



KIT RAID-Dx

Irritable Bowel Syndrome Diagnostic qPCR Kit

Descripción General

El kit RAID-Dx ha sido optimizado mediante el análisis de PCRs multiplex cuantitativas y utilizando cebadores y sondas fluorescentes. Se trata de una herramienta de fácil uso que ofrece resultados reproducibles con elevada sensibilidad, especificidad y un rango dinámico amplio. El producto se basa en la actividad 5' exonucleasa de la enzima ADN polimerasa. Durante la amplificación del ADN, esta enzima corta las sondas unidas a la secuencia complementaria del ADN, separando el *quencher* del *reporter*. Esta reacción genera un incremento en la señal de fluorescencia proporcional a la cantidad de secuencia diana que está siendo hidrolizada. Esta fluorescencia puede ser medida en plataformas de PCR a tiempo real.

El Kit RAID-Dx requiere de tres análisis qPCR para cada muestra para poder obtener un diagnóstico. Así pues, el kit RAID-Dx incluye 9 (3x3) tiras de microtubos de 8 reacciones cada una, con lo que se puede realizar un total de 24x3 reacciones. La master mix se proporciona liofilizada, junto con los cebadores y las sondas, en las tiras de microtubos precargadas en un formato estabilizado, lo que confiere estabilidad a largo plazo y evita la necesidad de cadena de frío. El producto contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para el análisis de la qPCR en un volumen final de 20 μ L (incluyendo el ADN molde). Tres controles positivos, uno para cada análisis de qPCR, son incluidos liofilizados en tubos por separado para comprobar la correcta realización de cada análisis de qPCR.

Uso Previsto

El Kit RAID-Dx pretende diagnosticar el síndrome del intestino irritable, así como su diagnóstico diferencial de la enfermedad inflamatoria intestinal, mediante la detección de marcadores microbianos en muestras de ADN extraídas de heces de pacientes.

Requisitos para el análisis del RAID-Dx

El kit RAID-Dx ha sido optimizado para realizar el análisis del ADN extraído de muestras de heces que cumplen los siguientes requisitos:

- Las muestras de heces deben pertenecer a sujetos que presentan dolor abdominal, alteraciones del ritmo deposicional y/o que cumplan con los criterios de Roma IV.



- Las muestras de heces deben estar libres de antibióticos durante el mes previo a la deposición.
- No se aceptan muestras de heces de mujeres embarazadas.
- Las muestras de heces deben ser tratadas dentro de las primeras 48 horas después de su recogida. **Nota:** a su llegada, la muestra debe ser homogeneizada utilizando una espátula metálica debidamente esterilizada y seguidamente se debe proceder a la extracción del ADN. Si la extracción de ADN no puede realizarse a la llegada de la muestra, esta puede ser congelada a -20°C.
- Los resultados obtenidos mediante el uso del kit RAID-Dx solo son fiables cuando se utiliza el kit de extracción de ADN DNeasy Powersoil Pro de QIAGEN. Se debe trabajar según lo establecido por el fabricante. **Nota:** en lugar de utilizar 250 mg de suelo, deben pesarse aproximadamente 50 mg de heces.

Contenido del kit

Tabla 1. Componentes incluidos en el kit RAID-Dx.

Kit RAID-Dx (24x3 20 µL/reacción)	
3 x 8 tiras de microtubos de GoodGut RAID-Dx Multiplex 1, que incluye los siguientes componentes liofilizados:	
	Master Mix multiplex (Contiene: enzimas, <i>buffer</i> , mix de dNTPs [dATP, dCTP, dGTP, dTTP], estabilizadores)
	Cebador DX_1_f1
	Cebador DX_1_r1
	Sonda DX_1_FAM (contiene el fluorocromo FAM y el <i>quencher</i> BHQ1)
	Cebador DX_1_f2
	Cebador DX_1_r2
	Sonda DX_1_HEX (contiene el fluorocromo HEX y el <i>quencher</i> BHQ1)
	Cebador DX_1_f3
	Cebador DX_1_r3
	Sonda DX_1_ROX (contiene el fluorocromo ROX y el <i>quencher</i> BHQ2)
3 x 8 tiras de microtubos de GoodGut RAID-Dx Multiplex 2 que incluye los siguientes componentes liofilizados:	
	Master Mix multiplex (Contiene: enzimas, <i>buffer</i> , mix de dNTPs [dATP, dCTP, dGTP, dTTP], estabilizadores)
	Cebador DX_2_f1
	Cebador DX_2_r1


Kit RAID-Dx
(24x3 | 20 µL/reacción)

Sonda DX_2_FAM (contiene el fluorocromo FAM y el <i>quencher</i> BHQ1)
Cebador DX_2_f2
Cebador DX_2_r2
Sonda DX_2_HEX (contiene el fluorocromo HEX y el <i>quencher</i> BHQ1)
Cebador DX_2_f3
Cebador DX_2_r3
Sonda DX_2_ROX (contiene el fluorocromo ROX y el <i>quencher</i> BHQ2)
3 x 8 tiras de microtubos de GoodGut RAID-Dx Multiplex 3 que incluye los siguientes componentes liofilizados:
Master Mix multiplex (Contiene: enzimas, <i>buffer</i> , mix de dNTPs [dATP, dCTP, dGTP, dTTP], estabilizadores)
Cebador DX_3_f1
Cebador DX_3_r1
Sonda DX_3_FAM (contiene el fluorocromo FAM y el <i>quencher</i> BHQ1)
Sonda DX_3_HEX (contiene el fluorocromo HEX y el <i>quencher</i> BHQ1)
Cebador DX_3_f2
Cebador DX_3_r2
Sonda DX_3_ROX (contiene el fluorocromo ROX y el <i>quencher</i> BHQ2)
Control Positivo GG1 (contiene una mezcla de los productos de amplificación de la qPCR GoodGut RAID-Dx Multiplex 1)
Control Positivo GG2 (contiene una mezcla de los productos de amplificación de la qPCR GoodGut RAID-Dx Multiplex 2)
Control Positivo GG3 (contiene una mezcla de los productos de amplificación de la qPCR GoodGut RAID-Dx Multiplex 3)
<i>Buffer</i> de rehidratación
9 tiras desprendibles de 8 tapones

Reactivos, materiales y equipos no provistos

La siguiente lista incluye los reactivos, materiales y equipos que son necesarios para el análisis del RAID-Dx, pero no están incluidos en el kit RAID-Dx.

- Espátula metálica
- Termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte las 'Especificaciones Técnicas del RAID-Dx' que se puede encontrar en la página web de GoodGut www.goodgut.eu o en la plataforma GoodGut-Test® <https://goodgut-test.eu/auth/login>)
- Kit DNeasy Powersoil Pro DNA extraction (Ref. 47014, QIAGEN)
- *Buffer* Tris-HCl pH 8,1 (para la resuspensión de los controles positivos)



- Plataforma GoodGut-Test® para el diagnóstico con RAID-Dx (<https://goodgut-test.eu/auth/login>)
- Tubos de microcentrífuga
- Puntas con filtro
- Vórtex
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Centrífuga de spin
- Micropipetas (0,5 – 10 μ L, 10 – 100 μ L y 100 – 1000 μ L)
- Guantes desechables sin polvo

Condiciones de Transporte y Almacenaje

Los kits RAID-Dx pueden ser enviados y almacenados a 2-40°C hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta. Las tiras de microtubos de 8 reacciones deben ser almacenadas dentro de la bolsa de aluminio con el gel de sílice proporcionada. Se recomienda realizar algunas alícuotas de los controles positivos una vez resuspendidos para evitar realizar más de 3 ciclos de congelación/descongelación.

Información de Seguridad

- Solo para uso profesional *in vitro* (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.
- 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: NO añadir lejía ni soluciones ácidas directamente a los desechos de preparación de muestras.



Control de Calidad

De acuerdo con el Sistema de Gestión de Calidad de GoodGut (certificado con la ISO13485), cada lote del Kit RAID-Dx se prueba bajo unas especificaciones predeterminadas para asegurar la actividad, la eficiencia y la sensibilidad. El certificado de análisis se puede encontrar en la página web de GoodGut: www.goodgut.eu.

Información de Reactivos

Tabla 2. Información de los reactivos incluidos en el Kit RAID-Dx.

Componente	Descripción
GoodGut RAID-Dx Multiplex 1	3 x tiras de 8 reacciones con la Multiplex 1
Master Mix	Enzimas, <i>buffer</i> , mix de dNTPs [dATP, dCTP, dGTP, dTTP], estabilizadores
Cebadores (forward and reverse)	Contiene 3 juegos de cebadores purificados mediante HPLC precargados en las tiras de microtubos para 8 reacciones.
Sondas	Contiene 3 sondas purificadas mediante HPLC precargadas en las tiras de microtubos para 8 reacciones.
GoodGut RAID-Dx Multiplex 2	3 x tiras de 8 reacciones con la Multiplex 2
Master Mix	Enzimas, <i>buffer</i> , mix de dNTPs [dATP, dCTP, dGTP, dTTP], estabilizadores
Cebadores (forward and reverse)	Contiene 3 juegos de cebadores purificados mediante HPLC precargados en las tiras de microtubos para 8 reacciones.
Sondas	Contiene 3 sondas purificadas mediante HPLC precargadas en las tiras de microtubos para 8 reacciones.
GoodGut RAID-Dx Multiplex 3	3 x tiras de 8 reacciones con la Multiplex 3
Master Mix	Enzimas, <i>buffer</i> , mix de dNTPs [dATP, dCTP, dGTP, dTTP], estabilizadores
Cebadores (forward and reverse)	Contiene 2 juegos de cebadores purificados mediante HPLC precargados en las tiras de microtubos para 8 reacciones.
Sondas	Contiene 3 sondas purificadas mediante HPLC precargadas en las tiras de microtubos para 8 reacciones.
Buffer de rehidratación	Solución para reconstituir el producto estabilizado.
Control positivo GG1 Control positivo GG2 Control positivo GG3	Cada control positivo contiene un conjunto diferente de 3 productos de amplificación de qPCR, que han pasado por un proceso de control de calidad que incluye verificación del tamaño por electroforesis capilar e identificación de la secuencia por espectrometría de masas.

Protocolo qPCR

Para obtener los resultados del RAID-Dx debe seguirse este protocolo. La master mix y los cebadores/sondas precargadas, así como los parámetros (temperatura (hibridación), número de



ciclos y tiempo de cada fase] han sido optimizados para obtener un rendimiento y una especificidad óptimos del análisis.

Antes de empezar, resuspender los controles positivos con 25 μ L de *buffer* Tris-HCl pH 8,1. **Nota:** para una resuspensión óptima, después de añadir el tampón de rehidratación, incubar los tubos a temperatura ambiente durante 1 hora o toda la noche a 4°C. Una vez resuspendidos deben ser almacenados a -20°C en un congelador que mantenga una temperatura constante y protegidos de la luz.

Para obtener el diagnóstico, se deben realizarse 3 análisis de qPCR multiplex para cada muestra: GoodGut RAID-Dx Multiplex 1, GoodGut RAID-Dx Multiplex 2 y GoodGut RAID-Dx Multiplex 3. Para cada análisis multiplex (Multiplex 1, Multiplex 2 y Multiplex 3) realizar los pasos 1 – 4 separadamente utilizando las tiras de microtubos de 8 reacciones (los pasos 1 – 4 se repetirán 3 veces, una por cada análisis de qPCR multiplex).

1. Determinar y separar el número de microtubos (de las tiras de microtubos de 8 reacciones) para las reacciones necesarias teniendo en cuenta las muestras y los dos controles indicados para el análisis de qPCR multiplex a realizar (Multiplex 1, Multiplex 2 o Multiplex 3). Un control positivo y un control sin ADN molde (NTC) deben ser incluidos en cada análisis de qPCR. **Nota:** Cada qPCR tiene su propio control positivo.
2. Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios. Eliminar el sellado de aluminio de las tiras y añadir 18 μ L de tampón de rehidratación en cada pocillo.
3. Añadir 2 μ L de muestras de ADN en cada microtubo donde se encuentra la mix de la reacción. Añadir 2 μ L del control positivo específico para el análisis qPCR que se esté realizando (control positivo GG1 para la Multiplex 1, control positivo GG2 para la Multiplex 2 o control positivo GG3 para la Multiplex 3) en el tubo reservado para este control, y dejar un tubo solo con la mix, sin ADN molde, como control negativo (NTC). Cerrar los tubos con los tapones ópticos proporcionados con el kit, realizar un vórtex a los tubos (5 segundos), y aplicar un spin para asegurar que la mezcla de la reacción se encuentra en el fondo del tubo sin burbujas.
4. Repetir los pasos 1 – 3 para los otros análisis qPCR multiplex para completar el análisis RAID-Dx.
5. Cargar las tiras de tubos en el termociclador.



6. Programar el termociclador según lo establecido en la Tabla 3. **Nota:** seleccionar los canales (dye) para que la adquisición de los datos fluorogénicos se pueda realizar durante la fase combinada de hibridación/extensión: FAM, HEX y ROX para los tres análisis de las qPCR multiplex de RAID-Dx.

Tabla 3. Protocolo de ciclos térmicos para el análisis de las qPCRs multiplex del RAID-Dx.

Fase		Tiempo (min:s)	Temperatura (°C)
Activación qPCR		01:00	95
40 ciclos	Desnaturalización	00:15	95
	Hibridación + Extensión	00:30	60

7. Iniciar el *run*. **Nota:** todas las muestras y los controles del mismo tipo del análisis qPCR (Multiplex 1 o Multiplex 2 o Multiplex 3) deben ser analizados en el mismo run de qPCR. En caso de utilizar más de un termociclador para el análisis de la misma muestra (por ejemplo: análisis de la Multiplex 1 en el termociclador 1 y análisis de la Multiplex 2 en el termociclador 2), asegurarse de utilizar el mismo modelo de termociclador.

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 para cada sistema de cebadores + sonda (línea base y valores de *threshold*) según las 'Especificaciones Técnicas del RAID-Dx' (que se pueden encontrar en la página web de GoodGut www.goodgut.eu o en la plataforma GoodGut-Test® <https://goodgut-test.eu/auth/login>).

Control Positivo

El control positivo se utiliza para asegurar el correcto rendimiento del run de qPCR. Una vez establecidos los parámetros de análisis, el valor de Ct obtenido para el control positivo debe estar comprendido entre el rango de Ct establecido en las 'Especificaciones Técnicas del RAID-Dx'. Cuando el valor de Ct del control positivo se sitúa fuera del rango aceptado los resultados no son fiables. En este caso, el análisis de la muestra debe ser repetido.



Control sin ADN molde (NTC)

El control sin ADN molde (NTC) se utiliza para asegurar que la mix de la reacción no está contaminada. Una vez establecidos los parámetros de análisis, el Ct obtenido en el NTC debe ser superior al valor límite establecido en las 'Especificaciones Técnicas del RAID-Dx'. Cuando el valor de Ct del NTC es inferior al valor límite de Ct aceptado los resultados no son fiables. En este caso, el análisis de la muestra debe ser repetido.

Nota: Encontrará las 'Especificaciones Técnicas del RAID-Dx' específicas del lote de su kit en la página web de GoodGut www.goodgut.eu o en la plataforma GoodGut-Test® <https://goodgut-test.eu/auth/login>.

2. Diagnóstico RAID-Dx

Datos de la muestra

Antes de obtener el diagnóstico se deben introducir las características de la muestra en la plataforma para su correcta identificación. La información necesaria contempla los requisitos para que su análisis sea apto. Se puede introducir esta información siguiendo el manual de usuario de la plataforma GoodGut-Test® (<https://goodgut-test.eu/auth/login>).

Informe de Resultados

Para obtener el diagnóstico RAID-Dx, los resultados obtenidos en el análisis de qPCR multiplex deben ser introducidos en la plataforma GoodGut-Test® (<https://goodgut-test.eu/auth/login>) siguiendo el manual de usuario. Los resultados deben subirse a la Plataforma en un archivo en formato Excel que debe contener el identificador de la muestra, el *dye* y el valor del Ct crudo (Cq). El documento Excel puede descargarse en la plataforma siguiendo el manual de usuario.

En caso de producirse una incidencia, definida como cualquier avería o problema que se haya producido en este Producto Médico *In Vitro*, durante su uso o posteriormente, y que pueda tener graves consecuencias para la salud, por favor contactar con el laboratorio de fabricación: GoodGut S.L.U. e-mail: test@goodgut.eu.



GoodGut SRN: ES-MF-000000229

RAID-Dx qPCR Kit

Irritable Bowel Syndrome Diagnostic qPCR Kit

Basic UDI-DI: 8437023437RAIDDX9Y

UDI de las variantes:

- UDI (Low Profile): (01)08437023437032
- UDI (High Profile): (01)08437023437049

GOODGUT, SLU

CIF/NIF: B55206916

C/Pic de Peguera, 11. 17003 Girona. Tel. +34 972 18 32 20. Cataluña. España.

e-mail: info@goodgut.eu

www.goodgut.eu

REVISION DATE Jul 2022

The information reported in this document may vary due to continuous technological updates.