

TestUrGut qPCR Kit

Intestinal Dysbiosis qPCR Kit

INSTRUCCIONES DE USO

Número de referencia REF

TestUrGut qPCR Kit: TUG-01-1024

El **kit de qPCR TestUrGut** (en inglés *TestUrGut qPCR kit*) es un dispositivo de diagnóstico *in vitro* destinado al **uso exclusivo por profesionales de laboratorio** (usuario profesional).

Finalidad prevista

El **TestUrGut qPCR kit** permite **diagnosticar la disbiosis intestinal** mediante la **detección por qPCR de marcadores microbianos específicos** en muestras de heces. Esta prueba ofrece información sobre el estado de salud intestinal del paciente y facilita el diagnóstico de disbiosis intestinal.

El panel de marcadores incluidos en el TestUrGut qPCR kit está compuesto por **15 marcadores microbianos** pertenecientes a distintos grupos funcionales: proteolítico, equilibrio, inmunoprotector, muconutritivo, proinflamatorio, metanogénico y levaduras.

Los grupos microbianos representados son: Eubacteria, *Escherichia coli*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus* spp., *Akkermansia muciniphila*, *Methanobrevibacter smithii*, *Clostridium* cluster I, *Enterococcus* sp., *Roseburia* sp., *Clostridium* cluster XIV, Gammaproteobacterias, *Lactobacillus* sp., Bacillota, Bacteroidota y *Candida albicans*.

El kit permite **amplificar y cuantificar los fragmentos génicos característicos** de estos microorganismos. Los resultados se presentan de forma cuantitativa en un informe de fácil interpretación.

El producto no es automático y está destinado a su uso por personal profesional de laboratorio.

Principios de la prueba

El **TestUrGut qPCR kit** ha sido optimizado mediante **reacciones de qPCRs multiplex**, utilizando cebadores y sondas fluorescentes. El resultado es una herramienta de **fácil uso**, con **elevada sensibilidad, especificidad y reproducibilidad**, además de un **amplio rango dinámico**.

El ensayo se basa en la actividad 5' exonucleasa de la enzima ADN polimerasa. Durante la amplificación, la enzima corta las sondas unidas a la secuencia complementaria del ADN, separando el *quencher del reporter*. Esta reacción produce un aumento en la señal de fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN diana hidrolizada, la cual puede medirse en plataformas de qPCR.

El kit permite **analizar 6 combinaciones multiplex por muestra**, necesarias para obtener un diagnóstico completo. Cada kit contiene los reactivos suficientes para **24 reacciones de cada multiplex** (un total de 6).



El kit incluye **6 tubos con las mezclas preparadas (“megamix”)**, que contienen todos los reactivos necesarios (cebadores, sondas, master mix y agua libre de ARNasas), listos para su uso. También se suministran **6 tubos con controles positivos**, igualmente listos para ser utilizados, que permiten la correcta ejecución de cada análisis de qPCR.

Nota: a lo largo del documento el término reactivos indica que aplica tanto a la megamix como a los controles positivos.

Requisitos para el análisis del TestUrGut

El **TestUrGut qPCR kit** está optimizado para la cuantificación de los marcadores microbianos del panel TestUrGut a partir del ADN extraído de muestras de heces. Para garantizar la validez del análisis, deben cumplirse los siguientes requisitos:

Población destinataria de la prueba:

- Muestras procedentes de individuos mayores de 18 años.
- No deben haber recibido tratamiento antibiótico durante el mes previo a la recogida de la muestra.
- No deben haberse sometido a una colonoscopia en el mes anterior.
- No deben haber sido sometidos a resecciones quirúrgicas de ninguna parte del tracto gastrointestinal (excepto apendicectomías).
- No se aceptan muestras de mujeres embarazadas.
- No se aceptan muestras de personas diagnosticadas de enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.
- No se recomienda realizarse la prueba durante la menstruación.
- Las muestras deben ser procesadas dentro de las **48 horas posteriores a su recogida**.

Nota: a su llegada al laboratorio, la muestra debe ser homogeneizada utilizando una espátula estéril. A continuación, se debe proceder a la extracción del ADN (**Anexo 1**). En caso de que la extracción no pueda realizarse inmediatamente, la muestra puede conservarse congelada a -20°C.

El cumplimiento de estos requisitos es esencial para garantizar que los resultados obtenidos se encuentren dentro de los intervalos de referencia establecidos para el diagnóstico de la disbiosis intestinal mediante el TestUrGut qPCR kit.

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 2**.



Reactivos, materiales y equipos no incluidos en el kit

Para el correcto análisis con el TestUrGut qPCR kit, se requiere disponer de los siguientes reactivos, materiales, y equipos, que **no se incluyen** en el kit:

- Termociclador (ver compatibilidad en **Anexo 3**)
- Tiras de tubos para PCR o qPCR y tapas ópticas de tiras de tubos (8 x tira)
- Puntas con filtro
- Centrífuga de tiras de tubos
- Micropipetas (rangos: 0,5 – 10 µL, 10 – 100 µL y 100 – 1000 µL)
- Guantes desechables sin polvo

Condiciones de transporte y almacenamiento

El **TestUrGut qPCR kit** se envía refrigerado a temperaturas comprendidas **entre 2°C y 8°C**. A su recepción, los reactivos deben almacenarse **entre -15°C y -30°C** en un congelador de temperatura estable y protegidos de la luz. Este podrá utilizarse hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Estabilidad en uso

Vida útil tras la apertura de los reactivos: una vez abiertos, **mantienen su estabilidad hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta**, siempre que se conserven entre **-30°C y -15°C**. Fuera de este rango de temperatura, los reactivos pueden permanecer **un máximo de 24 horas entre 2°C y 8°C** sin alterar sus especificaciones.

Ciclos de congelación y descongelación de los reactivos: se pueden realizar un máximo de 6 ciclos de congelación/descongelación. Si se considera que se realizarán más descongelaciones, se recomienda preparar más alícuotas de los reactivos.

Información de seguridad

- Producto destinado exclusivamente a **uso profesional**.
- **No utilizar** el kit después de la fecha de caducidad indicada.
- Se debe establecer un **flujo de trabajo unidireccional**, comenzando en el área de extracción y seguidamente hacia las áreas de amplificación y detección. No se deben retornar muestras, reactivos ni equipos al área anterior una vez completado cada paso.
- Es obligatorio seguir las **Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL)**:
 - Utilizar ropa de protección, guantes desechables, gafas de seguridad y mascarilla.
 - No comer, beber, ni fumar en el área de trabajo.
 - Lavar las manos al finalizar el análisis.
- Los consumibles y reactivos utilizados en la qPCR deben eliminarse en **contenedores para residuos biológicos**.



- Se recomienda realizar una **descontaminación regular** de los equipos, especialmente micropipetas y superficies de trabajo.



Precaución: Las megamixes contienen **1,2,4-triazol**, una **sustancia peligrosa**. Puede perjudicar la fertilidad o causar daños al feto. También puede suponer riesgos para los niños alimentados con leche materna. Deben obtenerse instrucciones especiales antes del uso. No manipule el kit hasta haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad. Debe cumplir las buenas prácticas de laboratorio. En caso de exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.



Precaución: NO añadir lejía ni soluciones ácidas directamente a los desechos de preparación de muestras ya que pueden producirse vapores tóxicos irritantes.

Información sobre sustancias interferentes

Consultar la sección de **Requisitos para el análisis del TestUrGut** (página 1).

Control de calidad

De acuerdo con el **Sistema de Gestión de Calidad de GoodGut** (certificado bajo la norma **ISO13485**), cada lote del **TestUrGut qPCR Kit** se somete a pruebas conforme a especificaciones predeterminadas para asegurar su **actividad, eficiencia y sensibilidad**.

El **certificado de análisis** correspondiente a cada lote está disponible en el área profesional de la página web de GoodGut: <https://professionalarea.goodgut.eu/>.

Limitaciones de uso

- Los reactivos incluidos en este kit están diseñados para funcionar **exclusivamente** para el análisis **TestUrGut**. No se recomienda su uso en otros ensayos.
- Los reactivos son compatibles únicamente con los instrumentos especificados en el **Anexo 3**.
- Hasta la fecha, no se han identificado componentes en el producto que puedan influir en las mediciones.

Accesorios del TestUrGut qPCR kit

Para la obtención del diagnóstico, es necesario utilizar la plataforma web **GoodGut-Test™** (<https://goodgut-test.eu>).

El **acceso a la plataforma** se proporciona por separado al adquirir el TestUrGut qPCR kit.

El **manual de usuario** se proporciona junto con una **DEMO** explicativa del funcionamiento de la plataforma, dirigida a usuarios profesionales de laboratorio.

La **configuración informática recomendada** para el uso de la plataforma web 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 del navegador	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 garantizar el correcto rendimiento del **TestUrGut qPCR kit**, se incluyen **controles positivos** de concentración conocida que deben introducirse en cada ejecución del ensayo de qPCR multiplex (ver apartado *Protocolo del TestUrGut qPCR kit*, página 6). Asimismo, se requiere incluir un **control sin ADN molde (NTC)** para verificar la ausencia de contaminación en la reacción.

Control positivo

Dado que el ensayo se basa en una qPCR multiplex que analiza simultáneamente 2 o 3 biomarcadores, el control positivo consiste en el conjunto de secuencias diana específicas para cada ensayo.

Para cada lote de control positivo se ha definido un rango de tolerancia definido mediante el análisis de 3 ejecuciones independientes por duplicado seleccionadas aleatoriamente. El rango de tolerancia de cada marcador se calcula como el promedio de los valores de Ct obtenidos $\pm 10\%$.

Tras la ejecución e interpretación del ensayo, el valor de Ct del control positivo debe situarse dentro del rango establecido para el lote correspondiente. Si el valor de Ct se encuentra fuera del rango aceptado, los resultados no son fiables. La plataforma web GoodGut-Test™ informa automáticamente si los controles positivos son aceptados o rechazados. En caso de rechazo, el análisis de la muestra debe repetirse.

Los rangos de tolerancia de los controles positivos están disponibles en las especificaciones técnicas del TestUrGut qPCR kit, proporcionadas con cada lote en el momento de la compra. También pueden consultarse en el área profesional de la web de GoodGut: <https://professionalarea.goodgut.eu/>.

Control sin ADN molde (NTC)

El NTC se utiliza para confirmar que la mix de la reacción no está contaminada. Cada marcador incluido en el TestUrGut qPCR kit presenta un valor de Ct mínimo preestablecido.

Una vez se ha ejecutado el ensayo, el valor de Ct del NTC debe ser superior al valor límite preestablecido. Si el valor de Ct del NTC se encuentra por debajo del Ct mínimo aceptado, los resultados no son fiables. La plataforma web GoodGut-Test™ informa si los NTC son aceptados o rechazados. En caso de rechazo, el análisis debe repetirse.



Los valores mínimos aceptados de los NTC están disponibles en las especificaciones técnicas del TestUrGut qPCR kit, entregadas con cada lote y accesibles en el área profesional de la 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 <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. Contiene Tris-HCl, KCl, NH ₄ Cl, MgCl ₂ y aditivos que promueven ciclos rápidos. Contiene dATP, dCTP, dGTP y dTTP de calidad ultrapura.
Agua libre de RNasas	Agua destilada sin ARNasas para uso en biología molecular.
Cebadores (forward y reverse)	Contiene 3 juegos de cebadores purificados mediante <i>desalting</i> 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 <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. Contiene Tris-HCl, KCl, NH ₄ Cl, MgCl ₂ y aditivos que promueven ciclos rápidos. Contiene dATP, dCTP, dGTP y dTTP de calidad ultrapura.
Agua libre de RNasas	Agua destilada sin ARNasas para uso en biología molecular.
Cebadores (forward y reverse)	Contiene 3 juegos de cebadores purificados mediante <i>desalting</i> 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 <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. Contiene Tris-HCl, KCl, NH ₄ Cl, MgCl ₂ y aditivos que promueven ciclos rápidos. Contiene dATP, dCTP, dGTP y dTTP de calidad ultrapura.
Agua libre de RNasas	Agua destilada sin ARNasas para uso en biología molecular.
Cebadores (forward y reverse)	Contiene 3 juegos de cebadores purificados mediante <i>desalting</i> 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	

Componente	Descripción
Master mix	El 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. Contiene Tris-HCl, KCl, NH ₄ Cl, MgCl ₂ y aditivos que promueven ciclos rápidos. Contiene dATP, dCTP, dGTP y dTTP de calidad ultrapura.
Agua libre de RNasas	Agua destilada sin ARNasas para uso en biología molecular.
Cebadores (forward y reverse)	Contiene 2 juegos de cebadores purificados mediante <i>desalting</i> 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 <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. Contiene Tris-HCl, KCl, NH ₄ Cl, MgCl ₂ y aditivos que promueven ciclos rápidos. Contiene dATP, dCTP, dGTP y dTTP de calidad ultrapura.
Agua libre de RNasas	Agua destilada sin ARNasas para uso en biología molecular.
Cebadores (forward y reverse)	Contiene 2 juegos de cebadores purificados mediante <i>desalting</i> 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 <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. Contiene Tris-HCl, KCl, NH ₄ Cl, MgCl ₂ y aditivos que promueven ciclos rápidos. Contiene dATP, dCTP, dGTP y dTTP de calidad ultrapura.
Agua libre de RNasas	Agua destilada sin ARNasas para uso en biología molecular.
Cebadores (forward y reverse)	Contiene 2 juegos de cebadores purificados mediante <i>desalting</i> 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.

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 multiplex se dispone de un tubo con la **Megamix**, solución compuesta por la mezcla de reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción qPCR (oligonucleótidos + master mix + agua libre de ARNasas).

Para cada muestra, deben realizarse 6 análisis de qPCRs multiplex:

- Multiplex TUG_1
- Multiplex TUG_2
- Multiplex TUG_3
- Multiplex TUG_4
- Multiplex TUG_5
- Multiplex TUG_6

Pasos del protocolo de qPCR:

1. Preparación de tiras de microtubos:

Determinar el número de microtubos y tapas según el número de muestras y controles (control positivo y NTC) (material no incluido en el kit). Un control positivo y un control negativo sin ADN molde (NTC del inglés *No Template Control*) deben ser incluidos para cada multiplex.

Nota: Cada qPCR Multiplex tiene su propio control positivo.

2. Preparación inicial reactivos:

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

Para cada análisis de qPCR multiplex, seguir los pasos del punto 3 de forma independiente.

3. Carga de Megamix, muestras y controles:

Mezclar el tubo de la Megamix vigorosamente durante unos segundos. Dispensar **18 µL de Megamix** en las tiras de tubos qPCR, recomendados por el fabricante del termociclador, que se utilicen.

Añadir **2 µL de ADN** en cada pocillo con Megamix precargada.

Añadir **2 µL del control positivo** específico en el tubo reservado para dicho control (TUG_1 Positive Control para Multiplex TUG_1, TUG_2 Positive Control para Multiplex TUG_2, TUG_3 Positive Control para Multiplex TUG_3, TUG_4 Positive Control para Multiplex TUG_4, TUG_5 Positive Control para Multiplex TUG_5 y TUG_6 Positive Control para Multiplex TUG_6).

Dejar un tubo solo con la Megamix de la reacción, sin ADN, como **control negativo (NTC)**.

Cerrar los tubos con **tapones ópticos**, agitar en vórtex (5 segundos), y aplicar un breve spin para asegurar que la mezcla se sitúe en el fondo del tubo evitando la formación de gotas y/o burbujas.

4. Repetición del proceso:

Repetir los pasos 1 a 3 para los otros cinco análisis multiplex restantes.



5. Carga en el termociclador:

Introducir las tiras en el termociclador compatible (ver compatibilidad en Anexo 3 de las Instrucciones de Uso).

6. Programación del termociclador:

Configurar el equipo según los parámetros indicados en la **Tabla 3**.

Nota: Seleccionar los canales (dyes) de detección adecuados para la adquisición de datos fluorogénicos durante la fase combinada de hibridación/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 para los análisis de las qPCR multiplex TestUrGut.

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

7. Inicio del análisis (run):

Para cada ensayo de qPCR multiplex (TUG_1, TUG_2, TUG_3, TUG_4, TUG_5 y TUG_6), todas las muestras y controles del mismo tipo deben ser analizados **en el mismo run**. Además, si el número de muestras lo permite, se **recomienda realizar los 6 análisis multiplex en un único run**.

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

Análisis e interpretación de los resultados:

1. Procesamiento de datos:

El análisis de las muestras se realiza mediante el software del equipo de qPCR utilizado, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Nota: Antes de iniciar el análisis, deben seleccionarse los **parámetros de análisis preestablecidos** (línea base y valores de threshold) para cada sistema de cebadores y sondas, según las Especificaciones Técnicas del TestUrGut. Esta información se proporciona con la adquisición del TestUrGut qPCR kit y está disponible en el Área Profesional de la web de GoodGut (<https://professionalarea.goodgut.eu/>).

2. Carga de resultados en la plataforma:

Para obtener el diagnóstico del TestUrGut, los resultados de cada uno de los 6 análisis de qPCR multiplex (incluyendo controles positivos y negativos) deben ser introducidos en la plataforma web **GoodGut-Test™** (<https://www.goodgut-test.eu/>) siguiendo el **Manual de Usuario**.

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

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

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:



Contiene una sustancia peligrosa para la salud. Ver información de seguridad



Producto sanitario para diagnóstico in vitro conforme al Reglamento (UE) 2017/746



Mantener protegido de la humedad



Rango de temperatura de almacenamiento



Lea las instrucciones de uso antes de utilizar el producto



Número de reacciones que pueden realizarse con el kit



Fecha de fabricación



Número de referencia o catálogo



Número de lote



Fecha de caducidad

TestUrGut qPCR kit

Intestinal Dysbiosis qPCR kit

Basic UDI-DI: 8437023437TUGCE

ANEXO 1: Compatibilidad de los kits de extracción y equipamiento automatizado

El kit de extracción de ADN, los extractores automáticos y el material adicional que se debe 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 40 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.

Material adicional para el proceso de extracción del ADN:

- Espátula estéril
- Disruptor mecánico o vórtex con adaptador para tubos
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL

ANEXO 2: Componentes incluidos en el TestUrGut qPCR kit.

Reactivos/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 ARNasas	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		
	Aqua libre de ARNasas	NA		
Megamix TUG_3	Master Mix multiplex*	4X	Ámbar	1 vial (500 µL)

Reactivos/Material	Descripción	Concentración	Color	Cantidad
Megamix TUG_3	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 ARNasas	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 ARNasas	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		
	Sonda TUG_5_FAM (contiene el fluorocromo FAM y el quencher BHQ1)	300 nM		
	Cebador TUG_5_f2	300 nM		

Reactivos/Material	Descripción	Concentración	Color	Cantidad
	Cebador TUG_5_r2	300 nM		
	Sonda TUG_5_HEX (contiene el fluorocromo HEX y el quencher BHQ1)	200 nM		
	Agua libre de ARNasas	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 ARNasas	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 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.