

[EN]

Further information

- **Instructions for Use (IFU) of the RAID-CRC Screen qPCR Kit:** <https://professionalarea.goodgut.eu>. If the website is temporarily unavailable and the IFU cannot be accessed, it can be requested by email at support@goodgut.eu. The instructions will be sent within 7 calendar days from receipt of the request. **This quick-start protocol does not replace the official Instructions for Use.** The user must consult the IFU before using the product to ensure proper handling and regulatory compliance.
- **Technical assistance:** support@goodgut.eu.

Scan the QR code to access the Instructions for Use.



[ES]

RAID-CRC Screen qPCR Kit Colorectal Cancer Screening qPCR Kit

PROTOCOLO DE INICIO RÁPIDO

El kit de qPCR **RAID-CRC Screen** (en inglés RAID-CRC Screen qPCR kit) es un dispositivo de diagnóstico *in vitro* destinado al uso profesional en laboratorio por personal cualificado.

Finalidad prevista

El Kit RAID-CRC Screen qPCR Kit está destinado al cribado de la neoplasia colorrectal avanzada, incluyendo lesiones precancerosas y cáncer colorrectal, en individuos asintomáticos de entre 50 y 69 años, ambos incluidos, que hayan obtenido un resultado positivo de la prueba inmunoquímica fecal (FIT) con un punto de corte de 100 ng de hemoglobina por mL utilizando el tubo colector de Eiken Chemical.

El ensayo RAID-CRC Screen detecta marcadores bacterianos específicos en el ADN extraído de muestras de heces de los pacientes mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

Conservación y estabilidad

El RAID-CRC Screen qPCR Kit debe transportarse entre 2°C y 8°C. A su recepción, la Master Mix 4X y los controles positivos deben almacenarse entre -30°C y -15°C, en un congelador de temperatura constante y protegidos de la luz. Los cebadores y sondas liofilizados pueden mantenerse a temperatura ambiente hasta su resuspensión en tampón Tris-HCl pH 8.0; una vez resuspendidos, deben conservarse entre -30°C y -15°C.

Información de seguridad

- Solo para uso profesional (únicamente para usuarios profesionales).
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe empezar a trabajar en el Área de Extracción y seguidamente pasar al Área de Amplificación y Detección. **No retornar las muestras, equipos y reactivos al área en la que se realizó el paso anterior.**
- Realizar la preparación de la *mix* en una cabina de bioseguridad libre de ADN. **Evitar cargar la muestra y los controles positivos en la placa dentro de la misma cabina.**
- Deben seguirse Buenas Prácticas de Laboratorio. Llevar ropa de protección, guantes desechables, gafas protectoras y mascarilla. No comer, beber ni fumar en el área de trabajo. Una vez finalizado el análisis, lavar las manos.
- Eliminar los consumibles y los reactivos de qPCR en el contenedor para residuos biológicos.
- Se recomienda una descontaminación regular de los equipos con los que se trabaja, especialmente de las micropipetas y las superficies de trabajo.



Precaución: Las Master Mix 4x contienen **1,2,4-triazol**, una **sustancia peligrosa**. Puede perjudicar la fertilidad o causar daños al feto. También puede suponer riesgos para los niños alimentados con leche materna. Deben obtenerse instrucciones especiales antes del uso. No manipule el kit hasta haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad. Se deben cumplir las buenas prácticas de laboratorio descritas en esta sección y garantizar que el personal esté informado sobre los riesgos asociados al manejo del producto. **En caso de exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.**

[ES]



Precaución: NO añadir lejía ni soluciones ácidas directamente a los desechos de preparación de muestras.

Requisitos para el análisis

El RAID-CRC Screen qPCR Kit está optimizado para muestras fecales de individuos asintomáticos de 50–69 años con FIT positivo (100 ng Hb/mL). En caso de usar un punto de corte distinto, contactar con support@goodgut.eu.

Para conocer todos los requisitos preanalíticos, la gestión de las muestras, los criterios de exclusión completos, el proceso de preparación previa a la extracción de ADN y esta extracción consulte las Instrucciones de uso (IFU).

Los resultados son válidos únicamente si se emplean los kits de extracción y extractores validados, así como los termocicladores validados (véanse Anexos 1 y 2 de las IFUs).

Protocolo de análisis

• Protocolo de qPCR

La master mix y los cebadores/sondas precargadas, así como los parámetros de amplificación (temperatura de hibridación, número de ciclos y duración de cada fase) han sido optimizados para obtener un rendimiento y una especificidad óptimos del análisis.

Nota: Antes de empezar, resuspender los cebadores y sondas en Tris-HCl pH 8.0, incubar 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C, y conservarlos posteriormente entre –30 °C y –15 °C.

Para obtener el diagnóstico, deben realizarse dos análisis qPCRs multiplex y uno singleplex para cada muestra: Screen A (SCR_A), Screen B (SCR_B) y Screen C (SCR_C). Para cada análisis de qPCR (SCR_A, SCR_B y SCR_C) realizar los pasos 1 – 5 separadamente.

1. Determinar el número de microtubos y tapas necesarios para realizar las reacciones requeridas teniendo en cuenta las muestras y los controles de cada análisis de qPCR (material no incluido en el kit). Un control positivo y un control negativo sin ADN molde (NTC) deben ser incluidos en cada análisis qPCR.

Nota: Cada qPCR tiene su propio control positivo.

2. Descongelar la Multiplex Master Mix 4X, los cebadores, las sondas y los controles positivos.
3. Añadir los componentes necesarios para la realización de cada análisis de qPCR en un tubo de microcentrifuga (véanse los componentes para cada análisis en las IFUs). Se recomienda preparar un volumen de Mix de $n \times 1,1$ (donde n es el número de reacciones), para minimizar el efecto del error por pipeteo. Minimizar la exposición de las sondas marcadas con fluorescencia a la luz.

Nota: El número de reacciones a realizar simultáneamente debe ser igual o menor al número de reacciones que pueden realizarse en el termociclador.

4. Mezclar la reacción vigorosamente y centrifugarla brevemente. Dispensar 8 µL en los tubos qPCR recomendados por el fabricante del termociclador a utilizar.
5. Añadir **2 µL de muestras de ADN** en los tubos de qPCR que contienen la mix de la reacción. Además, añadir también **2 µL del control positivo** específico para el análisis qPCR correspondiente al tubo reservado para este control y dejar un tubo solo con la mix de la reacción como **control negativo (NTC)**.

[EN]

9. For each qPCR assay (SCR_A, SCR_B, or SCR_C), all samples and controls of the same type must be analysed within the same run. In addition, it is recommended to perform the three multiplex analyses in a single run to ensure consistent experimental conditions and to facilitate interpretation of the results.

Table 1. Thermocycler program for RAID-CRC Screen multiplex/singleplex qPCR assays.

Step		Time (min:s)	Temperature (°C)
qPCR activation		01:00	95
40 cycles	Denaturation	00:15	95
	Annealing + Extension	00:30	60

10. Insert the qPCR tubes into the real-time thermocycler and start the run.

Note: If different thermocyclers are used for the analyses of the same sample (e.g., Multiplex 1 in thermocycler 1 and Multiplex 2 in thermocycler 2), both devices must be of the same model to ensure result consistency.

• Analysis and interpretation of results

1. Sample analysis must be carried out using the software provided with the qPCR instrument, following the manufacturer's instructions for use.

Note: Before data analysis, select the predefined parameters (baseline and threshold) for each primer/probe set as specified in the Technical Specifications of the RAID-CRC Screen. This information is provided with the kit and available in the Professional Area of the GoodGut website (<https://professionalarea.goodgut.eu>).

2. To obtain the RAID-CRC Screen diagnostic result, the data generated in each multiplex qPCR assay (including positive and negative controls) must be uploaded to the **GoodGut-Test™** web platform (<https://goodgut-test.eu>) following the **User Manual**.

The data must be uploaded using the specific Excel templates for each multiplex assay, which must include:

- Sample identifier
- Detection channel (dye)
- Raw Ct (Cq) value

The Excel templates can be downloaded directly from the platform as indicated in the User Manual.

[ES]

Más información

- **Instrucciones de uso (IFU, del inglés Instructions For Use) del RAID-CRC Screen qPCR kit:** <https://www.goodgut-test.eu>. Si el acceso al sitio web no está disponible temporalmente y no es posible obtener las IFU, debe solicitar las instrucciones por correo electrónico a support@goodgut.eu. Estas le serán enviadas en un plazo máximo de 7 días naturales desde la recepción de la solicitud. **Este protocolo de inicio rápido no sustituye las instrucciones de uso del producto.** El usuario debe consultar las IFU oficiales antes de utilizar el producto para asegurar su correcto uso.
- **Asistencia técnica:** support@goodgut.eu.

Escanee el código QR para acceder a las instrucciones de uso.



[EN]

RAID-CRC Screen qPCR Kit

Colorectal Cancer Screening qPCR Kit

QUICK START PROTOCOL

The **RAID-CRC Screen qPCR Kit** is an *in vitro* diagnostic device (IVD) intended for professional laboratory use by qualified personnel.

Intended use

The RAID-CRC Screen qPCR Kit is an *in vitro* diagnostic device intended for the screening of advanced colorectal neoplasia, including precancerous lesions and colorectal cancer, in asymptomatic individuals aged 50 to 69 years (both inclusive) who have obtained a positive result in the faecal immunochemical test (FIT) at a cut-off point of 100 ng haemoglobin per mL using the collection tube from Eiken Chemical.

The RAID-CRC Screen assay detects specific bacterial markers in DNA extracted from stool samples using quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

Storage and stability

The RAID-CRC Screen qPCR Kit must be transported between 2 °C and 8 °C. Upon receipt, the Master Mix 4X and positive controls must be stored between –30 °C and –15 °C in a constant-temperature freezer protected from light. The lyophilised primers and probes can be kept at room temperature until resuspension in Tris-HCl buffer (pH 8.0); once resuspended, they must be stored between –30 °C and –15 °C.

Safety information

- For professional use only.
- Do not use after the expiry date.
- Design a unidirectional workflow: start in the Extraction Area, then move to the Amplification and Detection Area. **Do not return samples, equipment, or reagents to previous areas.**
- Prepare reaction mixes in a DNA-free biosafety cabinet. **Avoid loading samples and positive controls in the same cabinet.**
- Follow Good Laboratory Practice: wear protective clothing, disposable powder-free gloves, safety glasses, and a face mask. Do not eat, drink, or smoke in the laboratory. Wash your hands after handling samples.
- Dispose of consumables and qPCR reagents in biohazard waste containers.
- Regularly decontaminate all working equipment, especially pipettes and work surfaces.



Warning: The kit contains 1,2,4-triazole. May impair fertility or cause harm to the unborn child. May cause harm to breastfed children. Seek specific instructions before use. Do not handle the kit without reading and understanding all safety information. Follow the good laboratory practices described above and ensure all personnel are informed of the associated risks. **In case of exposure, consult a physician.**



Warning: Do NOT add bleach or acidic solutions directly to sample waste.

[EN]

Analysis requirements

The RAID-CRC Screen qPCR Kit is optimised for stool samples obtained from asymptomatic individuals aged 50–69 years with a positive FIT result (Eiken Chemical, cut-off 100 ng Hb/mL). If a different FIT cut-off is used, please contact support@goodgut.eu.

To review all pre-analytical requirements, sample handling procedures, full exclusion criteria, the pre-extraction preparation process, and the DNA extraction workflow, please refer to the Instructions for Use (IFU).

Results are only valid when using the extraction kits and automated extractors, as well as the thermocyclers, that have been validated for this assay (see Annexes 1 and 2 of the IFU).

Analysis protocol

• qPCR procedure

The Master Mix 4X and the pre-loaded primers/probes, as well as the parameters (temperature, number of cycles, and step times), have been optimised for optimal performance and specificity.

Note: Before starting, resuspend primers and probes in Tris-HCl pH 8.0, incubate for 1 h at room temperature or overnight at 4 °C, and then store between –30 °C and –15 °C.

For each sample, perform two multiplex qPCRs and one singleplex qPCR: Screen A (SCR_A), Screen B (SCR_B), and Screen C (SCR_C). For each qPCR analysis (SCR_A, SCR_B, SCR_C), perform steps 1–5 separately.

1. Determine the number of microtubes and caps required to perform the necessary reactions, taking into account the samples and the controls for each qPCR assay (material not included in the kit). A positive control and a no-template control (NTC) must be included in every qPCR assay.

Note: Each qPCR assay has its own specific positive control.

2. Thaw the Master Mix 4X, primers, probes, and positive controls.
3. Add the necessary components for each qPCR analysis to a microcentrifuge tube (see the components required for each analysis in the IFUs). It is recommended to prepare a Mix volume of $n \times 1.1$ (where n is the number of reactions) to minimise pipetting error. Minimise exposure of the fluorescently labelled probes to light.

Note: The number of simultaneous reactions must not exceed the capacity of the thermocycler.

4. Mix thoroughly, briefly centrifuge, and **dispense 8 µL into the qPCR tubes** recommended by the thermocycler manufacturer.
5. **Add 2 µL of the DNA sample** to each reaction tube. **Add 2 µL of the specific positive control** to its designated tube and leave one tube with the reaction mix only as **NTC**.
6. Close the tubes with the appropriate **optical caps, vortex briefly (5 seconds)**, and perform a short spin to ensure that the reaction mix settles at the bottom of the tube, avoiding the formation of droplets and/or bubbles.
7. Insert the strips into the compatible thermocycler (see compatibility in Annex 2 of the Instructions for Use).
8. Program the thermocycler according to the cycling conditions described in Table 1. All three qPCR analyses follow the same program.

Note: Select fluorogenic channels during the combined annealing/extension step: FAM, HEX and ROX for Screen A; HEX and CY5 for Screen B; FAM for Screen C.

[ES]

6. Cerrar los tubos con los tapones ópticos correspondientes, agitar en **vórtex (5 segundos)** y aplicar un **breve spin** para asegurar que la mezcla se sitúe en el fondo del tubo evitando la formación de gotas y/o burbujas.
 7. Introducir las tiras en el termociclador compatible (ver compatibilidad en Anexo 2 de las Instrucciones de Uso).
 8. Programar el termociclador según el programa de la Tabla 1, los tres análisis de qPCR tienen el mismo programa.
- Nota:** Seleccionar los canales (dianas) específicos para que la adquisición de datos fluorogénicos se realice durante el paso combinado de unión/elongación: FAM, HEX y ROX para Screen A; HEX y CY5 para Screen B; y FAM para Screen C.
9. Para cada ensayo de qPCR (SCR_A, SCR_B o SCR_C), todas las muestras y controles del mismo tipo deben ser analizados en el mismo run. Además, se recomienda realizar los 3 análisis multiplex en un único run, para garantizar la consistencia de las condiciones experimentales y facilitar la interpretación de los resultados.

Tabla 1. Protocolo del termociclador para los análisis de las qPCR multiplex/singleplex RAID-CRC Screen.

Paso		Tiempo (min:s)	Temperatura (°C)
Activación de la qPCR		01:00	95
40 ciclos	Desnaturalización	00:15	95
	Unión + Elongación	00:30	60

10. Insertar los tubos de qPCR en el termociclador a tiempo real y empezar el análisis.

Nota: Si se utilizan distintos termocicladores para los análisis de una misma muestra (por ejemplo, Multiplex 1 en el termociclador 1 y Multiplex 2 en el termociclador 2), es imprescindible que ambos equipos sean del mismo modelo, para garantizar la consistencia de los resultados.

• Análisis e interpretación de los resultados

1. Realizar el análisis de los datos. El análisis de las muestras se realiza mediante el programa del equipo de qPCR utilizado y siguiendo las instrucciones de uso del fabricante.

Nota: antes de realizar el análisis de los datos, seleccionar los parámetros de análisis preestablecidos (línea base y valores de threshold) según las Especificaciones Técnicas del RAID-CRC Screen (esta información se proporciona una vez que se adquiere el RAID-CRC Screen qPCR kit y se pueden encontrar en el Área Profesional de la página web de GoodGut (<https://professionalarea.goodgut.eu>)).

2. Para obtener el diagnóstico RAID-CRC Screen, los resultados obtenidos en el análisis de qPCR multiplex (incluyendo controles positivos y negativos) deben ser introducidos en la plataforma web **GoodGut-Test™** (<https://goodgut-test.eu>) siguiendo el **Manual de Usuario**.

Los datos deben subirse en archivos Excel específicos para cada multiplex, que deben incluir:

- Identificador de la muestra
- Canal de detección (dye)
- Valor de Ct crudo (Cq)

Los modelos Excel pueden descargarse en la plataforma siguiendo el manual de usuario.