

RAID-CRC Screen qPCR Kit Colorectal Cancer Screening qPCR Kit

INSTRUCCIONES DE USO

Número de referencia: **REF**

RAID-CRC Screen qPCR Kit: CRC-01-1250-01

El **RAID-CRC Screen qPCR Kit** es un dispositivo de diagnóstico *in vitro* (producto sanitario *in vitro*) de uso profesional de laboratorio (usuario profesional).

Finalidad prevista

El Kit de qPCR RAID-CRC Screen está dirigido 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), mediante la detección de marcadores bacterianos en el ADN extraído de muestras de heces de los pacientes.

El test de diagnóstico *in vitro* RAID-CRC Screen qPCR kit se basa en el análisis mediante qPCR de un panel de bacterias fecales indicadoras tanto de condiciones favorables como desfavorables de la salud intestinal. El panel se utiliza en individuos asintomáticos de entre 50 y 69 años, ambos incluidos, para descartar la presencia de neoplasia avanzada, incluyendo lesiones precancerosas y cáncer colorrectal. El kit de qPCR RAID-CRC Screen qPCR kit se basa en la tecnología patentada que detecta una combinación de 6 marcadores bacterianos analizados en muestras fecales: *B46*, *B48*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Gemella morbillorum*, *Bacteroides fragilis* y *Eubacteria*. 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. **Este producto no es automatizado. El usuario previsto es un profesional de laboratorio.**

Principios de la prueba/test

El RAID-CRC Screen qPCR kit ha sido optimizado mediante el análisis de PCRs multiplex cuantitativas (qPCR) 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 RAID-CRC Screen qPCR kit requiere realizar tres análisis qPCR por muestra para poder obtener un diagnóstico. Se pueden realizar un total de 250x3 reacciones con cada kit. La master mix se proporciona lista para ser utilizada, en una formulación 4X que incluye todos los componentes para llevar a cabo la qPCR. Los cebadores y las sondas se proporcionan liofilizados en viales separados. También se proporcionan 3 controles positivos, en tubos separados, que permiten comprobar la correcta realización de cada análisis qPCR.

Requisitos para el análisis del RAID-CRC

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

- Las muestras de heces deben provenir de individuos asintomáticos de entre 50 y 69 años, ambos incluidos (población de riesgo intermedio de sufrir cáncer colorrectal).

- 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 tracto digestivo.
- No se aceptan muestras de heces de mujeres embarazadas.
- El test solo debe ser aplicado cuando el paciente obtiene un resultado positivo del FIT (punto de corte de 100 ng de hemoglobina por mL utilizando el tubo colector de Eiken Chemical).
Nota: En el caso de utilizar otro punto de corte del FIT, por favor póngase en contacto con el fabricante (support@goodgut.eu).
- La determinación del FIT debe realizarse con cualquier equipo específico para esta función del fabricante Eiken Chemical y las unidades del FIT deben expresarse en ng de hemoglobina por mL.
- Las muestras de heces deben procesarse dentro de las primeras 48 horas después de su recogida. Durante este periodo, se debe recoger una muestra de heces con el colector del FIT de Eiken Chemical. Si no es posible recoger la muestra con el colector FIT en las primeras 48 horas, se deberá congelar la muestra hasta que se pueda proceder con su recolección.
- Una vez recogida la muestra con el colector del FIT (Eiken Chemical), se debe almacenar entre 2°C y 8°C hasta el momento de su determinación.
- Después de la determinación del FIT, se deberá proceder con la extracción de ADN.
Nota: El tubo colector del FIT (Eiken Chemical) debe almacenarse entre 2°C y 8°C hasta el momento de la extracción. La extracción de ADN debe realizarse dentro de los primeros 18 días después de la recogida de la muestra con este colector. Si no es posible realizar la extracción dentro de los primeros 18 días, se deberá congelar el tubo colector FIT a -20°C hasta el día del análisis, después de haber estado como mínimo 48 horas entre 2°C y 8°C.
- Para la extracción del ADN, como la muestra de heces está diluida en la solución del colector FIT, se debe realizar una preparación preliminar siguiendo los siguientes pasos:
 1. Homogenizar el colector FIT mediante varias inversiones manuales.
 2. Transferir el contenido del colector FIT en un tubo de 1,5 mL (esperar entre 1 mL y 1,5 mL).
 3. Centrifugar los tubos de 1,5 mL durante 10 minutos a 4.000 xG.
 4. Eliminar el sobrenadante (esperar quedarse entre 100 µL y 200 µL del volumen inicial).
 5. Homogeneizar el pellet pipeteando.
 6. Transferir el pellet dentro de los tubos con bolitas proporcionado en el Kit DNeasy Powersoil Pro-Kit y proseguir siguiendo las instrucciones del fabricante.
Nota: en lugar de utilizar 250 mg de tierra en el paso 1, introducir el volumen resuspendido del fluido del colector FIT.
- Una vez realizada la extracción de ADN se puede proceder con la qPCR o puede almacenarse el ADN a -20°C hasta el momento de su análisis.

Estos requisitos son necesarios para que los resultados de los análisis se encuentren entre los intervalos de referencia establecidos para el diagnóstico del cáncer colorrectal usando el RAID-CRC Screen qPCR kit

Contenido del kit

Tabla 1. Componentes incluidos en el RAID-CRC Screen qPCR Kit e información de reactivos.

RAID-CRC Screen Kit (250 reacciones x3 10 µL/reacción)	
Multiplex Master Mix 4X (Contiene: Taq DNA Polimerasa, Anticuerpos, Guard, Tampón, mix de dNTP [dATP, dCTP, dGTP, dTTP])	3 x 625 µL

RAID-CRC Screen Kit (250 reacciones x3 10 µL/reacción)	
Cebador SCR_A_f1	80 µL*
Cebador SCR_A_r1	80 µL*
Sonda SCR_A_FAM (contiene el fluorocromo FAM y el <i>quencher</i> BHQ1)	120 µL*
Cebador SCR_A_f2	180 µL*
Cebador SCR_A_r2	180 µL*
Sonda SCR_A_HEX (contiene el fluorocromo HEX y el <i>quencher</i> BHQ1)	80 µL*
Cebador SCR_A_f3	180 µL*
Cebador SCR_A_r3	180 µL*
Sonda SCR_A_ROX (contiene el fluorocromo ROX y el <i>quencher</i> BHQ2)	100 µL*
Cebador SCR_B_f1	180 µL*
Cebador SCR_B_r1	180 µL*
Sonda SCR_B_HEX (contiene el fluorocromo HEX y el <i>quencher</i> BHQ1)	80 µL*
Cebador SCR_B_f2	160 µL*
Cebador SCR_B_r2	160 µL*
Sonda SCR_B_CY5 (contiene el fluorocromo CY5 y el <i>quencher</i> BHQ2)	120 µL*
Cebador SCR_C_f1	180 µL*
Cebador SCR_C_r1	180 µL*
Sonda SCR_C_FAM (contiene el fluorocromo FAM y el <i>quencher</i> BHQ1)	160 µL*
Control Positivo A (contiene una mezcla de los productos de la amplificación de la qPCR SCR_A)	185 µL
Control Positivo B (contiene una mezcla de los productos de la amplificación de la qPCR SCR_B)	185 µL
Control Positivo C (contiene una mezcla de los productos de la amplificación de la qPCR SCR_C)	185 µL
Agua RNase-free	3 x 1,9 mL

* Volumen indicado para resuspender el oligonucleótido liofilizado con Tris-HCl pH 8.0 y obtener una concentración de 2,5 µM para los tubos del marcador 1 de la multiplex SCR_A y 5,0 µM para el resto de los marcadores.

Reactivos, materiales y equipos no provistos en el kit

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

- Tubo Colector FIT de Eiken Chemical
- Kit de extracción de ADN (para verificar la compatibilidad consulte el Anexo 1)
- Termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 2)
- Tampón Tris-HCl pH 8,0 (para la resuspensión de los oligonucleótidos).
- Tubos de microcentrífuga
- Tiras de tubos para PCR o qPCR y tapas ópticas de tiras de tubos (8 x tira)
- Puntas con filtro
- Cabina de bioseguridad

- Vórtex
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Micropipetas (0,5 – 10 µL, 10 – 100 µL y 100 – 1000 µL)
- Guantes desechables sin polvo

Condiciones de transporte y almacenamiento

Los RAID-CRC Screen qPCR kit son enviados en condiciones de frío (2-8°C). A su llegada, la master mix y los controles positivos deben almacenarse entre -30°C y -15°C en un congelador de temperatura constante y protegidos de la luz. Los reactivos incluidos en el RAID-CRC qPCR Kit se pueden congelar y descongelar hasta 10 veces, si se considera que se realizarán más descongelaciones, se recomienda realizar varias alícuotas de cada reactivo. Los cebadores y las sondas liofilizadas pueden almacenarse a temperatura ambiente hasta ser resuspendidos en tampón Tris-HCl pH 8,0. Una vez resuspendidos deben almacenarse entre -30°C y -15°C en un congelador de temperatura constante y protegidos de la luz.

Estabilidad en uso

Condiciones de almacenamiento: Entre -30°C y -15°C, ver apartado condiciones de transporte y almacenamiento.

Vida útil después de abrir el envase/envase primario: se debe considerar lo indicado en el envase. Tras abrir el envase de master mix, los controles positivos y los oligonucleótidos, se mantiene la estabilidad del producto hasta la fecha de vencimiento indicada en el empaque si el producto se almacena entre -30°C y -15°C. Fuera de este rango de temperatura, el producto puede permanecer un máximo de 24 horas a 4°C sin alterar sus especificaciones.

Ciclos de congelación y descongelación alícuotas de controles positivos: ver condiciones de transporte y almacenamiento.

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.

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



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

Información sobre sustancias interferentes:

Ver sección de requisitos para el análisis del RAID-CRC en la página 1.

Control de calidad

De acuerdo con el Sistema de Gestión de Calidad de GoodGut (certificado con la ISO13485), cada lote del RAID-CRC Screen 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-CRC Screen.

Componente	Descripción
Multiplex Master Mix 4X	Contiene ADN Polimerasa, tampón qPCR Multiplex y Mix dNTP.
ADN Polimerasa	La ADN polimerasa es una forma modificada de una ADN polimerasa recombinante de 94 kDa aislada de <i>Thermus aquaticus</i> . La ADN polimerasa se proporciona en un estado inactivo y sin actividad enzimática a temperatura ambiente. La enzima se activa incubándola 1 minuto a 95°C.
Tampón qPCR Multiplex	Contiene Tris-HCl, KCl, NH ₄ Cl, MgCl ₂ y aditivos que promueven ciclos rápidos.
Mix dNTP	Contiene dATP, dCTP, dGTP y dTTP de calidad ultrapura.
Cebadores (forward y reverse)	Contiene 6 juegos de cebadores purificados mediante HPLC.
Sondas	Contiene 6 sondas purificadas utilizando HPLC.
Controles positivos SCR	Cada uno contiene una mezcla diferente de productos de amplificación de qPCR dependiendo del ensayo qPCR a realizar. Pasan por un proceso de control exhaustivo que incluye la verificación de la medida por electroforesis capilar y la identificación de la secuencia por espectrometría de masas.

Limitaciones de uso:

Los reactivos de este kit están diseñados para funcionar en su totalidad con el presente kit de qPCR. **No se recomienda usarlo para otras pruebas.** Estos reactivos son aptos para los siguientes instrumentos, *ver anexo 2*.

Hasta el momento, no se ha detectado que el producto contenga otros componentes que puedan influir en las mediciones.

Accesorios del RAID-CRC Screen qPCR Kit

Se debe utilizar la plataforma web GoodGut-Test™ (<https://goodgut-test.eu>) para obtener el diagnóstico de RAID-CRC Screen. El acceso a la plataforma se proporciona por separado cuando se adquiere el producto RAID-CRC Screen qPCR kit. El manual de usuario se proporciona junto con una DEMO de cómo funciona la plataforma web para usuarios profesionales de laboratorio. Sino la ha recibido, por favor comunicarse con support@goodgut.eu.

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
Orientación 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.

Procedimiento de medición de referencia

Para asegurar el correcto rendimiento del RAID-CRC Screen qPCR kit, se incluyen controles positivos de concentración conocida. Los controles positivos deben agregarse en cada ejecución del ensayo de qPCR multiplex (como se detalla en el apartado protocolo del RAID-CRC Screen qPCR kit, página 8). Además, se requiere un control sin ADN molde o control negativo (NTC) para garantizar que la ejecución del ensayo de qPCR multiplex no esté contaminado.

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 de RAID-CRC Screen'. 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.

El rango de tolerancias de los controles positivos está disponible para todos los clientes en las especificaciones técnicas del RAID-CRC Screen qPCR kit específicas para cada lote que se proporcionan en el momento de la compra. Las especificaciones técnicas también se pueden encontrar en el área profesional de la página web de GoodGut: <https://professionalarea.goodgut.eu/>.

Control sin ADN molde (NTC)

El control sin ADN molde o control negativo (NTC) se utiliza para asegurar que la mix de la reacción no está contaminada. Para cada lote de RAID-CRC Screen qPCR kit se define un valor límite específico.

Una vez se lleve a cabo el análisis e interpretación de los resultados, el valor de Ct obtenido en el NTC debe ser superior al valor límite establecido por lote. Cuando el valor de Ct del NTC es inferior al valor límite establecido, 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.

El valor límite de los NTCs está disponible para todos los clientes en las especificaciones técnicas del RAID-CRC Screen qPCR kit específicas para cada lote que se proporcionan en el momento de la compra. Las especificaciones técnicas también se pueden encontrar en el área profesional de la página web de GoodGut: <https://professionalarea.goodgut.eu/>.

Protocolo del RAID-CRC Screen qPCR Kit

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

- **Tratamiento de la muestra**

Las muestras fecales deben procesarse dentro de las primeras 48 horas después de la recolección de la muestra o congelarlas hasta que sea posible su procesamiento. A su llegada, se debe recoger muestra con el colector del FIT de Eiken Chemical y guardarla entre 2°C y 8°C. Al cabo de un mínimo de 48 horas se analiza el valor del FIT. Una vez se conoce el valor del FIT se puede extraer el ADN, pudiendo pasar hasta 18 días entre la recogida de muestra con el tubo colector del FIT y la extracción, siempre y cuando la muestra sea almacenada entre 2°C y 8°C. El tubo colector FIT puede congelarse a -20°C, después de haber estado mínimo 48 horas entre 2°C y 8°C, hasta proceder a la extracción del ADN si es necesario exceder los 18 días.

El ADN extraído se debe conservar a -20°C hasta el día del análisis mediante qPCR. Una vez utilizada la muestra de ADN, se puede congelar de nuevo a -20°C. La muestra de ADN puede ser descongelada y congelada un máximo de 5 veces.

Los resultados obtenidos con el RAID-CRC Screen qPCR Kit solo son fiables cuando se utilizan los kits de extracción de ADN y/o los extractores automáticos 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 RAID-CRC Screen qPCR Kit 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 cantidad de cebadores/sondas y muestra, 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, se deben resuspender los cebadores y las sondas con el volumen de Tris-HCl pH 8,0 indicado en el protocolo (sección de Contenidos del Kit).

Nota: para una resuspensión óptima de los cebadores y las sondas, después de añadir el tampón Tris-HCl, incubar los tubos a temperatura ambiente durante 1 hora o toda la noche a 4°C sin cambiarlos de recipiente. Una vez resuspendidos deben ser almacenados entre -30°C y -15°C en un congelador que mantenga una temperatura constante y protegidos de la luz.

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).

1. Determinar y separar el número de tiras de tubos y tapones/tubos necesarios para realizar las reacciones requeridas teniendo en cuenta las muestras y los controles de cada análisis de qPCR (material no incluido en el RAID-CRC Screen qPCR 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.

Análisis qPCR multiplex Screen A:

3. Añadir los siguientes componentes en un tubo de microcentrifuga (Tabla 4). 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 del número de reacciones que pueden realizarse en el termociclador.

Tabla 4. Mix de la reacción para realizar el análisis de la qPCR multiplex RAID-CRC Screen A (por reacción).

Componente	Concentración final	Volumen/reacción
Multiplex Master Mix 4X	1X	2,50 µL
Cebador SCR_A_f1	50 nM	0,20 µL
Cebador SCR_A_r1	50 nM	0,20 µL
Sonda SCR_A_FAM	60 nM	0,24 µL
Cebador SCR_A_f2	300 nM	0,60 µL
Cebador SCR_A_r2	300 nM	0,60 µL

Componente	Concentración final	Volumen/reacción
Sonda SCR_A_HEX	100 nM	0,20 µL
Cebador SCR_A_f3	300 nM	0,60 µL
Cebador SCR_A_r3	300 nM	0,60 µL
Sonda SCR_A_ROX	150 nM	0,30 µL
Agua RNase-free	-	1,96 µL

- Mezclar la reacción vigorosamente y centrifugarla brevemente. Dispensar 8 µL en los tubos qPCR recomendados por el fabricante del termociclador a utilizar.
- Añadir 2 µL de muestras de ADN en los tubos qPCR que contienen la mix de la reacción. Además, añadir también 2 µL del control positivo específico para el análisis qPCR multiplex Screen A al tubo reservado para este control y dejar un tubo solo con la mix de la reacción como control negativo NTC. Cerrar los tubos con los tapones correspondientes.

Análisis qPCR multiplex Screen B:

- Añadir los siguientes componentes en un tubo de microcentrifuga (Tabla 5). 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 del número de reacciones que pueden realizarse en el termociclador.

Tabla 5. Mix de la reacción para realizar el análisis de la qPCR multiplex RAID-CRC Screen B (por reacción).

Componente	Concentración final	Volumen/reacción
Multiplex Master Mix 4X	1X	2,50 µL
Cebador SCR_B_f1	300 nM	0,60 µL
Cebador SCR_B_r1	300 nM	0,60 µL
Sonda SCR_B_HEX	100 nM	0,20 µL
Cebador SCR_B_f2	250 nM	0,50 µL
Cebador SCR_B_r2	250 nM	0,50 µL
Sonda SCR_B_CY5	200 nM	0,40 µL
Agua RNase-free	-	2,70 µL
Volumen total reacción		8 µL

- Mezclar la reacción vigorosamente y centrifugarla brevemente. Dispensar 8 µL en los tubos qPCR recomendados por el fabricante del termociclador a utilizar.
- Añadir 2 µL de muestras de ADN en los tubos qPCR que contienen la mix de la reacción. Además, añadir también 2 µL del control positivo específico para el análisis qPCR multiplex Screen B al tubo reservado para este control y dejar un tubo solo con la mix de la reacción como control negativo NTC. Cerrar los tubos con los tapones correspondientes.

Análisis qPCR multiplex Screen C:

9. Añadir los siguientes componentes en un tubo de microcentrifuga (Tabla 6). Se recomienda preparar un volumen de Mix de $n \times 1,1$ (donde n es el número de reacciones), para minimizar el 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 del número de reacciones que pueden realizarse en el termociclador.

Tabla 6. Mix de la reacción para realizar el análisis de la qPCR multiplex de RAID-CRC Screen C (por reacción).

Componente	Concentración Final	Volumen/reacción
Multiplex Master Mix 4X	1X	2,50 μ L
Cebador SCR_C_f1	300 nM	0,60 μ L
Cebador SCR_C_r1	300 nM	0,60 μ L
Sonda SCR_C_FAM	250 nM	0,50 μ L
Agua RNase-free	-	3,80 μ L
Volumen total reacción		8 μL

10. Mezclar la reacción vigorosamente y centrifugarla brevemente. Dispensar 8 μ L en los tubos qPCR recomendados por el fabricante del termociclador a utilizar.
11. Añadir 2 μ L de muestras de ADN en los tubos qPCR que contienen la mix de la reacción. Además, añadir también 2 μ L del control positivo específico para el análisis qPCR multiplex Screen C al tubo reservado para este control y dejar un tubo solo con la mix de la reacción como control negativo NTC. Cerrar los tubos con los tapones correspondientes.
12. Programar el termociclador según el programa de la Tabla 7, 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.

Tabla 7. Protocolo del termociclador para los análisis de las qPCR multiplex/singleplex RAID-CRC Screen.

Paso		Tiempo (min:s)	Temperatura ($^{\circ}$ C)
Activación de la qPCR		01:00	95
40 ciclos	Desnaturalización	00:15	95
	Unión + Elongación	00:30	60

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

Nota: todas las muestras y los controles del mismo tipo de análisis qPCR (Screen A o Screen B o Screen C) deben ser analizados en el mismo run de qPCR. En caso de utilizar más de un termociclador para el análisis de una muestra (por ejemplo: Screen A analizado en el termociclador 1 y Screen B en el termociclador 2) asegurarse de utilizar el mismo modelo.

- **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 juego de cebadores + sonda (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 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.

Para cualquier consulta de soporte técnico u opinión, por favor contacte con support@goodgut.eu

En caso de producirse un incidente, definido como cualquier avería o problema que se haya producido en este Dispositivo Médico *In Vitro* (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: vigilance@goodgut.eu y/o la autoridad competente donde esté establecido el usuario y/o paciente.

Descripción de símbolos:

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

RAID-CRC Screen qPCR Kit
Colorectal Cancer Screening qPCR Kit
Basic UDI-DI: 8437023437RAIDCRCKC

La información provista en este documento puede variar debido a las continuas actualizaciones tecnológicas.

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-CRC Screen son los siguientes:

Kit de extracción de ADN DNeasy Powersoil Pro de Qiagen ([extracción manual](#))

- Referencia del Kit: 47014, QIAGEN
- Antes de empezar con la extracción de ADN se deben seguir las siguientes indicaciones con las muestras a tratar:
 1. Homogenizar el colector FIT mediante varias inversiones manuales.
 2. Transferir el contenido del colector FIT en un tubo de 1,5 mL (esperar entre 1 mL y 1,5 mL).
 3. Centrifugar los tubos de 1,5 mL durante 10 minutos a 4.000 xG.
 4. Eliminar el sobrenadante (esperar quedarse entre 100 µL y 200 µL del volumen inicial).
 5. Homogeneizar el pellet pipeteando.
 6. Transferir el pellet dentro de los tubos con bolitas proporcionado en el Kit DNeasy Powersoil Pro-Kit y proseguir siguiendo las instrucciones del fabricante.

Nota: en lugar de utilizar 250 mg de tierra en el paso 1, introducir el volumen resuspendido del fluido del colector FIT.

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.
- Antes de empezar con la extracción de ADN se deben seguir las siguientes indicaciones con las muestras a tratar:
 1. Homogenizar el colector FIT mediante varias inversiones manuales.
 2. Transferir el contenido del colector FIT en un tubo de 1,5 mL (esperar entre 1 mL y 1,5 mL).
 3. Centrifugar los tubos de 1,5 mL durante 10 minutos a 4.000 xG.
 4. Eliminar el sobrenadante (esperar quedarse entre 100 µL y 200 µL del volumen inicial).
 5. Homogeneizar el pellet pipeteando.
 6. Transferir el pellet dentro de los tubos con bolitas proporcionado en el Kit DNeasy Powersoil Pro-Kit y proseguir siguiendo las instrucciones del fabricante.

Nota: en lugar de utilizar 250 mg de tierra en el paso 1, introducir el volumen resuspendido del fluido del colector FIT.

ANEXO 2: Compatibilidad del equipo de PCR en tiempo real

Las multiplex/singleplex de RAID-CRC Screen se puede realizar 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-CRC Screen".

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 correction*.
- 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-CRC Screen'.