TestUrGut qPCR Kit

Intestinal Dysbiosis qPCR Kit

INSTRUCCIONES DE USO

Número de referencia REF

TestUrGut qPCR Kit: TUG-01-1025

El **kit de qPCR TestUrGut** (en inglés TestUrGut qPCR kit) es un dispositivo de diagnóstico *in vitro* para el uso del profesional de laboratorio (usuario profesional).

Finalidad prevista

El TestUrGut qPCR kit diagnostica la disbiosis intestinal mediante la detección por qPCR de marcadores microbianos específicos en muestras de heces.

La prueba permite conocer la salud intestinal del paciente y diagnosticar la disbiosis intestinal. El panel de marcadores incluidos en el TestUrGut qPCR kit está compuesto por 15 marcadores microbianos pertenecientes a diferentes grupos funcionales (proteolítico, equilibrio, inmunoprotector, muconutritivo, proinflamatorio, metanogénico y levaduras). Están representados por los siguientes grupos microbianos: Eubacteria, *Escherichia coli, Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus* spp., *Akkermansia muciniphila, Methanobrevibacter smithii, Clostridium* cluster I, *Enterococcus* sp., *Roseburia* sp., *Clostridium* cluster XIV, Gammaproteobacteria, *Lactobacillus* sp., Bacillota, Bacteroidota y *Candida albicans*. El TestUrGut qPCR kit permite amplificar y cuantificar los fragmentos génicos característicos de los microorganismos mencionados. Los resultados se proporcionan de forma cuantitativa mediante un informe de fácil interpretación. **El producto no es automático. El usuario previsto es el profesional de laboratorio.**

Principios de la prueba/test

El TestUrGut qPCR kit ha sido optimizado mediante el uso de qPCRs multiplexs y utilizando cebadores y sondas fluorescentes. El kit de qPCR resultante es una herramienta de fácil uso que ofrece resultados reproducibles con elevada sensibilidad y 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 qPCR.

El TestUrGut qPCR kit permite realizar el análisis de 6 combinaciones multiplex por muestra, necesarias para poder obtener un diagnóstico. Cada kit permite realizar un total de 24 reacciones de cada una de las 6 multiplex. En el kit se proporcionan 6 tubos en solución (de ahora en adelante, megamix), cada uno con los reactivos necesarios para analizar cada una de las 6 multiplex (cebadores, sondas, master mix, agua libre de RNasas), listos para ser utilizados. También se proporcionan 6 tubos con los controles positivos listos para ser utilizados, que permiten comprobar la correcta realización de cada análisis de qPCR.

Requisitos para el análisis del TestUrGut

El TestUrGut qPCR kit ha sido optimizado para realizar la cuantificación de los marcadores incluidos en el panel microbiano TestUrGut a partir del ADN extraído de muestras de heces. Para que el análisis sea apto deben cumplirse los siguientes requisitos:

- Las muestras de heces deben pertenecer a individuos mayores de edad (≥ 18 años).
- Las muestras de heces deben estar libres de antibióticos durante el mes previo a la deposición.

- Las muestras de heces deben pertenecer a individuos que no se hayan realizado una colonoscopia el mes anterior a la deposición.
- Las muestras de heces deben proceder de individuos que no hayan sufrido ninguna resección quirúrgica del tubo digestivo.
- No apto para mujeres embarazadas.
- No apto para personas diagnosticadas de enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.
- No se recomienda realizar la prueba durante la menstruación.
- Las muestras de heces deben ser tratadas dentro de las primeras 48 horas después de su deposición si no son congeladas antes.

Nota: *tras su recepción, la muestra debe ser homogeneizada utilizando una espátula estéril y seguidamente se debe proceder a la extracción del ADN. Si la extracción de ADN no puede realizarse al recibir la muestra, esta debe ser congelada a -20ºC/-80ºC.*

Contenido del kit

El TestUrGut qPCR kit contiene 6 tubos de megamix, 6 tubos con los controles positivos y un folleto con el Protocolo de inicio rápido. La tabla con los componentes incluidos en el TestUrGut qPCR Kit se encuentra en el Anexo 1.

Reactivos, materiales y equipos no provistos

La siguiente lista incluye los reactivos, materiales y equipos que son necesarios para el análisis del TestUrGut que no están incluidos en el TestUrGut qPCR kit:

- Espátula estéril o de un solo uso
- Kit de extracción de ADN (para verificar la compatibilidad consulte el Anexo 2)
- Termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 3)
- Tubos de microcentrífuga
- Tiras de tubos para PCR o qPCR y tapas ópticas de tiras de tubos (8 x tira)
- Puntas con filtro
- Agitador vórtex
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Micropipetas (0,5 – 10 µL, 10 – 100 µL y 100 – 1000 µL)
- Guantes desechables sin polvo
- Centrífuga de tiras de tubos

Condiciones de transporte y almacenaje

Los TestUrGut qPCR kit son enviados en refrigeración (2-8ºC). A su llegada los reactivos deben almacenarse entre -15ºC y -30ºC en un congelador de temperatura constante y protegidos de la luz. Los reactivos se pueden congelar y descongelar hasta 10 veces. Si se considera que se realizarán más descongelaciones se recomienda preparar varias alícuotas de cada reactivo. Una vez abierto el kit debe almacenarse de -30ºC a -15ºC y puede utilizarse hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta.

Estabilidad en uso

Condiciones de almacenamiento: de -30ºC a -15ºC, *ver la sección de condiciones de transporte y almacenaje.*

Vida útil después de abrir los reactivos: ver lo que indica el envase de cada uno de los reactivos incluidos (megamix y controles positivos). Tras abrirlos se mantiene su estabilidad hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta, siempre y cuando el producto se almacene de -30ºC a -15ºC. Fuera de este rango de temperatura, el producto puede permanecer un máximo de 24 horas entre 2ºC y 8ºC sin alterar sus especificaciones.

Condiciones durante su uso: los reactivos incluidos en el kit pueden mantenerse un máximo de 48 horas entre 2-8ºC durante su uso.

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

Información de seguridad

- Solo para uso profesional (únicamente para usuarios profesionales).
- No usar una vez superada 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 un contenedor para residuos biológicos.
- Se recomienda una descontaminación regular de los equipos con los que se trabaja, especialmente de las micropipetas y de 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 TestUrGut qPCR Kit 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 TestUrGut qPCR kit se prueba bajo unas especificaciones predeterminadas para asegurar la actividad, la eficiencia y la sensibilidad. El certificado de calidad se puede encontrar en el área profesional de la página web de GoodGut: https://professionalarea.goodgut.eu/.

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 3.

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

Accesorios del TestUrGut qPCR kit

Se debe utilizar la plataforma web GoodGut-Test™ (https://goodgut-test.eu) para obtener el diagnóstico de TestUrGut. El acceso a la plataforma se proporciona por separado cuando se adquiere el producto TestUrGut qPCR kit. El manual de usuario se proporciona junto con una DEMO de cómo funciona la plataforma web para usuarios profesionales de laboratorio. Si no 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 1.

Tabla 1. 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 TestUrGut 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 TestUrGut qPCR kit, página 6). 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 TestUrGut'. 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 NTC se utiliza para asegurar que la megamix de la reacción no está contaminada. Una vez establecidos los parámetros de análisis, el *Ct* obtenido en el NTC debe ser superior al valor limite aceptado establecido en las 'Especificaciones Técnicas de TestUrGut'. 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 NTC se aceptan o se rechazan. Si los NTC son rechazados, el análisis de la muestra debe repetirse.

***Nota:** Las especificaciones técnicas de TestUrGut 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/.*

Información de reactivos

Tabla 2. Información de los reactivos incluidos en el TestUrGut qPCR kit.

Componente	Descripción
Megamix TUG_1	
Master mix	El ADN polimerasa es una forma modificada de una ADN polimerasa recombinante de 94 kDa aislada de *Thermus aquaticus*. La ADN polimerasa se proporciona en un estado inactivo y sin actividad enzimática a temperatura ambiente. La enzima se activa incubándola 1 minuto a 95ºC. Contiene Tris-HCl, KCl, NH_4Cl, $MgCl_2$ y aditivos que promueven ciclos rápidos. Contiene dATP, dCTP, dGTP y dTTP de calidad ultrapura.
Agua libre de RNasas	Agua destilada sin RNasa para uso en biología molecular.

Componente	Descripción
Cebadores (*forward* y *reverse*)	Contiene 3 juegos de cebadores purificados mediante *desalting* precargados en el tubo de TestUrGut Multiplex 1.
Sondas	Contiene 3 sondas purificadas utilizando HPLC precargadas en el tubo de TestUrGut Multiplex 1.
Megamix TUG_2	
Master mix	El ADN polimerasa es una forma modificada de una ADN polimerasa recombinante de 94 kDa aislada de *Thermus aquaticus*. La ADN polimerasa se proporciona en un estado inactivo y sin actividad enzimática a temperatura ambiente. La enzima se activa incubándola 1 minuto a 95ºC. Contiene Tris-HCl, KCl, NH_4Cl, $MgCl_2$ y aditivos que promueven ciclos rápidos. Contiene dATP, dCTP, dGTP y dTTP de calidad ultrapura.
Agua libre de RNasas	Agua destilada sin RNasa para uso en biología molecular.
Cebadores (*forward* y *reverse*)	Contiene 3 juegos de cebadores purificados mediante *desalting* precargados en el tubo de TestUrGut Multiplex 2.
Sondas	Contiene 3 sondas purificadas utilizando HPLC precargadas en el tubo de TestUrGut Multiplex 2.
Megamix TUG_3	
Master mix	El ADN polimerasa es una forma modificada de una ADN polimerasa recombinante de 94 kDa aislada de *Thermus aquaticus*. La ADN polimerasa se proporciona en un estado inactivo y sin actividad enzimática a temperatura ambiente. La enzima se activa incubándola 1 minuto a 95ºC. Contiene Tris-HCl, KCl, NH_4Cl, $MgCl_2$ y aditivos que promueven ciclos rápidos. Contiene dATP, dCTP, dGTP y dTTP de calidad ultrapura.
Agua libre de RNasas	Agua destilada sin RNasa para uso en biología molecular.
Cebadores (*forward* y *reverse*)	Contiene 3 juegos de cebadores purificados mediante *desalting* precargados en el tubo de TestUrGut Multiplex 3.
Sondas	Contiene 3 sondas purificadas utilizando HPLC precargadas en el tubo de TestUrGut Multiplex 3.
Megamix TUG_4	
Master mix	El ADN polimerasa es una forma modificada de una ADN polimerasa recombinante de 94 kDa aislada de *Thermus aquaticus*. La ADN polimerasa se proporciona en un estado inactivo y sin actividad enzimática a temperatura ambiente. La enzima se activa incubándola 1 minuto a 95ºC. Contiene Tris-HCl, KCl, NH_4Cl, $MgCl_2$ y aditivos que promueven ciclos rápidos. Contiene dATP, dCTP, dGTP y dTTP de calidad ultrapura.
Agua libre de RNasas	Agua destilada sin RNasa para uso en biología molecular.
Cebadores (*forward* y *reverse*)	Contiene 2 juegos de cebadores purificados mediante *desalting* precargados en el tubo de TestUrGut Multiplex 4.
Sondas	Contiene 2 sondas purificadas utilizando HPLC precargadas en el tubo de TestUrGut Multiplex 4.
Megamix TUG_5	
Master mix	El ADN polimerasa es una forma modificada de una ADN polimerasa recombinante de 94 kDa aislada de *Thermus aquaticus*. La ADN polimerasa se proporciona en un estado inactivo y sin actividad enzimática a temperatura ambiente. La enzima se activa

Componente	Descripción
	incubándola 1 minuto a 95ºC. Contiene Tris-HCl, KCl, NH_4Cl, $MgCl_2$ y aditivos que promueven ciclos rápidos. Contiene dATP, dCTP, dGTP y dTTP de calidad ultrapura.
Agua libre de RNasas	Agua destilada sin RNasa para uso en biología molecular.
Cebadores (*forward* y *reverse*)	Contiene 2 juegos de cebadores purificados mediante *desalting* precargados en el tubo de TestUrGut Multiplex 5.
Sondas	Contiene 2 sondas purificadas utilizando HPLC precargadas en el tubo de TestUrGut Multiplex 5.
Megamix TUG_6	
Master mix	El ADN polimerasa es una forma modificada de una ADN polimerasa recombinante de 94 kDa aislada de *Thermus aquaticus*. La ADN polimerasa se proporciona en un estado inactivo y sin actividad enzimática a temperatura ambiente. La enzima se activa incubándola 1 minuto a 95ºC. Contiene Tris-HCl, KCl, NH_4Cl, $MgCl_2$ y aditivos que promueven ciclos rápidos. Contiene dATP, dCTP, dGTP y dTTP de calidad ultrapura.
Agua libre de RNasas	Agua destilada sin RNasa para uso en biología molecular.
Cebadores (*forward* y *reverse*)	Contiene 2 juegos de cebadores purificados mediante *desalting* precargados en el tubo de TestUrGut Multiplex 6.
Sondas	Contiene 2 sondas purificadas utilizando HPLC precargadas en el tubo de TestUrGut Multiplex 6.
Control positivo TUG_1 **Control positivo TUG_2** **Control positivo TUG_3** **Control positivo TUG_4** **Control positivo TUG_5** **Control positivo TUG_6**	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.

Protocolo del TestUrGut qPCR kit

Para obtener los resultados del TestUrGut 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. Tras su recepción, 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 en el momento de la recepción, la muestra se debe congelar a -80ºC siempre que no hayan transcurrido las 48 horas.

  Los resultados obtenidos con el TestUrGut qPCR kit solo son fiables cuando se utiliza el kit de extracción de ADN y/o el extractor automático compatibles (para comprobar la compatibilidad, consulte el Anexo 2).

  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 TestUrGut 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**

Las reacciones de qPCR de las 6 qPCR multiplex han sido optimizadas para obtener un rendimiento y una especificidad óptimos del análisis. Para cada ensayo qPCR multiplex se dispone de un tubo con la megamix.

Para obtener el diagnóstico, deben realizarse 6 análisis qPCRs multiplex (Multiplex TUG_1, Multiplex TUG_2, Multiplex TUG_3, Multiplex TUG_4, Multiplex TUG_5 y Multiplex TUG_6) para cada muestra.

1. Determinar y separar el número de tiras de tubos y tapas de tubos necesarios para realizar las reacciones requeridas teniendo en cuenta las muestras y los controles de cada análisis qPCR (tiras y tapas de tubos no incluidas en el kit). Un control positivo y un control negativo sin ADN molde (NTC del inglés *No Template Control*) deben ser incluidos en cada análisis de qPCR.

   ***Nota**: Cada qPCR Multiplex tiene su propio control positivo.*

2. Descongelar los tubos de megamix y los controles positivos incluidos en el kit de qPCR.

Análisis qPCR TestUrGut Multiplex TUG_1-TUG_6. Para el análisis de cada qPCR multiplex incluida en el TestUrGut deben realizarse los pasos 3 – 5 separadamente utilizando los reactivos reservados para cada una de ellas.

1. Mezclar el tubo de la megamix vigorosamente durante unos segundos. Dispensar 18 µL de megamix en cada pocillo (recomendados por el fabricante del termociclador a utilizar).
2. Añadir 2 µL de muestra de ADN en los pocillos que contienen la megamix. Añadir en los pocillos destinados a los controles positivos 2 µL del control positivo específico para el análisis Multiplex que se esté realizando (Positive Control TUG_1 para la Multiplex TUG_1, Positive Control TUG_2 para la Multiplex TUG_2, Positive Control TUG_3 para la Multiplex TUG_3, Positive Control TUG_4 para la Multiplex TUG_4, Positive Control TUG_5 para la Multiplex TUG_5 y Positive Control TUG_6 para la Multiplex TUG_6). Dejar un pocillo con la megamix de la reacción multiplex que se esté analizando, sin ADN molde, como control negativo (NTC) para cada multiplex.
3. Cerrar las tiras de tubos con los tapones correspondientes.
4. Insertar los tubos de qPCR en el termociclador a tiempo real.
5. Programar el termociclador según lo establecido en la Tabla 3.

***Nota:** seleccionar los canales de fluorescencia (dye) para que la adquisición de los datos fluorogénicos se pueda realizar durante la fase combinada de unión/elongación: FAM, HEX y ROX para las Multiplex TUG_1, Multiplex TUG_2 y Multiplex TUG_3; FAM y HEX para la Multiplex TUG_4 y Multiplex TUG_5; y por último FAM y ROX para la Multiplex TUG_6.*

***Tabla 3.** Protocolo del termociclador para los análisis de las qPCR multiplex TestUrGut.*

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

6. Iniciar el run.

***Nota:** Para el análisis por qPCR deben cumplirse las siguientes premisas:*

- *Se recomienda que todas las muestras y los controles del mismo tipo de análisis qPCR (Multiplex TUG_1, Multiplex TUG_2, Multiplex TUG_3, Multiplex TUG_4, Multiplex TUG_5 o Multiplex TUG_6) se analicen en el mismo run de qPCR.*
- *No utilizar diferentes kits para analizar las mismas muestras. Utilizar el mismo TestUrGut qPCR kit para el análisis de todas las multiplexs con un máximo de 22 muestras.*
- *Para cada kit, se debe utilizar el Control Positivo incluido en ese kit, no reutilizar controles positivos de otros kits.*

- **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. El análisis de las muestras se realiza estableciendo el *Threshold* manualmente siguiendo las instrucciones de uso.

   ***Nota:** antes de realizar el análisis de los datos, seleccionar los parámetros de análisis preestablecidos definidos en las 'Especificaciones Técnicas de TestUrGut' (esta información se proporciona una vez que se adquiere el TestUrGut 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 TestUrGut, los resultados obtenidos en el análisis de cada una de las 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.

Para cualquier consulta de soporte técnico, 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:

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

TestUrGut qPCR kit
Intestinal Dysbiosis qPCR kit
Basic UDI-DI: 8437023437TUGCE

GOODGUT, SLU
CIF/NIF: B55206916
GoodGut SRN: ES-MF-000000229
C/ Pic de Peguera, 11, 17003 Girona - Cataluña, España
Teléfono: +34 972 18 32 20
E-mail: info@goodgut.eu
www.goodgut.eu

Fecha de revisión:
May 2025
IFU-TestUrGut-001 v2.16

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

ANEXO 1: Componentes incluidos en el TestUrGut qPCR kit.

Reactivo/Material	Descripción	Concentración	Color	Cantidad
Megamix TUG_1	Master Mix multiplex*	4X	Ámbar	1 vial (500 µL)
	Cebador TUG_1_f1	100 nM		
	Cebador TUG_1_r1	100 nM		
	Sonda TUG_1_FAM (contiene el fluorocromo FAM y el *quencher* BHQ1)	120 nM		
	Cebador TUG_1_f2	300 nM		
	Cebador TUG_1_r2	300 nM		
	Sonda TUG_1_HEX (contiene el fluorocromo HEX y el *quencher* BHQ1)	100 nM		
	Cebador TUG_1_f3	300 nM		
	Cebador TUG_1_r3	300 nM		
	Sonda TUG_1_ROX (contiene el fluorocromo ROX y el *quencher* BHQ2)	150 nM		
	Agua libre de RNasas	NA		
Megamix TUG_2	Master Mix multiplex*	4X	Ámbar	1 vial (500 µL)
	Cebador TUG_2_f1	250 nM		
	Cebador TUG_2_r1	250 nM		
	Sonda TUG_2_FAM (contiene el fluorocromo FAM y el *quencher* BHQ1)	100 nM		
	Cebador TUG_2_f2	250 nM		
	Cebador TUG_2_r2	250 nM		
	Sonda TUG_2_HEX (contiene el fluorocromo HEX y el *quencher* BHQ1)	250 nM		
	Cebador TUG_2_f3	150 nM		
	Cebador TUG_2_r3	150 nM		
	Sonda TUG_2_ROX (contiene el fluorocromo ROX y el *quencher* BHQ2)	150 nM		

Reactivo/Material	Descripción	Concentración	Color	Cantidad
	Agua libre de RNasas	NA		
Megamix TUG_3	Master Mix multiplex*	4X	Ámbar	1 vial (500 µL)
	Cebador TUG_3_f1	300 nM		
	Cebador TUG_3_r1	300 nM		
	Sonda TUG_3_FAM (contiene el fluorocromo FAM y el *quencher* BHQ1)	300 nM		
	Cebador TUG_3_f2	200 nM		
	Cebador TUG_3_r2	200 nM		
	Sonda TUG_3_HEX (contiene el fluorocromo HEX y el *quencher* BHQ1)	200 nM		
	Cebador TUG_3_f3	125 nM		
	Cebador TUG_3_r3	125 nM		
	Sonda TUG_3_ROX (contiene el fluorocromo ROX y el *quencher* BHQ2)	125 nM		
	Agua libre de RNasas	NA		
Megamix TUG_4	Master Mix multiplex*	4X	Ámbar	1 vial (500 µL)
	Cebador TUG_4_f1	250 nM		
	Cebador TUG_4_r1	250 nM		
	Sonda TUG_4_FAM (contiene el fluorocromo FAM y el *quencher* BHQ1)	125 nM		
	Cebador TUG_4_f2	300 nM		
	Cebador TUG_4_r2	250 nM		
	Sonda TUG_4_HEX (contiene el fluorocromo HEX y el *quencher* BHQ1)	250 nM		
	Agua libre de RNasas	NA		
Megamix TUG_5	Master Mix multiplex*	4X	Ámbar	1 vial (500 µL)
	Cebador TUG_5_f1	300 nM		
	Cebador TUG_5_r1	300 nM		

Reactivo/Material	Descripción	Concentración	Color	Cantidad
	Sonda TUG_5_FAM (contiene el fluorocromo FAM y el *quencher* BHQ1)	300 nM		
	Cebador TUG_5_f2	300 nM		
	Cebador TUG_5_r2	300 nM		
	Sonda TUG_5_HEX (contiene el fluorocromo HEX y el *quencher* BHQ1)	200 nM		
	Agua libre de RNasas	NA		
Megamix TUG_6	Master Mix multiplex*	4X	Ámbar	1 vial (500 µL)
	Cebador TUG_6_f1	300 nM		
	Cebador TUG_6_r1	300 nM		
	Sonda TUG_6_FAM (contiene el fluorocromo FAM y el *quencher* BHQ1)	300 nM		
	Cebador TUG_6_f2	300 nM		
	Cebador TUG_6_r2	300 nM		
	Sonda TUG_6_ROX (contiene el fluorocromo ROX y el *quencher* BHQ2)	300 nM		
	Agua libre de RNasas	NA		
Control Positivo TUG_1	ADN resuspendido con Tris-HCl pH 8.0	10^8-10^6 copias/µL*	Transparente	1 vial (24 µL)
Control Positivo TUG_2	ADN resuspendido con Tris-HCl pH 8.0	10^8-10^6 copias/µL*	Transparente	1 vial (24 µL)
Control Positivo TUG_3	ADN resuspendido con Tris-HCl pH 8.0	10^8-10^6 copias/µL*	Transparente	1 vial (24 µL)
Control Positivo TUG_4	ADN resuspendido con Tris-HCl pH 8.0	10^8-10^6 copias/µL*	Transparente	1 vial (24 µL)
Control Positivo TUG_5	ADN resuspendido con Tris-HCl pH 8.0	10^8-10^6 copias/µL*	Transparente	1 vial (24 µL)
Control Positivo TUG_6	ADN resuspendido con Tris-HCl pH 8.0	10^8-10^6 copias/µL*	Transparente	1 vial (24 µL)

NA: No Aplica. *Dependiendo del marcador.

ANEXO 2: 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 TestUrGut son los siguientes (no incluidos en el kit):

Kit de extracción de ADN DNeasy Powersoil Pro de QIAGEN (extracción manual)

- Referencia del Kit: 47014 (50 reacciones); 47016 (250 reacciones), 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 40 mg de heces.*

ANEXO 3: Compatibilidad del equipo de PCR en tiempo real

Las reacciones TestUrGut multiplex se pueden 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 cebadores + sonda (p.e., configuración de referencia y valores de *threshold*) de acuerdo con las "Especificaciones técnicas del TestUrGut qPCR kit''.
- Utilizar tiras y tapas de tubos recomendadas por el fabricante del termociclador.

CFX96 (BioRad) / CFX Opus 96 (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 cebadores + sonda (p.e., configuración de referencia y valores de *threshold*) de acuerdo con las "Especificaciones técnicas del TestUrGut qPCR kit".
- Utilizar tiras y tapas de tubos recomendadas por el fabricante del termociclador.