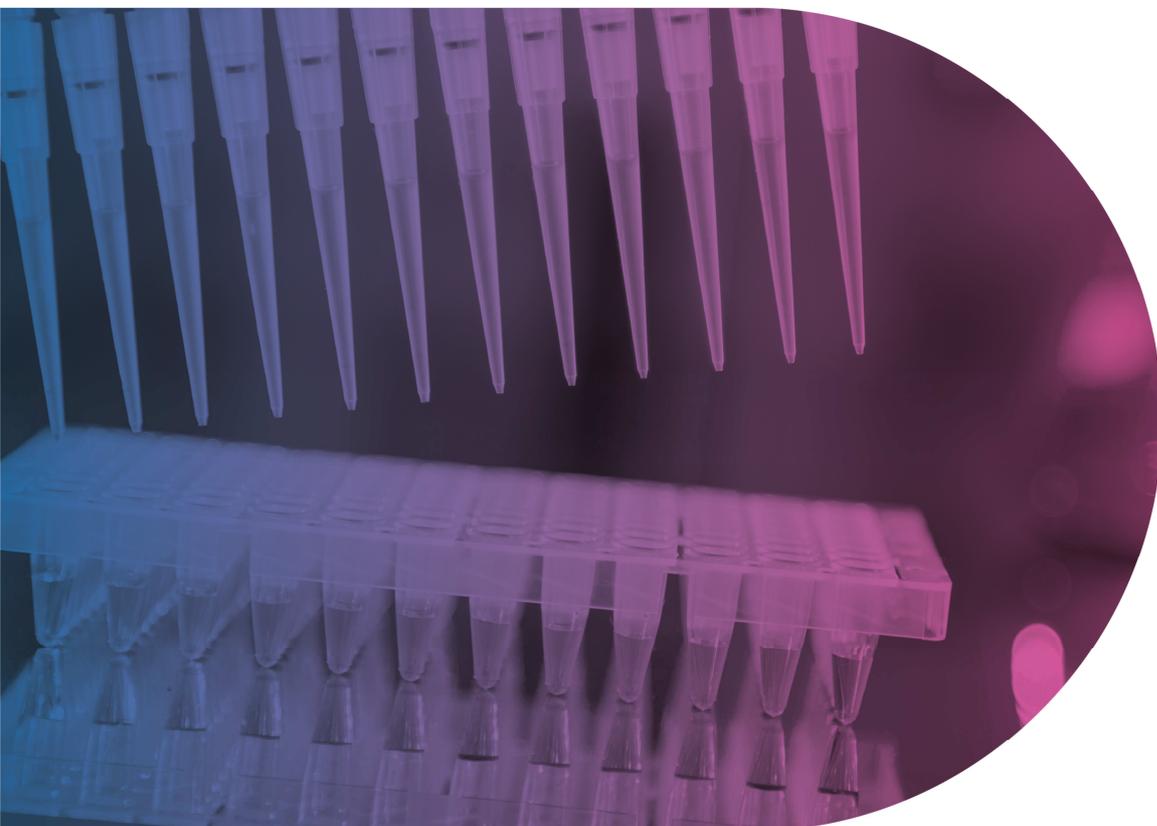




imegen



# Instrucciones de uso

## Imegen<sup>®</sup> Gilbert Plus

**REF**

**IMG-288**

Fabricado por:

Instituto de Medicina Genómica SL

Agustín Escardino 9,

Parc Científic de la Universitat de València

46980 Paterna (Valencia, España)

+34 963 212 340 - info@imegen.es

[imegen.es](http://imegen.es)

Rev. 3. 14/02/2020



AEMPS (N° 2019 09 0061 EN)





# imegen

Imegen le garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de fabricación. Esta garantía se hace extensible hasta la fecha de caducidad, siempre que se observen las condiciones de conservación especificadas en este manual.

**Nuestros productos están diseñados para diagnóstico *in vitro*.** Imegen no le ofrece ninguna otra garantía, expresa o implícita, que se extienda más allá del funcionamiento correcto de los componentes de este kit. La única obligación de imegen, respecto de las garantías precedentes, será la de reemplazar los productos, o bien devolver el precio de la compra de los mismos, a voluntad del cliente, siempre y cuando se pruebe la existencia de un defecto en los materiales, o bien en la elaboración de sus productos.

Imegen no será responsable de ningún daño, directo o indirecto, que resulte en pérdidas económicas o en daños que pudieran producirse por el uso de este producto por parte del comprador o usuario.

Todos los productos comercializados por Imegen son sometidos a un riguroso control de calidad. **imegen-Gilbert Plus** ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada ensayo.

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con nuestro Departamento Técnico:

**Teléfono:** 963 212 340

**e-Mail:** [tech.support@imegen.es](mailto:tech.support@imegen.es)

\***imegen** es una marca registrada del Instituto de Medicina Genómica en España

Modificaciones de las Instrucciones de Uso [IFU]	
Versión 02	Adaptación a los requisitos del Reglamento [UE] 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2017, sobre los productos sanitarios para diagnóstico <i>in vitro</i> .
Versión 03	Cambio del programa de amplificación, y ajuste del volumen de reactivos. Aplicable a partir del lote 28820C007.



# imegen

## Índice

<b>1. Información general</b>	4
<b>2. Uso previsto</b>	5
<b>3. Características técnicas</b>	5
<b>4. Advertencias y precauciones de seguridad</b>	6
<b>5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit</b>	7
<b>6. Equipos, reactivos y materiales necesarios que no se suministran</b>	8
<b>7. Protocolo de ensayo</b>	9
7.1 Preparación de las reacciones de amplificación	9
7.2 Preparación de los fragmentos amplificados	10
7.3 Electroforesis capilar	10
<b>8. Análisis de los resultados</b>	12
<b>9. Troubleshooting</b>	14
<b>10. Limitaciones</b>	16
10.1 Equipos	16
10.2 Reactivos	16
10.3 Estabilidad del producto	16



## 1. Información general

El síndrome de Gilbert es una enfermedad hereditaria, autosómica recesiva, que se manifiesta con elevados niveles de bilirrubina no conjugada o indirecta en sangre [hiperbilirrubinemia] y que es causada por una deficiencia parcial de la enzima glucoroniltransferasa (UGT) codificada por el gen *UGT1A1*, responsable de la eliminación de la bilirrubina en el hígado. Dicha deficiencia es causada por expansiones de dinucleótidos [TAx] en la TATA-box promotora de la transcripción del gen *UGT1A1*, situado en la región cromosómica 2q37.1. La presencia de los alelos A[TA]7TAA, A[TA]5TAA y A[TA]8TAA en la región reguladora del gen altera la transcripción normal de la enzima bilirrubina-UGT provocando el Síndrome de Gilbert.

El síndrome de Gilbert, aunque podría ocasionar como manifestación clínica una ictericia leve, generalmente no presenta síntomas.

### Referencias

- Molecular pathogenesis of Gilbert's syndrome: Decreased TATA-binding protein binding affinity of UGT1A1 gene promoter.  
Request PDF Available from:  
[https://www.researchgate.net/publication/6334763\\_Molecular\\_pathogenesis\\_of\\_Gilbert's\\_syndrome\\_Decreased\\_TATA-binding\\_protein\\_binding\\_affinity\\_of\\_UGT1A1\\_gene\\_promoter](https://www.researchgate.net/publication/6334763_Molecular_pathogenesis_of_Gilbert's_syndrome_Decreased_TATA-binding_protein_binding_affinity_of_UGT1A1_gene_promoter)



# imegen

## 2. Uso previsto

El kit **imegen-Gilbert Plus** permite llevar a cabo un test robusto y específico desarrollado para la detección de los alelos mutantes A[TA]5TAA, A[TA]7TAA y A[TA]8TAA, así como el alelo normal A[TA]6TAA del promotor del gen de *UGT1A1* mediante PCR y análisis del tamaño de los fragmentos generados.

Los productos de PCR serán separados por electroforesis capilar y serán detectados mediante el marcaje 6-Carboxifluoresceína [6-FAM].

**Imegen-Gilbert Plus** es sólo para uso diagnóstico in vitro y está dirigido a profesionales del sector de la biología molecular.

## 3. Características técnicas

Este kit ha sido validado utilizando material de referencia obtenido de Coriell Institute for Medical Research y muestras analizadas previamente por el servicio de genética médica de imegen, y detecta específicamente los alelos objeto de análisis en este kit.

El material necesario para este estudio es ADN genómico procedente, principalmente, de sangre periférica. La cantidad total de ADN necesario es 50 ng.

Imegen está certificada frente a la norma **UNE-EN ISO 13485:2018 Productos Sanitarios: Sistemas de Gestión de Calidad – Requisitos para fines reglamentarios** por la AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS para el Diseño, desarrollo y producción de productos sanitarios para diagnóstico in vitro:

- Kits de análisis genético
- Software para análisis bioinformático de datos genéticos



## 4. Advertencias y precauciones

1. Se recomienda seguir estrictamente las instrucciones de este manual, especialmente en cuanto a las condiciones de manipulación y almacenamiento de los reactivos.
2. No pipetear con la boca.
3. No fumar, comer, beber ni aplicarse cosméticos en las zonas donde se manipulan kits y muestras.
4. Se debe proteger debidamente cualquier afección cutánea, así como cortes, abrasiones y otras lesiones de la piel.
5. No verter los restos de reactivos a la red de agua potable. Se recomienda utilizar los contenedores de residuos establecidos por la normativa legal y gestionar su tratamiento a través de un gestor de residuos autorizado.
6. En caso de un derrame accidental de alguno de los reactivos, evitar el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas y limpiar con abundante agua.
7. Las hojas de datos de seguridad [MSDS] de todos los componentes peligrosos que contiene este kit están disponibles bajo petición.
8. Este producto requiere la manipulación de muestras y materiales de origen humano. Se recomienda considerar todos los materiales de procedencia humana como potencialmente infecciosos y manipularlos conforme a la norma de la OSHA sobre Bioseguridad de nivel 2 de los patógenos de transmisión sanguínea o se deben utilizar otras prácticas pertinentes de bioseguridad para los materiales que contienen o se sospecha que puedan contener agentes infecciosos.
9. Los reactivos incluidos en este kit no son tóxicos, explosivos, infecciosos, radiactivos, magnéticos, corrosivos ni causantes de contaminación ambiental biológica.
10. Este kit ha sido validado con unos equipos y en unas condiciones específicas que podrían variar sensiblemente en otros laboratorios. Se recomienda por tanto que cada laboratorio realice una validación interna cuando vaya a utilizar por primera vez el kit.
11. El fabricante no responde del mal funcionamiento del ensayo cuando los reactivos incluidos en el kit son sustituidos por otros reactivos no suministrados por imegen.
12. El fabricante no garantiza la reproducibilidad del ensayo cuando el usuario introduce reactivos no validados por imegen, por considerarlos equivalentes a los suministrados en el kit.



**imegen**

## 5. Contenido y condiciones de almacenamiento del kit

Este kit contiene reactivos suficientes para la realización de 48 determinaciones. La relación de reactivos incluidos en el kit es la siguiente:

- Gilbert Plus Master Mix: Contiene los oligonucleótidos necesarios para llevar a cabo la amplificación de la región diana del kit.
- General Master Mix I: Se trata de un master mix de PCR con las cantidades de enzima, nucleótidos, MgCl<sub>2</sub> y tampón necesarios para llevar a cabo las reacciones.
- Positive Control: Mezcla de ADNs genómicos que contienen el alelo normal A[TA]6TAA, y los siguientes alelos mutantes: A[TA]5TAA, A[TA]7TAA y A[TA]8TAA.

Reactivos	Color	Cantidad	Conservación
Gilbert Plus Master Mix	Disco verde	2 x 180 µL	-20°C
General Master Mix I	Disco blanco	600 µL	-20°C
Positive Control	Tapa naranja	60 µL	-20°C

Tabla 1. Componentes del kit imegen-Gilbert Plus



**imegen**

## 6. Equipos, reactivos y materiales no suministrados

### Equipos:

- Termociclador
- Micropipetas de 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L
- Vortex
- Centrífuga
- Secuenciador

### Reactivos:

- GeneScan™ 500 LIZ® (Applied Biosystems cat. no. 4322682)
- Hi-Di™ formamide

### Materiales:

- Puntas de pipetas con filtro (10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L)
- Tubos estériles de 1.5 mL
- Tubos o placas de 96 pocillos de 0.2 mL
- Film para placas de 96 pocillos
- Guantes de látex

Nota: Este kit no incluye los reactivos y materiales necesarios para llevar a cabo la electroforesis capilar.



## 7. Protocolo de ensayo

### 7.1 Preparación de las reacciones de amplificación

1. Descongelar todos los reactivos del kit y el ADN de las muestras. Agitar cada uno de los reactivos en vortex y mantener en frío.
2. En un tubo de 1.5 mL preparar el mix de PCR añadiendo los siguientes reactivos:

Reactivos	Cantidad por reacción
Gilbert Plus Master Mix	7.5 $\mu$ L
General Master Mix I	12.5 $\mu$ L

Para estimar la cantidad de reactivos necesaria, recomendamos tener en cuenta el número de muestras y realizar los cálculos, incrementando un 10% el volumen de cada reactivo.

3. Agitar en vortex y dar spin al mix de PCR. Dispensar 20  $\mu$ L a los correspondientes tubos de 0.2 mL.
4. Una vez dispensado el mix de PCR, añadir las siguientes cantidades a los tubos correspondientes:
  - 5  $\mu$ L de ADN genómico de la muestra [10 ng/ $\mu$ L]
  - 5  $\mu$ L del control positivo
  - 5  $\mu$ L de agua libre de nucleasas [control negativo]

Nota: Es conveniente poner un control negativo por cada tanda de amplificación para comprobar la ausencia de contaminación de los reactivos y un control positivo para verificar el tamaño de los alelos.

5. Colocar los tubos en el termociclador y ejecutar el siguiente programa de amplificación:

Campos	Etapa 1	Etapa 2			Etapa 3	
Nº de Ciclos	1 ciclo inicial Activación enzimática	35 ciclos			1 ciclo final Extensión final y conservación	
		Desnaturalización	Unión de cebadores	Extensión		
Temperatura	95°C	95°C	62°C	72°C	72°C	4°C
Tiempo	10 minutos	30 segundos	30 segundos	45 segundos	10 minutos	$\infty$

Tabla 2. Programa de PCR óptimo para los equipos T3 de Biometra, SimpliAmp Thermal Cycler y GENEAMP® PCR System 2720 de Applied Biosystems

Es posible detener el protocolo en este punto. Los productos de PCR pueden almacenarse a 4°C si se va a continuar con el protocolo en las próximas 24 horas o a -20°C para periodos de tiempo superiores.



# imegen

## 7.2 Preparación de los fragmentos amplificados

A partir de los productos de PCR, preparar la placa para el análisis de fragmentos como se indica a continuación:

1. Añadir a un tubo de 1.5 mL los siguientes reactivos:

Reactivos	Cantidad por reacción
Formamida	18 $\mu$ L
Marcador GeneScan™ 500 LIZ	0.5 $\mu$ L

Recomendamos realizar los cálculos considerando una reacción más, o bien, incrementando un 10% el volumen de cada reactivo.

Nota: El volumen del marcador de tamaño puede ser aumentado o disminuido para ajustar la intensidad de los picos.

2. Dispensar 18.5  $\mu$ L de la mezcla anterior en cada pocillo.
3. Añadir 1  $\mu$ L del ADN obtenido en las reacciones de PCR.

Nota: El volumen de muestra puede ser aumentado o disminuido (diluyendo las muestras) para ajustar la intensidad de los picos.

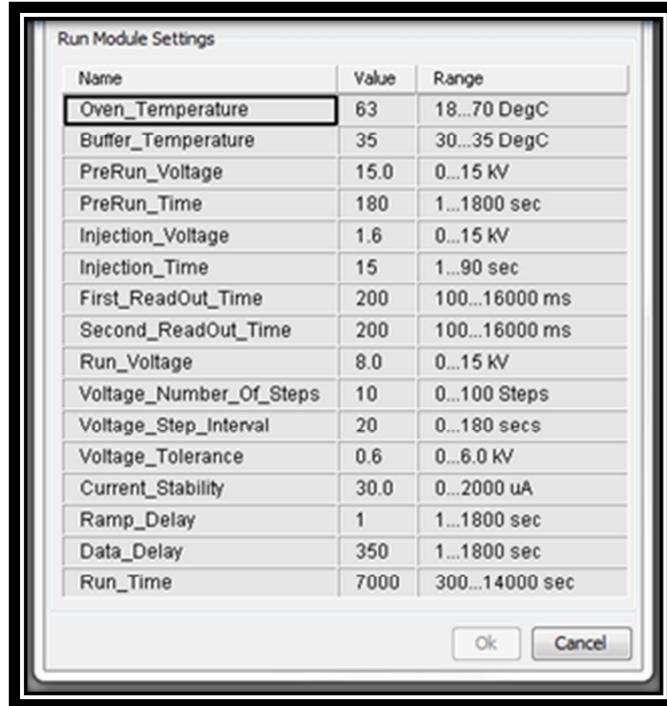
4. Tapar la placa, dar un spin y desnaturalizar en un termociclador durante 5 minutos a 98°C.
5. Guardar a 4°C la placa hasta el momento de introducirla en el secuenciador.

## 7.3 Electroforesis capilar

Una vez preparada la placa de fragmentos, las reacciones deben ser sometidas a electroforesis capilar. Dependiendo del modelo de secuenciador utilizado, se emplearán las condiciones de electroforesis recomendadas por el fabricante.

Para programar las condiciones de electroforesis capilar se debe tener en cuenta que el rango de amplificación varía aproximadamente entre 315-330 pb, que se emplean cebadores marcados con 6-FAM y que el patrón de peso molecular está marcado con GeneScan™ 500 LIZ.

A continuación se muestra una imagen con las condiciones optimizadas para el secuenciador 3730xl DNA Analyzer (ThermoFisher Scientific), usando el polímero POP-7™.



Name	Value	Range
Oven_Temperature	63	18...70 DegC
Buffer_Temperature	35	30...35 DegC
PreRun_Voltage	15.0	0...15 kV
PreRun_Time	180	1...1800 sec
Injection_Voltage	1.6	0...15 kV
Injection_Time	15	1...90 sec
First_ReadOut_Time	200	100...16000 ms
Second_ReadOut_Time	200	100...16000 ms
Run_Voltage	8.0	0...15 kV
Voltage_Number_Of_Steps	10	0...100 Steps
Voltage_Step_Interval	20	0...180 secs
Voltage_Tolerance	0.6	0...6.0 kV
Current_Stability	30.0	0...2000 uA
Ramp_Delay	1	1...1800 sec
Data_Delay	350	1...1800 sec
Run_Time	7000	300...14000 sec

Figura 1. Parámetros optimizados para el secuenciador 3730xl DNA

La intensidad de la detección puede variar entre los distintos equipos, dependiendo del modelo, del estado del sistema óptico del equipo y del tiempo y voltaje de inyección. Por ello, puede ser necesario, aumentar o disminuir la cantidad de marcador de tamaño o de producto de PCR requeridos para llevar a cabo la electroforesis capilar.



## 8. Análisis de resultados

Para un correcto análisis de los resultados se recomienda seguir estas indicaciones:

- Para analizar las muestras hay que emplear un *software* específico y el fichero .fsa obtenido como resultado de la electroforesis capilar.
- Comprobar que en el control negativo de PCR no hay presencia de picos de 315-330 pares de bases en el electroferograma. En caso de detectarse amplificación se recomienda repetir el ensayo para descartar que se haya producido una contaminación accidental.
- Análisis de las muestras:

El tamaño de los fragmentos puede variar entre distintos laboratorios, dependiendo de los reactivos y secuenciadores empleados para el análisis de fragmentos.

Para saber qué alelo tiene una muestra problema se deberá comparar con el control positivo, en el que están presentes los tres alelos mutantes [A(TA)<sub>5</sub>TAA, A(TA)<sub>7</sub>TAA y A(TA)<sub>8</sub>TAA] y el alelo normal A(TA)<sub>6</sub>TAA [Figura 2].

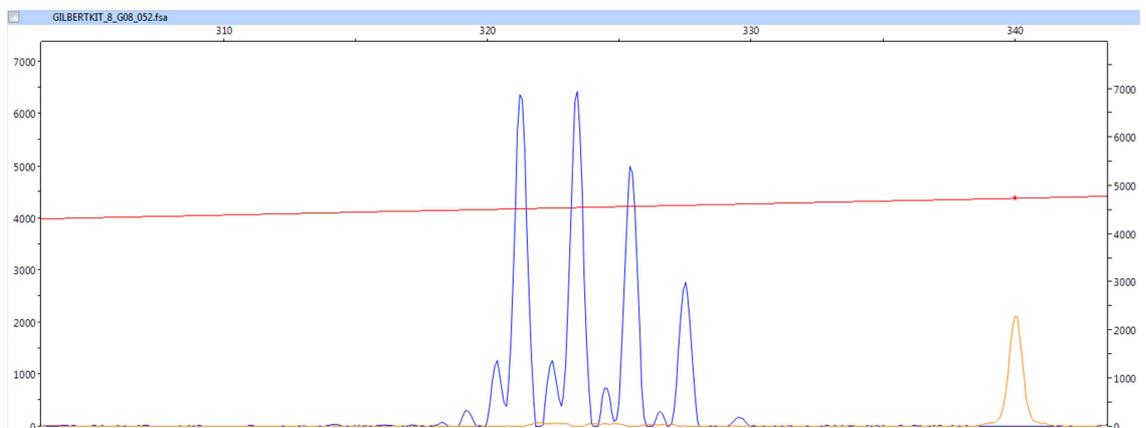


Figura 2. Resultado obtenido del análisis del control positivo. De izquierda a derecha aparecen los picos correspondientes a los alelos A(TA)<sub>5</sub>TAA, A(TA)<sub>6</sub>TAA, A(TA)<sub>7</sub>TAA y A(TA)<sub>8</sub>TAA.

A continuación se muestra una tabla con las correlaciones entre el alelo y el tamaño:

Alelo	Tamaño (pb)
A(TA) <sub>5</sub> TAA	321
A(TA) <sub>6</sub> TAA	323
A(TA) <sub>7</sub> TAA	325
A(TA) <sub>8</sub> TAA	327

Tabla 3: Alelos y tamaño del Positive Control



# imegen

El electroferograma permite la discriminación alélica y establecer claramente el genotipo de las muestra, determinándose según el tamaño de los picos los alelos presentes en la muestra y según el número de picos, si es homocigota o heterocigota para estos alelos.

	<b>A(TA)<sub>6</sub>TAA</b>	<b>A(TA)<sub>7</sub>TAA</b>	<b>A (TA)<sub>5</sub>TAA</b>	<b>A(TA)<sub>8</sub>TAA</b>
<b>A(TA)<sub>6</sub>TAA</b>	Homocigoto (TA) <sub>6</sub>	Heterocigoto (TA) <sub>6</sub> /(TA) <sub>7</sub>	Heterocigoto (TA) <sub>6</sub> /(TA) <sub>5</sub>	Heterocigoto (TA) <sub>6</sub> /(TA) <sub>8</sub>
<b>A(TA)<sub>7</sub>TAA</b>	Heterocigoto (TA) <sub>6</sub> /(TA) <sub>7</sub>	Homocigoto (TA) <sub>7</sub>	Heterocigoto (TA) <sub>7</sub> /(TA) <sub>5</sub>	Heterocigoto (TA) <sub>7</sub> /(TA) <sub>8</sub>
<b>A (TA)<sub>5</sub>TAA</b>	Heterocigoto (TA) <sub>6</sub> /(TA) <sub>5</sub>	Heterocigoto (TA) <sub>7</sub> /(TA) <sub>5</sub>	Homocigoto (TA) <sub>5</sub>	Heterocigoto (TA) <sub>5</sub> /(TA) <sub>8</sub>
<b>A(TA)<sub>8</sub>TAA</b>	Heterocigoto (TA) <sub>6</sub> /(TA) <sub>8</sub>	Heterocigoto (TA) <sub>7</sub> /(TA) <sub>8</sub>	Heterocigoto (TA) <sub>5</sub> /(TA) <sub>8</sub>	Homocigoto (TA) <sub>8</sub>

Tabla 4. Genotipos que pueden detectarse con imegen-Gilbert Plus

Nota: Para muestras con genotipos homocigotos únicamente se observará un pico correspondiente al tamaño del alelo que presentan en homocigosis.



## 9. Troubleshooting

La tabla siguiente representa los resultados que podrían ser obtenidos en las muestras analizadas, el control positivo, el marcador de tamaño y el control negativo. En caso de obtener un resultado inesperado, la interpretación y la razón más probable de dicho resultado se muestran a continuación.

Problema	Muestras analizadas	Control positivo	Marcador de tamaño	Control negativo	Resultados / Interpretación
Señal de fluorescencia débil o nula				√	Resultado esperado
	√			√	Cantidad y/o calidad del ADN molde insuficiente. <sup>1</sup> ADN molde impuro. <sup>2</sup>
	√	√	√	√	Fallo en la electroforesis capilar. <sup>3</sup> Fallo en la desnaturalización. <sup>4</sup>
	√	√		√	Fallo en la PCR. <sup>5</sup>
Señal de fluorescencia excesiva	√				Cantidad excesiva de ADN. <sup>6</sup>
	√	√			
Presencia de más picos de los esperados	√	√		√	Contaminación. <sup>7</sup>
	√				
	√	√			Artefactos característicos de las expansiones. <sup>8</sup>

Tabla 5. Interpretación de los posibles resultados con el kit imegen-Gilbert Plus

<sup>1</sup> **Cantidad y/o calidad de ADN molde insuficiente:** Comprobar que el ADN ha sido correctamente cuantificado y usar la cantidad indicada de ADN. En caso de que el ADN haya sido correctamente cuantificado, comprobar su integridad y llevar a cabo una nueva extracción si es necesario.

<sup>2</sup> **ADN molde impuro:** Altas concentraciones de sales o un pH alterado pueden inhibir la PCR. Si usa un ADN disuelto en un tampón de elución con un pH diferente de 8 o con concentraciones altas de EDTA, el volumen de ADN no debería exceder el 20% del volumen total de la reacción. Restos de los reactivos usados durante la extracción también pueden afectar a la reacción de PCR. Si es así, limpie el ADN o prepare una nueva extracción.

<sup>3</sup> **Fallo en la electroforesis capilar:** Revise si los parámetros del equipo son los especificados y reinyecte las muestras.



# imegen

- <sup>4</sup> **Fallo en la desnaturalización:** Para una correcta desnaturalización las muestras deben ser incubadas el tiempo indicado en el apartado 7 de estas instrucciones de uso, y posteriormente mantener en frío hasta la carga en el secuenciador.
- <sup>5</sup> **Fallo en la PCR:** Compruebe que el programa de PCR es el indicado.
- <sup>6</sup> **Cantidad excesiva de ADN:** Asegúrese de estar usando la cantidad adecuada de ADN. Si es así, diluya el producto de PCR en agua estéril desionizada y prepare de nuevo la desnaturalización y carga en el secuenciador.
- <sup>7</sup> **Contaminación:** Puede ser producida por otro ADN molde o por un ADN previamente amplificado. La contaminación cruzada puede dar lugar a falsos positivos dando lugar a errores en la interpretación de los resultados. Use puntas de pipeta con filtro y cambie los guantes regularmente.
- <sup>8</sup> **Artefactos característicos del análisis de expansiones:** La amplificación de expansiones genera artefactos (picos en el electroferograma) que aparecen como picos menos intensos y de menor tamaño que el pico predominante.



## 10. Limitaciones

### 10.1 Equipos

**Imegen-Gilbert Plus** ha sido validado usando los siguientes termocicladores de PCR:

- SimpliAmp Thermal Cycler [ThermoFisher Scientific]
- GeneAmp PCR System 2720 [ThermoFisher Scientific]
- T3000 Thermocycler 48 [Biometra]

Si usa otra marca o modelo de termocicladores, podría necesitar ajustar el programa de amplificación. Por favor, contacte con nuestro servicio técnico para cualquier consulta o aclaración.

**Imegen-Gilbert Plus** ha sido validado usando la siguiente plataforma de secuenciación:

- 3730xl DNA Analyzer [ThermoFisher Scientific]

Este kit es válido para los polímeros compatibles con el marcaje 6-Carboxifluoresceína [6-FAM]. En caso de utilizar otro equipo diferente al mencionado anteriormente, seguir las especificaciones del protocolo de dichas plataformas.

### 10.2 Reactivos

**Imegen-Gilbert Plus** se ha validado empleando los reactivos incluidos en el kit y los recomendados en el apartado 6 de este manual [Equipos y materiales necesarios que no se suministran].

Para la electroforesis capilar se recomienda emplear los reactivos recomendados por el proveedor del secuenciador: ThermoFisher Scientific.

En caso de duda, por favor contacte con nuestro servicio técnico.

### 10.3 Estabilidad del producto

El funcionamiento óptimo de este producto está confirmado siempre que se apliquen las condiciones recomendadas de almacenamiento especificadas dentro de la fecha óptima del producto asociada a cada lote de producción.