5 ml** de tampón **TE 1X** e incubar **10 min** a **37° C** para lisar los restos de hematíes.
4. Centrifugar a **3000 rpm** **5 min** para precipitar las células blancas.
5. Resuspender el botón celular en **1 ml** de tampón **TE 1X** y pasar a un tubo eppendorf de 1,5 ml.
6. Centrifugar a **8000 rpm** **5 min** en microcentrífuga y eliminar el sobrenadante.
7. Continuar con el **paso 5** del protocolo 1.1 para muestras parafinadas.

**Nota:** Para evitar evaporación de la solución de lisis durante la incubación a 55 °C se pueden añadir unas gotas de aceite mineral incluido en el kit.

## 2. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN

Por cada muestra de ADN problema a analizar se amplificarán **4 mezclas**: una para cada fragmento **FR1, FR2 y FR3** y otra para el control interno (**CI**). Se recomienda preservar las mezclas de la luz, ya que contienen cebadores marcados con fluorescencia.

### 2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

1. Descongelar 1 tubo **rojo (FR1-JH)**, 1 tubo **verde (FR2-JH)**, un tubo **violeta (FR3-JH)** y un tubo **amarillo (CI)** por cada muestra, mantener en hielo y añadir a cada uno de ellos:
  - 1 µl de enzima Phire® Hot Start II ADN Polimerasa
  - 3 µl de la muestra de **ADN\***
2. Mezclar bien y centrifugar 5 segundos en microcentrífuga para eliminar burbujas

\*Si se dispone de ADN de concentración conocida, se recomienda poner entre 200-500ng de ADN.

**Nota:** Es importante mantener los tubos en hielo hasta el momento de colocar en el termociclador, para evitar uniones inespecíficas de los "primers".

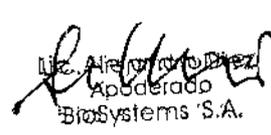
### 2.2. AMPLIFICACIÓN

1. Colocar todos los tubos en el termociclador y amplificar según el siguiente programa:

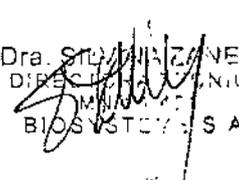
#### MASTER DIAGNÓSTICA

Avda. Conocimiento, 100, P.T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España)  
master@vitroweb.com [www.masterdiagnostica.com](http://www.masterdiagnostica.com)

5/12



Lic. Alicia Gómez  
Apoderada  
BioSystems S.A.



Dra. Susana ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
BIO SYSTEMS S.A.

98°C 2 min.

35 ciclos:

98°C 10 s

60°C 10 s

72°C 15 s

72°C 1 min

2. Mantener los tubos a 12-15° C cuando finalice la reacción. Si no se van a procesar las muestras en el momento, se pueden almacenar a 4° C o a -20° C hasta su uso.

### 2.3. CONTROLES DE AMPLIFICACIÓN RECOMENDADOS

En el kit se suministran unos **ADNs controles positivo clonal y policlonal**. Se recomienda amplificar estos ADNs con cada tanda de muestras analizadas.

Para controlar la posible presencia de contaminaciones de unas muestras con otras o de alguno de los reactivos comunes usados durante la manipulación de las muestras, se recomienda procesar una **muestra "blanco" sin ADN**. Esta muestra llevaría los mismos reactivos empleados en la extracción del ADN de las muestras y seguiría un procesamiento similar al resto de las muestras pero, al no contener ADN, el resultado tras la amplificación debería ser ausencia de señal para todas las mezclas.

Así mismo, aunque no es imprescindible, es aconsejable analizar cada muestra por duplicado; es decir partiendo del mismo ADN genómico **realizar por duplicado las amplificaciones** para todos los fragmentos. De esta forma se facilita la interpretación de resultados dudosos y se verifica con el duplicado el tamaño de picos monoclonales en el seno de una población policlonal reactiva.

## 3. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

### 3.1. ELECTROFORESIS EN GELES

**¡Precauciones!**: Dada la elevada sensibilidad de la técnica de amplificación que genera cantidades elevadas de un fragmento específico de ADN, dicho producto amplificado representa una potente fuente de contaminación en el laboratorio. Es recomendable llevar a cabo la manipulación y electroforesis de los productos amplificados en una zona de trabajo alejada del lugar donde se realiza el procesamiento de las muestras, para evitar la contaminación de éstas con el ADN amplificado, que podría conducir a resultados falsos positivos.

El revelado de los productos amplificados se puede llevar a cabo tanto en geles de agarosa (4%) como en geles de poliacrilamida (6-8%) con tampón TBE 0.5X. La resolución en geles de poliacrilamida es superior a la de los geles de agarosa.

Master Diagnóstica dispone de Kits para electroforesis de ADN tanto en geles de agarosa como de poliacrilamida listos para uso que incluyen además todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la electroforesis: marcador peso molecular, tampón de carga, tampón TBE concentrado, EtBr. (Nº de Cat.: **MAD-003980M y MAD-003990M para agarosa y poliacrilamida respectivamente**).

### MASTER DIAGNÓSTICA

Avda. Conocimiento, 100, P.T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España)

master@vitroweb.com [www.masterdiagnostica.com](http://www.masterdiagnostica.com)

6/12

Vic. Alejandro Díez  
Apoderado  
BioSystems S.A.

Dra. Silvia ZANELA  
BIOINFORMÁTICA TECN. CA  
14 431  
BIOSYSTEMS S A

Con objeto de diferenciar productos derivados de poblaciones mono ó policlonales, se recomienda llevar a cabo un análisis de "heteroduplex" de los productos de PCR, mediante desnaturalización/renaturalización de los productos amplificados.

Si ha ocurrido reordenamiento clonal de los genes IgH se obtendrá un "homoduplex", mientras que en el caso de población policlonal, tras el proceso de desnaturalización/renaturalización se formarán "heteroduplex" con uniones heterogéneas.

### 3.1.1. PROCEDIMIENTO

1. Desnaturalizar los productos de PCR a **94° C, 5 min.**
2. Re-naturalizar transfiriendo rápidamente a hielo (4 °C) y mantener 10-60 min.
3. Ensamblar el gel de agarosa o poliacrilamida en su cubeta correspondiente y cubrir con tampón de electroforesis TBE 0,5X.
4. Tomar **20 µl de producto de PCR** y mezclar con **4 µl de tampón de carga 6X.**
5. Cargar las muestras en los pocillos del gel y colocar en uno de los carriles **10 µl del marcador de peso molecular.**
6. Dejar transcurrir la electroforesis **1-2 h. a 100 Voltios.** El voltaje y tiempo de corrido se pueden adaptar dependiendo del tipo de gel, cubeta de electroforesis, tamaño del producto amplificado, etc.
7. Teñir con **0.5µg/ml EtBr** en agua o TBE 0,5X y visualizar en transiluminador con luz ultravioleta.

### 3.2. ELECTROFORESIS CAPILAR

Las mezclas de PCR FR1-JH, FR2-JH, FR3-JH y Control interno, contienen primers marcados con el fluorocromo 6-FAM, lo que permite que estos productos de PCR además de poder visualizarse por electroforesis convencional, se puedan analizar mediante electroforesis capilar en GENESCAN.

Los secuenciadores automáticos basados en la electroforesis capilar, como los equipos ABI PRISM® 310 y 3100 Genetic Analyzers de Applied Biosystems, constituyen sistemas con una alta tasa de reproducibilidad y sensibilidad en la secuenciación y análisis de fragmentos genómicos. La eficiencia supera a la mayoría de los análisis de secuencias basados en el uso de geles de acrilamida. Además, estos sistemas permiten el análisis de los resultados de un modo rápido y preciso mediante software especificados.

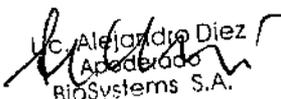
#### 3.2.1. PREPARACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

1. Mezclar en un tubo eppendorf de 0.2 ml:  
15 µl de formamida desionizada + 0.5 µl del marcador 400HD ROX + 1 ó 2 µl de ADN amplificado (este volumen de producto amplificado se puede modificar si la señal fluorescente está fuera del rango óptimo).
2. Homogeneizar en vortex y dar un pulso.
3. Desnaturalizar a **95°C x 5 min**, enfriar a 4° C y cargar en secuenciador

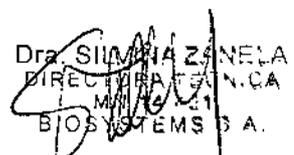
#### MASTER DIAGNÓSTICA

Avda. Conocimiento, 100, P.T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España)  
master@vitroweb.com [www.masterdiagnostica.com](http://www.masterdiagnostica.com)

7/12



Alejandro Diez  
Apoderado  
BioSystems S.A.



Dra. SILVANA ZANELLA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MESA DE PROD. MED.  
BIOSYSTEMS S.A.

#### Condiciones de electroforesis:

Gel: polímero 3100 POP4

Buffer: 3100 buffer con EDTA 1x

Electroforesis: 25-30 minutos aprox.

Intensidad óptima de fluorescencia: hasta un máximo de 10.000 unidades

#### 3.2.2. CONDICIONES ÓPTIMAS PARA CARGAR LAS MUESTRAS

Para comprobar que la muestra de ADN ha sido procesada correctamente y que hay ADN en cantidad y calidad suficientes para generar un resultado válido en el electroforograma, se recomienda cargar una alícuota de los productos de PCR (incluido el CI) en una electroforesis convencional teñida con EtBr, antes de analizar por GeneScan.

Si se carga una cantidad excesiva de producto de PCR en la electroforesis capilar, se pueden artefactuar los picos tanto en el estándar de peso molecular como en el producto, resultando falsas lecturas. Así, un exceso de una muestra clonal puede resultar en un patrón de picos que simularía lo que podría ser una muestra policlonal.

Para evitar este problema hay que asegurarse que la intensidad de la señal fluorescente se mantiene entre 400-7000 unidades de fluorescencia en los modelos 310 y 3100.

#### 4. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

##### 4.1. CONTROL INTERNO DE AMPLIFICACIÓN (CI)

En todas las muestras debe aparecer una banda intensa (un pico, si se carga en GeneScan) de **274 pares de bases**, lo que indica que el proceso de manipulación de la muestra y la calidad del ADN han sido adecuados. Este control de amplificación es imprescindible, sobre todo en aquellas muestras obtenidas de material incluido en parafina, en donde la calidad y cantidad del ADN obtenido son desconocidas.

Si no aparece banda de amplificación con el CI, no se puede valorar un resultado negativo de amplificación de los fragmentos IgH. Puede deberse a que no se haya obtenido ADN suficiente en el proceso de extracción, o a que el ADN esté parcialmente degradado. En estos casos se puede mejorar el rendimiento y la calidad del ADN prolongando la incubación del tejido con el tampón de lisis+proteasa durante 24-48 horas más.

Si tras repetir el proceso no se consigue amplificación, la muestra tendría que informarse como: "no valorable para análisis de fragmentos del gen IgH por PCR".

##### 4.2. REORDENAMIENTOS DE FRAGMENTOS IgH

En la siguiente tabla se indica el rango de tamaños esperado de los fragmentos amplificados para cada una de las mezclas de amplificación:

#### MASTER DIAGNÓSTICA

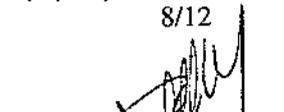
Avda. Conocimiento, 100, P.T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España)

master@vitroweb.com [www.masterdiagnostica.com](http://www.masterdiagnostica.com)

8/12



U. Alejandro Diez  
Apoderado  
BioSystems S.A.



Dra. Silvia Planes  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 4.421  
BIOSYSTEMS S.A.

**Tabla 2.**

<i>Mezcla de cebadores</i>	<i>Rango de Tamaño</i>	<i>ADN control positivo clonal</i>	<i>Color (tubo PCR)</i>
FR1-JH	310-360 pb	338 pb	Rojo
FR2-JH	250-295 pb	274 pb	Verde
FR3-JH	100-170 pb	133 pb	Púrpura

**4.2.1 CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS DE AMPLIFICACIÓN:**

El control negativo de amplificación realizado con una muestra "blanco" tendría que dar ausencia de amplificación en todas las mezclas ensayadas (incluido Ct). Si se detecta producto amplificado en alguna mezcla de PCR, estaría indicando la presencia de contaminación de los reactivos y habría que repetir el ensayo para validarlo.

El control positivo policlonal debería dar múltiples bandas (gel) o picos (GeneScan) dentro del rango de tamaño indicado en la tabla 2 para cada mezcla de amplificación.

El control positivo clonal dará una banda o pico único para cada una de las mezclas de PCR ensayadas, cuyo tamaño se indica en la tabla 2.

Cualquier resultado diferente al esperado, obtenido tras analizar los ADN controles positivos, estaría indicando que el ensayo no es válido y las muestras problema no podrían ser interpretadas.

**4.2.2 ANÁLISIS DE LA MUESTRA PROBLEMA:**

Antes de interpretar los resultados obtenidos con la muestra problema es necesario que todos los controles incluidos en el test, tanto positivos como negativos hayan sido correctos.

**GELES DE AGAROSA- POLIACRILAMIDA**

El reordenamiento clonal del gen IgH, se visualiza mediante electroforesis por la presencia de una única banda intensa y nítida dentro del rango de tamaño esperado (Figura 1). **Se considera que una muestra es "positiva" cuando se detecta una banda con todas o alguna de las tres mezclas de amplificación ensayadas: FR1-JH, FR2-JH o FR3-JH.**

Si no hay reordenamiento clonal y la muestra problema está compuesta por una población heterogénea policlonal de células B, se formará un heteroduplex y el resultado tras la electroforesis será una multitud de bandas dentro del rango de tamaño, que se visualizan en el gel como una mancha o "smear" ancha y difusa (Figura 1).

**ELECTROFORESIS CAPILAR**

Los productos de amplificación marcados con fluorocromo son separados mediante electroforesis capilar en función de su tamaño y se detectan automáticamente con un láser.

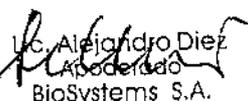
El resultado puede ser una **distribución gaussiana de múltiples picos**, representando múltiples productos amplificados con diferente tamaño (dentro del rango de tamaño esperado), en el caso de un proceso **linfoproliferativo policlonal** (Figura 2) y se informará como "la muestra analizada no presenta reordenamiento clonal para el gen IgH con las condiciones de este ensayo".

**MASTER DIAGNÓSTICA**

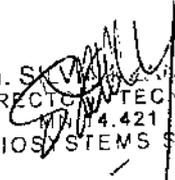
Avda. Conocimiento, 100, P.T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España)

 master@vitroweb.com [www.masterdiagnostica.com](http://www.masterdiagnostica.com)

9/12



Lic. Alejandro Diez  
Asesorado  
BioSystems S.A.

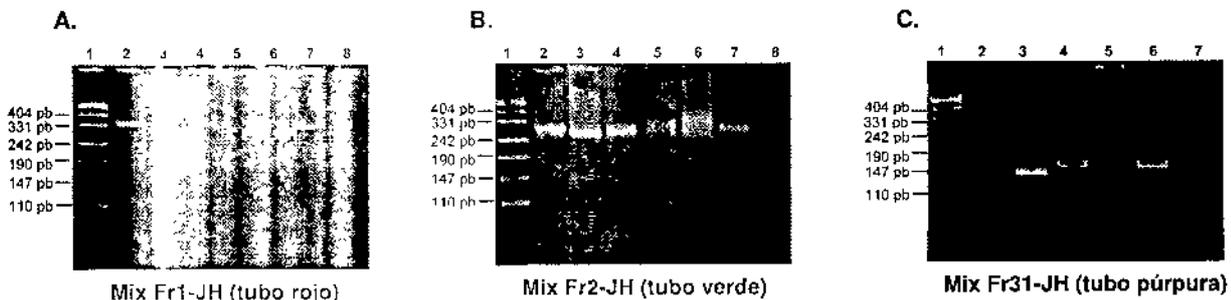


Dra. Silvia  
DIRECTORA TÉCNICA  
M.P. 4.421  
BIOSYSTEMS S.A.

Cuando aparecen uno o dos picos únicos o prominentes, dentro del rango de tamaño, con todas o alguna de las mezclas de cebadores ensayadas FR1, FR2 o FR3, se correspondería con un proceso linfoproliferativo clonal (Figura 2). Estos resultados se informarían como: "la muestra analizada presenta reordenamiento clonal para el gen IgH con las condiciones de este ensayo".

A veces aparecen en un mismo electroferograma múltiples picos de diferente tamaño, alguno de los cuales resalta en altura frente a los demás. El criterio para considerar uno o dos picos positivos es que tengan una altura como mínimo 2,5 veces superior a la altura del resto de los picos adyacentes que representan el fondo policlonal. Igualmente ayuda a discriminar un pico positivo, el que el tamaño de dicho pico coincida en el duplicado, si se ha realizado un duplicado de amplificación. Si no supera ese valor, todos los picos se considerarían como correspondientes a una población policlonal. Si el pico o picos que resaltan está al límite de altura mínima necesaria para ser considerados clonales y no coinciden en tamaño en el duplicado de la muestra, habría que pensar que son picos pseudo-clonales, obtenidos de una amplificación a partir de una muestra de ADN que contiene escaso número de células B en el seno de un proceso linfoproliferativo benigno.

**Figura 1.** Análisis de resultados en gel de agarosa 4%. **A. Mix FR1-JH:** 1. Estándar MW, 2. muestra monoclonal B, 3. muestra monoclonal B, 4. muestra monoclonal B, 5. muestra policlonal B, 6. muestra monoclonal B, 7. Línea celular B, 8. Amígdala. **B. Mix FR2-JH:** 1. Estándar MW, 2. Línea celular B, 3. muestra monoclonal B, 4. muestra monoclonal B, 5. muestra policlonal B, 6. muestra policlonal B, 7. muestra policlonal B, 8. Amígdala. **C. Mix FR3-JH:** 1. Estándar MW, 2. amígdala, 3. Línea celular B, 4. caso monoclonal B, 5. caso policlonal B, 6. caso monoclonal B, 7. caso policlonal B.



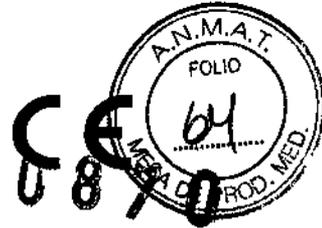
**MASTER DIAGNÓSTICA**

Avda. Conocimiento, 100, P.T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España)  
master@vitroweb.com [www.masterdiagnostica.com](http://www.masterdiagnostica.com)

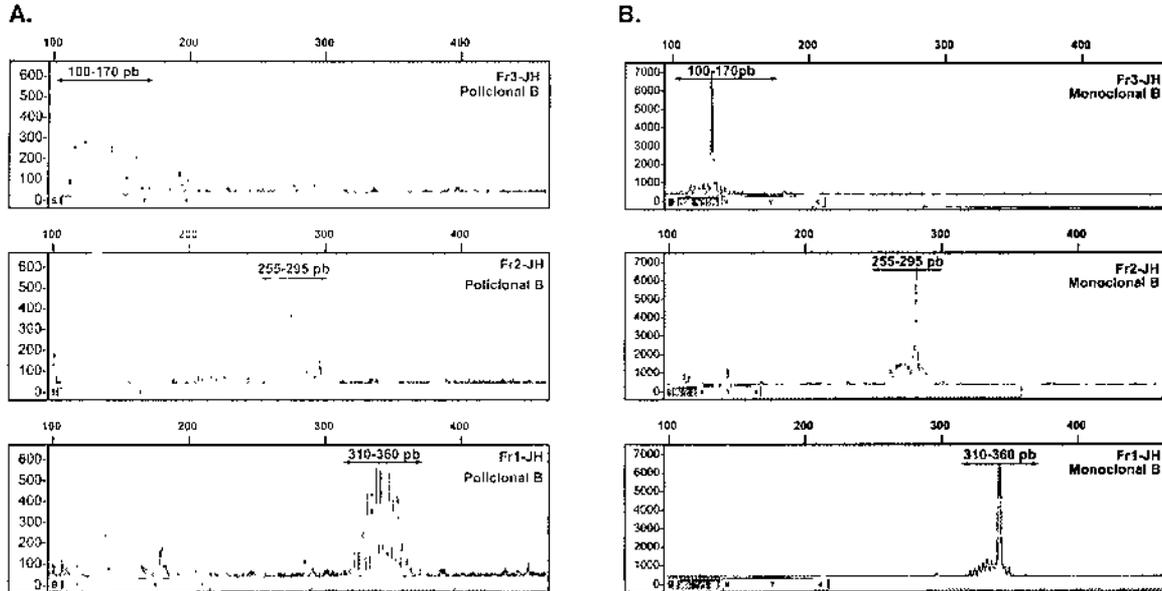
10/12

*[Signature]*  
D. Alejandro Diez  
Apoderado  
BioSystems S.A.

*[Signature]*  
Dña. S. PINAZANFLA  
DIRECCIÓN TÉCNICA  
10/12/2012  
BIOSYSTEMS S.A.



**Figura 2.** Análisis de resultados por electroforesis capilar en GeneScan. **A.** Típica distribución gaussiana de una población policlonal obtenida con los productos de PCR FR3-JH, FR2-JH y FR1-JH. **B.** Picos monoclonales obtenidos con los productos de PCR FR3-JH, FR2-JH y FR1-JH.



## 5. LIMITACIONES DEL ENSAYO

En una muestra que contenga una mezcla de células B tumorales (clonales) y una población de células B reactivas acompañante, puede ocurrir que la banda nítida indicativa de clonalidad quede enmascarada por el resto de las múltiples bandas y no sea posible su visualización mediante electroforesis en gel o GeneScan.

Este método es capaz de detectar un mínimo de 1.5 a 2 células tumorales entre 100 células normales (Tabla 3). Los resultados se han obtenido tras ensayar las tres mezclas de amplificación con diluciones seriadas de una muestra de ADN procedente de la línea celular de linfoma B (RAMOS) con un ADN de linfocitos de sangre periférica.

**Tabla 3. Resultados de límite de detección**

Mezcla	Límite de detección
FR1-JH	4 ng ADN clonal (2 % en 0.2µg totales)
FR2-JH	4 ng ADN clonal (2 % en 0.2µg totales)
FR3-JH	3 ng ADN clonal (1,5% en 0.2µg totales)

La amplificación monoclonal combinando las tres mezclas de cebadores (FR1-2-3/J) incluidas en este kit, es específica de la línea B, y permitiría detectar hasta un 90 % de los procesos linfoproliferativos de células maduras B. Sin embargo un resultado negativo de clonalidad con este ensayo, no excluye el diagnóstico de linfoma por otro tipo de datos clínicos, morfológicos e inmunofenotípicos.

### MASTER DIAGNÓSTICA

Avda. Conocimiento, 100, P.T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España)  
 master@vitroweb.com [www.masterdiagnostica.com](http://www.masterdiagnostica.com)

11/12

Dra. SILVIA ZANFLA  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 N.º 4421  
 BIOSYSTEMS S.A.

Dr. Alejandro Díez  
 Apoderado  
 BioSystems S.A.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Langerak AW, et al. Polymerase chain reaction-based clonality testing in tissue samples with reactive lymphoproliferations: usefulness and pitfalls. A report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2007 Feb;21(2):222-9.

Van Krieken JH, et al. Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia*. 2007 Feb, 21(2):201-6.

Evans PA, et al. Significantly improved PCR-based clonality testing in tissue samples with reactive lymphoproliferations: usefulness and pitfalls. A report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2007 Feb;21(2):222-9.

Nelson D, et al. A limited number of IgH-primers binding to framework region 1 is sufficient to detect the majority of mature small B-cell non-Hodgkin lymphomas on formalin-fixed paraffin-embedded tissue by PCR. *Leuk Lymphoma*. 2007; 48(9):1806-15.

Miettinen M and Lasota J. Polymerase chain reaction based gene rearrangement studies in the diagnosis of follicular lymphoma-performance in formaldehyde-fixed tissue and application in clinical problem cases. *Pathol. Res. Pract.* 1997; 193:9-19.

Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, Wolvers-Tettero ILM and Dongen JJM. Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T-cell proliferations. *Leukemia* 1997; 11: 2192-2199.

Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S and Morley AA. Gene rearrangement in B and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood* 1991; 78:192-196.

Rev.: AO – Oct 2012

### MASTER DIAGNÓSTICA

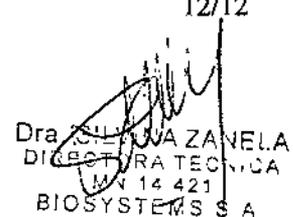
Avda. Conocimiento, 100, P.T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España)

master@vitroweb.com [www.masterdiagnostica.com](http://www.masterdiagnostica.com)

12/12



Jc. Alejandro Díez  
Apoderado  
BioSystems S.A.



Dra. SILVANA ZAVELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
M 14 421  
BIOSYSTEMS S A



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:1-47-8247/14-5

Se autoriza a la firma BIOSYSTEMS S.A. a comercializar el Producto para Diagnóstico de uso "in vitro" denominado IgH Rearrangements Molecular Analysis Kit / permite detectar la presencia de clonalidad en procesos linfoproliferativos de células B, mediante la amplificación de los segmentos reordenados VDJ de la región hipervariable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH), en envases conteniendo mix FR1-JH of IgH gene (Tubos color rojo: 20 x 46 µl), mix FR2-JH of IgH gene (Tubos color verde: 20 x 46 µl), mix FR3-JH of IgH gene (Tubos color violeta: 20 x 46 µl), Internal Control mix (Tubos color amarillo: 20 x 46 µl), Phire® Hot Start II DNA Polymerase (2 X 60µl), Clonal B Positive Control DNA (50 µl), Polyclonal Positive Control DNA(50 µl), para 20 test. Se le asigna la categoría: Venta a laboratorios de Análisis clínicos por hallarse comprendido en las condiciones establecidas en la Ley 16.463, y Resolución M.S. y A.S. Nº 145/98. Lugar de elaboración: Master Diagnóstica S.L., Avda. Del Conocimiento Nº100, Pt Ciencias de la salud, 18007 Granada (ESPAÑA). Periodo de vida útil: 15 (QUINCE) meses desde la fecha de elaboración conservado a -20°C. En las etiquetas de los envases, anuncios y Manual de instrucciones deberá constar PRODUCTO PARA DIAGNOSTICO DE USO

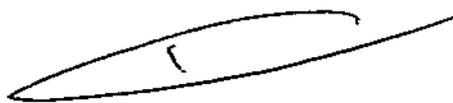
"IN VITRO" USO PROFESIONAL EXCLUSIVO AUTORIZADO POR LA

ADMINISTRACION NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA  
MEDICA.

Certificado nº: **008132**

ADMINISTRACION NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA  
MÉDICA.

Buenos Aires, **23 ENE 2015**



**Ing. ROGELIO LOPEZ**  
Administrador Nacional  
A.N.M.A.T.

Firma y sello