

GARANTÍA

BIOTOOLS garantiza la conformidad de los productos con la cantidad y contenido indicado en el vial y etiquetas exteriores durante su período de vida media. La obligación de BIOTOOLS y los derechos del comprador bajo esta garantía están limitados bien al reemplazo por parte de BIOTOOLS de cualquier producto que sea deficiente en fabricación, y que deberá ser retornado a BIOTOOLS (portes pagados) o a opción de BIOTOOLS, devolución del precio de adquisición. Las reclamaciones por mercancía dañada durante el transporte han de ser dirigidas al transportista.

Este producto debe ser utilizado únicamente por profesionales cualificados y para uso exclusivo en investigación. Es la responsabilidad del usuario asegurarse que un producto determinado es adecuado para una aplicación determinada. Cualquier producto que no cumpla con las especificaciones indicadas en la hoja informativa de producto será reemplazado. Esta garantía limita nuestra responsabilidad al reemplazo del producto. Ninguna otra garantía, de ningún tipo, expresa o implícita, incluyendo, sin limitación, garantías implícitas de capacidad de comercialización o adecuación para un propósito determinado, son dadas por BIOTOOLS. BIOTOOLS no tendrá responsabilidad sobre ningún daño directo, indirecto, consecuencia o incidental resultante del uso, mal uso, los resultados del uso o la incapacidad de uso de ningún producto.

Fabricado por:

BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. han sido evaluados y certificados en cuanto a cumplimiento de los requisitos de la ISO 9001:2000 para las siguientes actividades: investigación y desarrollo de productos de biotecnología, fabricación de productos de biotecnología y fabricación de productos para diagnóstico in vitro (IVDs). Valle de Tobalina - 52 - Nave 39, 28021 Madrid - Spain

© 2009 BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. Todos los derechos reservados

BIOTOOLS
BIOTOOLS B & M LABS. S.A.

BIOTOOLS B&M Labs, S.A.
Valle de Tobalina - 52 - Nave 39
28021 Madrid
Spain

Tel. (34) 91 710 00 74

Fax (34) 93 843 78 84

E-mail: info@biotools.eu

www.biotools.eu



BIOTOOLS

BIOTOOLS B & M LABS. S.A.

BIOMALAR GEL FORM KIT

| REF. | FORMATO | CONTENIDO |
|--------|---------|-----------------------|
| 90.001 | 48 rxns | BIOMALAR GEL FORM KIT |

Almacenar a 4°C

Aviso a usuarios: Algunas de las aplicaciones que pueden llevarse a cabo con este producto están cubiertas por patentes aplicables en ciertos países. La adquisición de este producto no incluye o provee de una licencia para realizar aplicaciones patentadas. En algunos casos, los usuarios tienen la obligación de adquirir una licencia, dependiendo del país y/o la aplicación.

Ed. 01 - Febrero 2014

1. DESCRIPCIÓN

El **Biomalar Gel Form kit** permite la detección cualitativa de especies de *Plasmodium* en muestras clínicas. La detección se lleva a cabo en dos pasos: el primer paso detecta la presencia de ADN de *Plasmodium sp.*; y el segundo identifica la especie del protozoo *Plasmodium* presente en la muestra. Este kit permite la identificación de las cuatro especies principales del parásito causantes del paludismo en humanos (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. vivax*).

El ADN del parásito presente en la muestra es amplificado de forma específica utilizando primers que hibridan con secuencias homólogas del genoma de *Plasmodium*. El **Biomalar Gel Form kit** es un método rápido y simple en el que las dos reacciones de amplificación se proporcionan en formato gelificado "ready to use". El formato gel reduce el tiempo de manipulación y los riesgos de contaminación sin comprometer la eficiencia o la sensibilidad del ensayo.

2. REACTIVOS INCLUIDOS EN EL KIT

El **Biomalar Gel Form kit** contiene reactivos suficientes para 48 determinaciones. Contenido del kit:

- **Gelified Plasmodium Mixture:** Mezcla de reacción gelificada que permite la amplificación del género *Plasmodium sp.* Esta reacción incluye un par de cebadores humanos, control de amplificación interno, que permite descartar la presencia de inhibidores de PCR en la reacción de amplificación. El kit contiene 6 tiras de 8 tubos transparentes gelificadas (48 rxns).
- **Gelified Species Mixture:** Mezcla de reacción gelificada que permite la amplificación específica de las especies *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. vivax*. El kit contiene 6 tiras de 8 tubos coloreadas gelificadas (48 rxns).
- **P. falciparum Positive Control:** Producto de amplificación gelificado. El kit contiene 1 vial gelificado (*tapa amarilla*).
- **P. malariae Positive Control:** Producto de amplificación gelificado. El kit contiene 1 vial gelificado (*tapa roja*).
- **P. ovale Positive Control:** Producto de amplificación gelificado. El kit contiene 1 vial gelificado (*tapa azul*).
- **P. vivax Positive Control:** Producto de amplificación gelificado. El kit contiene 1 vial gelificado (*tapa verde*).

Ambas mezclas (*Plasmodium* y *Species*) incluyen en su formulación BIOTOOLS DNA Polymerase, Buffer de Reacción, MgCl₂, dNTPs, cebadores y estabilizantes en formato gelificado. Para llevar a cabo las reacciones de amplificación sólo es necesario añadir el ADN molde (o el DNA de los controles positivos) y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen final de las reacciones.

3. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Al recepcionar, conservar todos los componentes del **Biomalar Gel Form Kit** a 4°C. El envío y manipulación del kit puede realizarse a temperatura ambiente.

Los **controles positivos gelificados** deberán ser reconstituidos antes de su manipulación. Una vez rehidratados, estos controles deberán ser almacenados a -20°C en alícuotas a fin de evitar someterlos a ciclos de congelación/descongelación. Para su manipulación posterior las alícuotas deberán descongelarse y mantenerse en hielo.

Si el kit se manipula y conserva siguiendo estas recomendaciones, su estabilidad será la indicada en la etiqueta correspondiente.

4. MATERIAL DE ORIGEN

El **Biomalar Gel Form kit** puede usarse con las siguientes muestras de origen:

- *Sangre completa*
- *Sangre completa con anticoagulantes* (heparina, EDTA, citrato de sodio, etc)
- *Sangre depositada en papel de filtro o tarjetas*

Para la purificación del ADN del parásito se recomienda el uso de kits comerciales de extracción por columnas (ej. Speedtools DNA Extraction kit) o bolas magnéticas.

5. PREPARACIÓN DE LOS CONTROLES POSITIVOS

Trabajar siempre en un área específica para la manipulación de controles positivos de DNA. Esta área deberá estar separada de otras zonas de trabajo como el área de extracción y purificación o la zona de preparación de reactivos.

Nota: Para la preparación de los controles positivos utilizar agua bidestilada estéril libre de nucleasas.

1.- Diluir un vial de cada uno de los controles positivos en 500 µl de Tris 10 mM pH 8.0 (o agua libre de nucleasas) y mezclar mediante vortex durante un período de tiempo corto (15").

2.- Realizar alícuotas de cada uno de los controles resuspendidos y conservarlas a -20 °C hasta su utilización. Una vez descongeladas no se recomienda volver a congelar las alícuotas de los controles.

6. INSTRUCCIONES DE USO

I. *Plasmodium Amplification*

1.- Calcular el número de reacciones necesarias, no olvidar incluir al menos un control negativo (sin ADN molde). Seleccionar el número adecuado de tiras de tubos gelificados de **Gelified Plasmodium Mixture**.

2.- Añadir a cada vial de reacción positiva 37,7µl de agua libre de nucleasas estéril. Los controles negativos (sin ADN) llevarán 42,7µl de agua libre de nucleasas estéril

3.- Añadir a cada vial de muestras positivas 5 µl de ADN molde (50-100 ng).

Nota 1: No es necesario resuspender el contenido del gel; los reactivos gelificados se resuspenderán durante el paso de desnaturalización inicial.

4.- Programar el termociclador según la guía de la Tabla 1. Colocar los viales en el termociclador y ejecutar el programa de amplificación seleccionado.

TABLA 1. Programa de PCR1

| PASOS | Nº CICLOS | TEMPERATURA | TIEMPO |
|---------------------------|-----------|-------------|--------|
| Desnaturalización Inicial | 1 | 94°C | 7 min |
| Desnaturalización | 45 | 94°C | 20 seg |
| Anillamiento | | 62°C | 20 seg |
| Extensión | | 72°C | 30 seg |
| Extensión Final | 1 | 72°C | 10 min |
| Enfriamiento | ∞ | 4°C | ∞ |

5.- Almacenar los productos de la primera reacción de amplificación a 4°C.

Nota 2: Los controles positivos para las diferentes especies de *Plasmodium* son incorporados en el segundo paso de PCR; durante la *Species Amplification*.

II. *Species Amplification*

1.- Apartar el número adecuado de tubos gelificados de **Gelified Species Mixture** (un vial por cada reacción de *Plasmodium Amplification* + un vial para cada uno de los controles positivos incluidos en el kit).

2.- Descongelar y mantener en hielo una alícuota de cada uno de los controles positivos reconstituidos (ver Punto 5).

3.- Añadir a cada vial de reacción 19,2µl de agua libre de nucleasas estéril + **2 µl del producto amplificado** en la *Plasmodium Amplification*.

4.- En los viales de los controles positivos añadir 16,2µl de agua libre de nucleasas estéril + **5 µl del correspondiente control positivo reconstituido**.

Nota 3: No es necesario resuspender el contenido del gel; los reactivos gelificados se resuspenderán durante el paso de desnaturalización inicial.

5.- Programar el termociclador según la guía de la Tabla 2. Colocar los viales en el termociclador y ejecutar el programa de amplificación seleccionado.

TABLA 2. Programa de PCR2

| PASOS | Nº CICLOS | TEMPERATURA | TIEMPO |
|---------------------------|-----------|-------------|---------------|
| Desnaturalización Inicial | 1 | 94°C | 5 min |
| Desnaturalización | 35 | 94°C | 15 seg |
| Anillamiento | | 53°C | 90 seg |
| Extensión | | 72°C | 20 seg |
| Extensión Final | 1 | 72°C | 10 min |
| Enfriamiento | ∞ | 4°C | ∞ |

6.- Almacenar los productos de la segunda reacción de amplificación a 4°C.

III. ELECTROFORESIS

El análisis de productos de amplificación se lleva a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa y visualización con marcadores fluorescentes (ej. bromuro de etidio; SYBR® Green).

- 1.- Preparar geles de agarosa al 2%
- 2.- Cargar 10 µl de los productos de ambas reacciones de amplificación en el gel de agarosa
- 3.- Incluir carriles con marcador/es de peso molecular idóneos (ej. 100bp Marker). Migrar la electroforesis
- 4.- Verificar los productos de amplificación obtenidos (ver punto 7).

7. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

I. *Plasmodium Amplification*

En esta primera reacción de amplificación podrá observarse 1 ó 2 bandas de amplificación (231 y 783 bp). La banda de **231 bp**, que corresponde al **control interno humano**, aparecerá siempre (excepto en los blancos) que no existan inhibidores de amplificación en la reacción.

En pacientes con elevada parasitemia podrá observarse la banda de superior de **783 bp**, correspondiente al fragmento de ADN de *Plasmodium sp.*

II. *Species Amplification*

En caso de infección por *Plasmodium sp.*, en la segunda reacción de amplificación se observará la banda específica de la especie del parásito productora de la patología.

De igual manera, en los productos de amplificación de los controles positivos se visualizará la banda correspondiente al control incluido.

El patrón de banda de cada una de las diferentes especies de *Plasmodium* detectadas por el kit es el siguiente:

- *P. malariae*: amplicón de **241 bp**
- *P. falciparum*: amplicón de **370 bp**
- *P. ovale*: amplicón de **407 bp**
- *P. vivax*: amplicón de **476 bp**

8. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Baja o nula eficiencia de reacción

1. **Corroborar la calidad y cantidad del molde.** Verificar la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante, y la cantidad del molde por fluorimetría (un exceso de ADN puede reducir el rendimiento de las reacciones de amplificación). El excedente de algunos reactivos de purificación pueden interferir en la PCR: reducir el volumen de molde o cambiar el método de purificación. Asegurarse que el material utilizado sea libre de nucleasas.
2. **Verificar la caducidad y condiciones de almacenamiento del kit.** Verificar que el kit se encuentra dentro de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa. Verificar la ausencia de hidratación en los tubos gelificados.
3. **Garantizar la resuspensión adecuada de los geles.** En el supuesto de sospechar una incompleta resuspensión de los geles durante la desnaturalización inicial de las PCRs, podrá facilitarse el proceso mezclando con vortex la mezcla de reacción antes de su introducción en el termociclador (centrifugar después de mezclar).
4. **Revisar la programación de la PCR.** Verificar que los programas de amplificación seleccionados para ambas reacciones han sido los adecuados.
5. **Ausencia de algún componente de reacción.** Verificar que el molde de ADN ha sido incluido en la *Plasmodium Amplification*.
6. **Ausencia de la banda de 231 bp en la *Plasmodium Amplification*.** Presencia de inhibidores de PCR en la muestra, purificar nuevamente el ADN molde o diluirlo y repetir el ensayo.

Productos de amplificación múltiples y/o inespecíficos

1. **Corroborar la calidad y cantidad del molde.** Verificar la integridad y la concentración del ADN. Reducir la cantidad de molde a incluir en la *Plasmodium Amplification*.
2. **Revisar la programación de la PCR** Verificar que los programas de amplificación seleccionados para ambas reacciones han sido los adecuados.
3. **Descartar una contaminación con ADN en el agua de reacción.** En caso de aparecer contaminación en los viales del control negativo (sin ADN), cambiar el lote de agua utilizada.