

RAID-CRC Screen qPCR Kit

Colorectal Cancer Screening qPCR Kit

INSTRUCCIONES DE USO

Número de referencia: **REF**

RAID-CRC Screen qPCR Kit: CRC-01-1230-01

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

Finalidad prevista

El **RAID-CRC Screen qPCR kit** está destinado 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).

El rendimiento clínico del RAID-CRC Screen se evaluó en tres estudios independientes realizados en población de cribado FIT-positiva (Malagón et al., 2019; Malagón et al., 2020). La sensibilidad y especificidad clínicas ponderadas fueron del 97,2 % y 22,1 % para cáncer colorrectal, y del 86,8 % y 22,1 % para neoplasia colorrectal avanzada. Los valores predictivos fueron del 13,5 % (PPV) y 98,3 % (NPV) para cáncer colorrectal, y del 48,6 % (PPV) y 64,9 % (NPV) para neoplasia avanzada.

El ensayo RAID-CRC Screen detecta marcadores bacterianos específicos en el ADN extraído de muestras de heces de los pacientes mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). El test analiza un panel de **6 marcadores bacterianos fecales** indicadores de condiciones tanto favorables como desfavorables de la salud intestinal: *B46*, *B48*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Gemella morbillorum*, *Bacteroides fragilis* y Eubacterias.

El kit permite **amplificar y cuantificar los fragmentos génicos característicos** de los microorganismos mencionados. Los resultados se proporcionan de forma cualitativa (Positivo/No compatible) y cuantitativa (valores Cq y N° de copias genómicas/μL). La obtención de los resultados se realiza a través de la plataforma **GoodGut-Test™** (<https://goodgut-test.eu>), verificada y validada para el uso con este kit como accesorio de diagnóstico *in vitro*.

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

Principios de la prueba

El **RAID-CRC Screen qPCR kit** ha sido optimizado mediante el análisis de **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 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 de ADN hidrolizada. Esta fluorescencia puede ser medida en los termocicladores de PCR a tiempo real validados para este kit (véase Anexo 2).

Para obtener el diagnóstico completo, el análisis de cada muestra requiere realizar **tres amplificaciones qPCR independientes**: una primera, denominada **Screen_A o SCR_A**, que es multiplex y está dirigida a tres marcadores bacterianos; una segunda, **Screen_B o SCR_B**, también multiplex y dirigida a dos marcadores; y una tercera, **Screen_C o SCR_C**, que es singleplex y dirigida a un único marcador bacteriano. **El conjunto formado por estas**

tres amplificaciones constituye una única reacción analítica RAID-CRC Screen, que corresponde al análisis completo de una muestra, ya sea una muestra clínica, un control positivo o un control negativo.

Cada kit permite realizar **230 reacciones analíticas completas**, entendiendo cada reacción como el conjunto de las tres amplificaciones Screen_A, Screen_B y Screen_C. La **Master Mix 4X se suministra en tres viales**, suficientes para las 230 reacciones completas (aproximadamente 77 reacciones por vial). Se presenta lista para usar e incluye todos los componentes necesarios para llevar a cabo la qPCR. Los **oligonucleótidos (cebadores y las sondas) se proporcionan liofilizados en viales separados**, cada uno permitiendo realizar 230 reacciones completas. El **agua libre de ARNasas se suministra en dos viales**, permitiendo realizar un mínimo de 115 reacciones completas cada uno. Además, el kit incluye **3 controles positivos**, uno por cada amplificación (Screen_A, Screen_B y Screen_C), en tubos separados, que permiten comprobar la correcta realización de cada análisis qPCR.

***Nota:** A lo largo del documento el término reactivos hace referencia tanto a la Master Mix 4X, como a los oligonucleótidos, como al agua libre de ARNasas y los controles positivos.*

Requisitos para el análisis del RAID-CRC

El **RAID-CRC Screen qPCR kit** ha sido optimizado para la cuantificación de los marcadores bacterianos especificados previamente 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:

- Individuos **asintomáticos** de entre **50 y 69 años** (ambos incluidos), considerados **población de riesgo intermedio** de cáncer colorrectal.
- El test solo debe ser aplicado exclusivamente a individuos con un **resultado positivo del FIT**, utilizando un **punto de corte de 100 ng de hemoglobina por mL** utilizando el **tubo colector de Eiken Chemical, equivalente a 20 µg de hemoglobina por g de heces**.

***Nota:** En el caso de utilizar otro punto de corte del FIT, por favor póngase en contacto con el fabricante (support@goodgut.eu).*

Criterios de exclusión:

Las muestras de heces no deben proceder de individuos que:

- Se encuentren en estado de embarazo.
- Esten realizando o hayan recibido tratamiento antibiótico oral y/o intravenoso durante el mes previo a la recogida.
- Se hayan sometido a colonoscopia durante el mes previo a la recogida.
- Se hayan sometido con anterioridad a una resección quirúrgica del tracto digestivo.
- Hayan recibido tratamiento de quimioterapia i/o radioterapia en los últimos 6 meses.

Requisitos preanalíticos:

- 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 tras su recogida**.
- Durante este periodo, se debe recoger una muestra con el **colector del FIT de Eiken Chemical**.
- Si no es posible recoger la muestra con el colector FIT en las primeras 48 horas, la muestra deberá congelarse hasta que se pueda proceder con su recolección.
- Una vez recogida la muestra con el colector del FIT, deberá almacenarse entre 2°C y 8°C un mínimo de 48 horas hasta el momento de su determinación y la posterior extracción de ADN.
- La extracción de ADN debe realizarse dentro de los primeros 18 días tras la recogida de la muestra con el colector FIT. Si no es posible, 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 la **preparación preliminar siguiente**:
 - Homogeneizar el colector FIT mediante varias inversiones manuales.
 - Transferir el contenido del colector FIT en un tubo de 1,5 mL (esperar entre 1 mL y 1,5 mL).
 - Centrifugar los tubos de 1,5 mL durante 10 minutos a 4.000 xG.
 - Eliminar el sobrenadante (quedarse entre 100 µL y 200 µL del volumen inicial).
 - Homogeneizar el pellet pipeteando.
 - 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.

El cumplimiento de estos requisitos es esencial para garantizar que los resultados obtenidos se encuentren dentro de los intervalos de referencia establecidos para el cribado del cáncer colorrectal mediante el RAID-CRC Screen qPCR kit.

Contenido del kit

El RAID-CRC Screen qPCR kit contiene 3 viales de Master Mix 4x, 2 viales de agua libre de ARNasas, 18 viales de oligonucleótidos (incluyendo el *forward*, el *reverse* y la sonda), 3 viales de controles positivos y un folleto con el Protocolo de inicio rápido.

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

| RAID-CRC Screen Kit (230 reacciones 10 µL/reacción) | Concentración | Color del vial | Cantidad |
|--|--|-----------------------------|-------------------|
| Multiplex Master Mix | 4X | Transparente con tapón rojo | 3 viales (625 µL) |
| Cebador SCR_A_f1 | 2,5 µM | Vidrio ámbar | 1 vial (80 µL*) |
| Cebador SCR_A_r1 | 2,5 µM | Vidrio ámbar | 1 vial (80 µL*) |
| Sonda SCR_A_FAM (contiene el fluorocromo FAM y el quencher BHQ1) | 2,5 µM | Vidrio ámbar | 1 vial (120 µL*) |
| Cebador SCR_A_f2 | 5,0 µM | Vidrio ámbar | 1 vial (180 µL*) |
| Cebador SCR_A_r2 | 5,0 µM | Vidrio ámbar | 1 vial (180 µL*) |
| Sonda SCR_A_HEX (contiene el fluorocromo HEX y el quencher BHQ1) | 5,0 µM | Vidrio ámbar | 1 vial (80 µL*) |
| Cebador SCR_A_f3 | 5,0 µM | Vidrio ámbar | 1 vial (180 µL*) |
| Cebador SCR_A_r3 | 5,0 µM | Vidrio ámbar | 1 vial (180 µL*) |
| Sonda SCR_A_ROX (contiene el fluorocromo ROX y el quencher BHQ2) | 5,0 µM | Vidrio ámbar | 1 vial (100 µL*) |
| Cebador SCR_B_f1 | 5,0 µM | Vidrio ámbar | 1 vial (180 µL*) |
| Cebador SCR_B_r1 | 5,0 µM | Vidrio ámbar | 1 vial (180 µL*) |
| Sonda SCR_B_HEX (contiene el fluorocromo HEX y el quencher BHQ1) | 5,0 µM | Vidrio ámbar | 1 vial (80 µL*) |
| Cebador SCR_B_f2 | 5,0 µM | Vidrio ámbar | 1 vial (160 µL*) |
| Cebador SCR_B_r2 | 5,0 µM | Vidrio ámbar | 1 vial (160 µL*) |
| Sonda SCR_B_CY5 (contiene el fluorocromo CY5 y el quencher BHQ2) | 5,0 µM | Vidrio ámbar | 1 vial (120 µL*) |
| Cebador SCR_C_f1 | 5,0 µM | Vidrio ámbar | 1 vial (180 µL*) |
| Cebador SCR_C_r1 | 5,0 µM | Vidrio ámbar | 1 vial (180 µL*) |
| Sonda SCR_C_FAM (contiene el fluorocromo FAM y el quencher BHQ1) | 5,0 µM | Vidrio ámbar | 1 vial (160 µL*) |
| Control Positivo A | 10 ⁸ -10 ⁶ copias/µL** | Transparente | 1 vial (185 µL) |

| RAID-CRC Screen Kit (230 reacciones 10 µL/reacción) | Concentración | Color del vial | Cantidad |
|--|--|----------------|-------------------|
| Control Positivo B | 10 ⁸ -10 ⁶ copias/µL** | Transparente | 1 vial (185 µL) |
| Control Positivo C | 10 ⁸ -10 ⁶ copias/µL** | Transparente | 1 vial (185 µL) |
| Agua RNase-free | NA | Transparente | 2 viales (1,9 mL) |
| Protocolo de inicio rápido | NA | NA | 1 folleto |

NA: No Aplica. * 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. ** Dependiendo del marcador

Reactivos, materiales y equipos no provistos en el kit

Para el correcto análisis con el RAID-CRC Screen qPCR kit, se requiere disponer de los siguientes reactivos, materiales, y equipos, que **no se incluyen** en el 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
- Disruptor mecánico o vórtex con adaptador para tubos
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Centrífuga de tiras de tubos
- Micropipetas (0,5 – 10 µL, 10 – 100 µL y 100 – 1000 µL)
- Guantes desechables sin polvo

Condiciones de transporte y almacenamiento

El RAID-CRC Screen qPCR kit se envía refrigerado a temperaturas comprendidas **entre 2°C y 8°C**. **A su recepción**, la master mix y los controles positivos deben almacenarse entre **-30°C y -15°C** en un congelador de temperatura estable y protegidos de la luz. 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 estable y protegidos de la luz.

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, el producto puede 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 **10 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.
- 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.**
- 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: La Master Mix 4x contiene **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 descritas en esta sección, y garantizar que el personal esté informado sobre los riesgos asociados al manejo del producto. **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.

Información sobre sustancias interferentes:

Consultar la sección de **Requisitos para el análisis del RAID-CRC Screen** (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 su **actividad, eficiencia y sensibilidad**.

El certificado de análisis 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 exclusivamente con el presente kit de qPCR. **No se recomienda usarlo para otros ensayos.**

Los reactivos son compatibles únicamente con los instrumentos especificados en el **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

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 cuando se adquiere el producto RAID-CRC Screen qPCR kit.

El **manual de usuario** se proporciona junto con una **DEMO** explicativa del funcionamiento de la plataforma, dirigida a usuarios profesionales de laboratorio. Si no la ha recibido, por favor ponerse en contacto con support@goodgut.eu.

La **configuración informática recomendada** para el uso de la plataforma web GoodGut-Test™ se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. 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 garantizar el correcto rendimiento del **RAID-CRC Screen qPCR kit**, se incluyen controles positivos de concentración conocida que deben introducirse en cada ejecución del ensayo de qPCR multiplex (ver apartado *Protocolo del RAID-CRC Screen qPCR kit*, página 8). Asimismo, se requiere incluir un **control sin ADN molde o control negativo (NTC**, del inglés *No Template Control*) para verificar la ausencia de contaminación de 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.

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 RAID-CRC Screen 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 RAID-CRC Screen qPCR kit presenta un valor de Ct mínimo preestablecido.

Una vez se lleve a cabo el ensayo, **el valor de Ct del NTC debe ser superior al 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 RAID-CRC Screen 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 3. Información de los reactivos incluidos en el Kit qPCR RAID-CRC Screen.

| Componente | Descripción |
|---|---|
| Multiplex Master Mix 4X | 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) | Para cada marcador se proporcionan dos cebadores (<i>forward</i> y <i>reverse</i>), purificados mediante <i>desalting</i> y precargados en el tubo correspondiente. |
| Sondas | Para cada marcador se proporciona una sonda purificada mediante HPLC, precargada en el tubo correspondiente. |
| Control positivo SCR_A Control positivo SCR_B Control positivo SCR_C | 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 RAID-CRC Screen qPCR Kit

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

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)**.

Pasos del protocolo de qPCR:

1. Preparación de tiras de microtubos:

Determinar el número de microtubos y tapas necesarios para realizar las reacciones requeridas teniendo en cuenta las muestras y los controles de cada análisis de qPCR (material no incluido en el 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. Preparación inicial de los reactivos:

Descongelar la Multiplex Master Mix 4X, los cebadores, las sondas y los controles positivos incluidos en el kit de qPCR.

3. Análisis qPCR multiplex Screen A:

Añadir los siguientes componentes en un tubo de microcentrífuga (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 al 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 |
| 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 de mix** 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 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. Análisis qPCR multiplex Screen B

Añadir los siguientes componentes en un tubo de microcentrífuga (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 al 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 de mix** 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 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.

5. Análisis qPCR singleplex Screen C:

Añadir los siguientes componentes en un tubo de microcentrífuga (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 al 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 µL |
| Cebador SCR_C_f1 | 300 nM | 0,60 µL |
| Cebador SCR_C_r1 | 300 nM | 0,60 µL |
| Sonda SCR_C_FAM | 250 nM | 0,50 µL |
| Agua RNase-free | - | 3,80 µL |
| Volumen total reacción | | 8 µL |

Mezclar la reacción vigorosamente y centrifugarla brevemente. Dispensar **8 µL de mix** 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 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 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.

Carga en el termociclador: **Nota:** Seleccionar los canales (dianas o dyes) adecuados para la adquisición de datos fluorogénicos durante la fase combinada de hibridación/elongación: **FAM**, **HEX** y **ROX** para la multiplex SCR_A; **HEX** y **CY5** para multiplex SCR_B; y **FAM** para la singleplex SCR_C.

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

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

6. Inicio del análisis (run):

Para cada ensayo de qPCR multiplex (SCR_A, SCR_B y SCR_C), 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 3 análisis multiplex en un único run**.

Nota: Si se utilizan **distintos termocicladores** para los análisis de una misma muestra (por ejemplo, SCR_A en el termociclador 1 y SCR_B 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 RAID-CRC Screen. Esta información se proporciona con la adquisición del RAID-CRC Screen 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 RAID-CRC Screen, los resultados obtenidos en cada uno de los 3 análisis de qPCR multiplex y singleplex (incluyendo controles positivos y negativos) deben ser introducidos en la plataforma web **GoodGut-Test™** (<https://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 de Ct crudo (Cq)

Los modelos del archivo de Excel se pueden descargar directamente de la plataforma.

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:



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

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

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

El Kit de extracción de ADN y los extractores automáticos que se pueden utilizar para obtener diagnósticos fiables con RAID-CRC Screen 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
- Antes de iniciar la extracción de ADN, debe realizarse el proceso de preparación de la muestra indicado en el apartado **Requisitos preanalíticos**, dentro de la sección **Requisitos para el análisis del RAID-CRC Screen**. Una vez completada esta preparación, continúe con la extracción siguiendo las instrucciones del fabricante.

QIAcube de Qiagen ([extracción automática](#))

- Utilice el kit de extracción de ADN DNeasy Powersoil Pro de QIAGEN con el extractor automático QIAcube Connect de QIAGEN.
- Antes de iniciar la extracción de ADN, debe realizarse el proceso de preparación de la muestra indicado en el apartado **Requisitos preanalíticos**, dentro de la sección **Requisitos para el análisis del RAID-CRC Screen**. Una vez completada esta preparación, continúe con la extracción siguiendo las instrucciones del fabricante.

ANEXO 2: Compatibilidad del equipo de PCR en tiempo real

Las multiplexs/singleplex de RAID-CRC Screen 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 kit qPCR RAID-CRC Screen*.
- Utilizar tiras y tapas de tubos recomendadas por el fabricante del termociclador.

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 cebadores + sonda (p.e., configuración de referencia y valores de *threshold*) de acuerdo con las *Especificaciones técnicas del kit qPCR RAID-CRC Screen*.
- Utilizar tiras y tapas de tubos recomendadas por el fabricante del termociclador.

Nota: Las 'Especificaciones Técnicas RAID-CRC Screen' 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/>.