



RAID-Dx

Irritable Bowel Syndrome Diagnostic qPCR Kit

REF Ref number:

DX-02-1024-01-LP (RAID-Dx qPCR Kit low profile)

DX-02-2024-01-HP (RAID-Dx qPCR Kit high profile)

El Kit de qPCR RAID-Dx (*en inglés* RAID-Dx qPCR Kit) es un dispositivo médico/Producto Sanitario de diagnóstico *In Vitro* de uso profesional de laboratorio (usuario profesional).

Finalidad Prevista

El Kit qPCR 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.

El test de diagnóstico *in vitro* RAID-Dx qPCR Kit se basa en el análisis por qPCR de un panel de microorganismos fecales indicadores tanto de condiciones favorables como desfavorables de la salud intestinal. El panel está compuesto por 9 biomarcadores representantes de diferentes especies, filogrupos, géneros y otros taxones: *Faecalibacterium prausnitzii*, *F. prausnitzii* filogrupo I y *F. prausnitzii* filogrupo II, *Escherichia coli*, *Akkermansia muciniphila*, *Ruminococcus* sp., *Methanobrevibacter smithii*, Bacteroidetes y Eubacterias. El kit de qPCR permite amplificar y cuantificar los fragmentos génicos característicos de los microorganismos mencionados. Los resultados se proporcionan de forma cualitativa y cuantitativa. El producto no es automático. El usuario previsto es un profesional de laboratorio.

Principios de la prueba/test

El Kit de qPCR 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 qPCR RAID-Dx requiere de tres análisis qPCR para cada muestra para poder obtener un diagnóstico. Así pues, el kit qPCR 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 µL (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.

Requisitos para el análisis del RAID-Dx

El kit qPCR 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 III o Roma IV.
- Las muestras de heces deben pertenecer a individuos mayores de 18 años.
- Las muestras de heces deben estar libres de antibióticos durante el mes previo a la deposición.
- Las muestras de heces deben provenir de individuos que no se hayan realizado ninguna colonoscopia el mes anterior.
- Las muestras de heces deben provenir de individuos que no haya sufrido ninguna resección quirúrgica de ninguna parte del tubo digestivo.
- 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.

Contenido del kit

Tabla 1. Componentes incluidos en el Kit qPCR RAID-Dx.

Kit qPCR RAID-Dx (24x3 reacciones 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
	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:	

**Kit qPCR RAID-Dx**

(24x3 reacciones | 20 µL/reacción)

Master Mix multiplex (Contiene: enzimas, *buffer*, 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 *quencher* BHQ1)Sonda DX_3_HEX (contiene el fluorocromo HEX y el *quencher* BHQ1)

Cebador DX_3_f2

Cebador DX_3_r2

Sonda DX_3_ROX (contiene el fluorocromo ROX y el *quencher* 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)

Buffer de rehidratación (1,8 mL)

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 qPCR RAID-Dx.

- Espátula metálica
- Kit de extracción de ADN (para verificar la compatibilidad consulte el Anexo 1)
- Termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 2)
- *Buffer* Tris-HCl pH 8,1 (para la resuspensión de los controles positivos)
- Tubos de microcentrífuga
- Puntas con filtro
- Vórtex
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Centrífuga de spin
- Micropipetas (0,5 – 10 µL, 10 – 100 µL y 100 – 1000 µL)
- Guantes desechables sin polvo



Condiciones de Transporte y Almacenaje

Los kits qPCR 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. Una vez que el kit está en uso, puede almacenarse a temperatura ambiente (2-40°C) y usarse hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta.

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.
- Nota: No existen riesgos determinados para el usuario profesional, salvo los habituales en un laboratorio de análisis.



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 RAID-Dx qPCR Kit se prueba bajo unas especificaciones predeterminadas para



asegurar la actividad, la eficiencia y la sensibilidad. El certificado de análisis se puede encontrar en el área profesional de la página web de GoodGut: <https://professionalarea.goodgut.eu/>.

Información de Reactivos

Tabla 2. Información de los reactivos incluidos en el Kit qPCR 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.
<i>Buffer</i> 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.

Accesorios del Kit qPCR RAID-Dx

Se debe utilizar la plataforma web GoodGut-Test™ (<https://goodgut-test.eu>) para obtener el diagnóstico de RAID-Dx. El acceso a la plataforma se proporciona por separado cuando se



adquiere el producto RAID-Dx qPCR Kit. El manual de usuario se proporciona junto con una DEMO de cómo funciona la plataforma web para usuarios profesionales de laboratorio.

La configuración informática recomendada para el uso de la plataforma web GoodGut-Test™ se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. Configuración informática recomendada para el uso de la plataforma web GoodGut-Test™.

	Para WINDOWS	Para MAC
ESCALA	125%	125%
RESOLUCIÓN DE PANTALLA	1920 x 1080	1920 x 1080
ORIENTACION DE PANTALLA	Horizontal	Horizontal

Se requiere acceso a Internet para utilizar la plataforma web GoodGut-Test™. Se puede utilizar con los navegadores Google Chrome, Google Edge y Mozilla Firefox.

Protocolo del Kit qPCR RAID-Dx

Para obtener los resultados del RAID-Dx debe seguirse este protocolo.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Las muestras fecales deben tratarse dentro de las primeras 48 horas después de la recolección de la muestra. A su llegada, la muestra debe ser homogeneizada con una espátula estéril y luego proceder a la extracción de ADN. Si no se puede realizar la extracción de ADN a la llegada, la muestra se puede congelar a -20°C.

Los resultados obtenidos con el Kit qPCR RAID-Dx solo son fiables cuando se utilizan el kit de extracción de ADN y/o el extractor automático compatibles (para comprobar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

La información de la muestra debe introducirse en la plataforma web GoodGut-Test™ (<https://goodgut-test.eu/>) siguiendo el Manual de Usuario que se facilita al usuario una vez adquirido el Kit qPCR RAID-Dx y en el área profesional de la página web de GoodGut (<https://professionalarea.goodgut.eu/>). La información de la muestra incluye los requisitos que deben cumplirse para ser apta para el análisis y un código de muestra para seguir correctamente su trazabilidad.



PROTOCOLO qPCR

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 µL 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 µL de tampón de rehidratación en cada pocillo.
3. Añadir 2 µL de muestras de ADN en cada microtubo donde se encuentra la mix de la reacción. Añadir 2 µL 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 (para comprobar la compatibilidad, consulte el Anexo 2).
6. Programar el termociclador según lo establecido en la Tabla 4. **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 4. 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' (esta información se proporciona una vez que adquiere el Kit qPCR RAID-Dx y se puede encontrar en el Área Profesional de Sitio web de GoodGut (<https://professionalarea.goodgut.eu/>)).
2. Para obtener el diagnóstico RAID-Dx, los resultados obtenidos en cada uno de los 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 resultados deben subirse a la Plataforma en diferentes archivos en formato Excel específicos de cada multiplex que deben contener el identificador de la muestra, el *dye* y el valor del Ct crudo (Cq). Los modelos Excel pueden descargarse en la plataforma siguiendo el manual de usuario.

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. La plataforma web GoodGut-Test™ informa si los controles positivos se aceptan o se rechazan. Si los controles positivos son rechazados, el análisis de la muestra debe repetirse.

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. La plataforma web GoodGut-Test™ informa si los NTCs se aceptan o se rechazan. Si los NTCs son rechazados, el análisis de la muestra debe repetirse.

Nota: Las 'Especificaciones Técnicas del RAID-Dx' específicas del lote de su kit y el Manual de Usuario de la plataforma web GoodGut-Test™ se proveerán por separado una vez se adquiera el kit y también pueden encontrarse en el área profesional de la página web de GoodGut <https://professionalarea.goodgut.eu/>.



En caso de producirse una incidencia, definida como cualquier avería o problema que se haya producido en este dispositivo médico/producto sanitario *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

Descripción de símbolos:

	Número de referencia o catálogo
	Cantidad de líquido o reactivo que contiene un vial o frasco
	Lea las instrucciones.

RAID-Dx qPCR Kit
Irritable Bowel Syndrome Diagnostic qPCR Kit
GoodGut SRN: ES-MF-000000229

Basic UDI-DI:
8437023437RAIDDX9Y

UDI de las variantes:
- UDI (Low Profile): (01)08437023437032
- UDI (High Profile): (01)08437023437049

GOODGUT, SLU
Parc Científic i Tecnològic UdG
C/Pic de Peguera, 11. Edificio Giroemprèn, 17003, Girona (SPAIN).
www.goodgut.eu

Tel. +34 972 18 32 20
CIF/NIF: B55206916
e-mail: info@goodgut.eu

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



ANEXO 1: COMPATIBILIDAD DE LOS KITS DE EXTRACCIÓN Y EQUIPAMIENTO AUTOMATIZADO

El Kit de extracción de ADN y los extractores automáticos que se puede utilizar para obtener diagnósticos fiables con RAID-Dx son los siguientes:

Kit de extracción de ADN DNeasy Powersoil Pro de Qiagen (**extracción manual**)

- Referencia del Kit: 47014, QIAGEN
- Proceda siguiendo las instrucciones del fabricante. **Nota:** en lugar de usar 250-500 mg de suelo en el Paso 1, pese alrededor de 50 mg de heces.

QIAcube de Qiagen (**extractor automático**)

- Utilice el kit de extracción de ADN DNeasy Powersoil Pro de Qiagen con el extractor automático QIAcube Connect de Qiagen.
- Proceda siguiendo las instrucciones del fabricante. **Nota:** en lugar de usar 250-500 mg de suelo en el Paso 1, pese alrededor de 50 mg de heces.



ANEXO 2: COMPATIBILIDAD DEL EQUIPO DE PCR EN TIEMPO REAL

Las tiras de perfil bajo se pueden utilizar en todos los termocicladores de qPCR equipados con un bloque de perfil bajo que se enumeran a continuación.

AriaDx (Agilent Technologies)

- El análisis de las muestras se realiza con el software incluido en el equipo de PCR en tiempo real y según las instrucciones de uso del fabricante.
- Antes de realizar el análisis de datos, seleccione la configuración de análisis preestablecida para cada conjunto de *primers + sonda* (p.e., configuración de referencia y valores de *threshold*) de acuerdo con las 'Especificaciones técnicas del kit qPCR RAID-Dx '.

CFX96 (BioRad)

- El análisis de las muestras se realiza con el software incluido en el equipo de PCR en tiempo real y según las instrucciones de uso del fabricante.
- Especificaciones para analizar los resultados utilizando el software CFX96:
 - Seleccione BR White en tipo de placa.
 - Aplicar la corrección *fluorescence drift*.
- Antes de realizar el análisis de datos, seleccione la configuración de análisis preestablecida para cada conjunto de *primers + sonda* (p.e., configuración de referencia y valores de *threshold*) de acuerdo con las 'Especificaciones técnicas del kit qPCR RAID-Dx'.

Nota importante: Las 'Especificaciones Técnicas RAID-Dx' específicas por lote se proporcionan por separado al adquirir el kit y también se encuentran en el área Profesional de la página web de GoodGut <https://professionalarea.goodgut.eu/>.