



RIDA[®]GENE Bacterial Stool Panel

REF PG2405



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Alemania
Teléfono: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA®GENE Bacterial Stool Panel es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. y *Yersinia enterocolitica* en muestras de heces humanas.

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel está previsto como una ayuda para el diagnóstico de infecciones gastrointestinales causadas por bacterias.

2. Resumen y descripción del ensayo

Las enfermedades diarreicas son un gran problema de salud que causa alrededor de 2000 millones de casos en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica las enfermedades diarreicas como la segunda causa más común de muertes infantiles entre niños menores de 5 años a nivel mundial, en particular en los países en desarrollo. Cada año, mueren de diarrea aproximadamente 1,9 millones de niños menores de 5 años, más que por el SIDA, la malaria y el sarampión juntos.^{1, 2} Entre las causantes comunes de las enfermedades diarreicas bacterianas están *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Y. enterocolitica*.

Las especies de *Campylobacter* son una de las causas más comunes de diarrea bacteriana en todo el mundo, y son responsables de 400 a 500 millones de casos anualmente. La enfermedad causada por el género *Campylobacter* se denomina campilobacteriosis. Más del 80 % de las infecciones por *Campylobacter* son causadas por *C. jejuni*. En los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos se calcula que, en ese país, hay más de 2 millones de casos de campilobacteriosis al año.

La Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) (Red de vigilancia activa de enfermedades transmitidas por los alimentos) informó una tasa de incidencia de 13 casos por cada 100 000 habitantes en 2008.

Se detectó *C. jejuni* en entre el 5 % y el 16 % de los niños con diarrea en países desarrollados, y en entre el 8 % y el 45 % de los niños con diarrea en los países en desarrollo.⁴ Cada año mueren en Estados Unidos aproximadamente 100 personas con infecciones por *Campylobacter*.^{3, 4} La infección por *Campylobacter* se produce a través de alimentos contaminados, en especial la carne de aves, el agua, el contacto con animales infectados o por vía fecal-oral, particularmente en niños. La dosis infecciosa, de 500 bacterias, es relativamente baja. Tras un periodo de incubación de entre 2 a 5 días, las personas con campilobacteriosis desarrollan fiebre, diarrea, calambres abdominales, vómito, dolor abdominal y náuseas. Las posibles complicaciones a largo plazo son los trastornos autoinmunitarios, como el síndrome de Guillain-Barré (SGB).⁴

Las especies de *Salmonella* son también una de las causas principales de gastroenteritis bacteriana a nivel mundial. El género *Salmonella* se divide en dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*. Hasta ahora, se han descrito más de

2500 serotipos de *Salmonella* que son patogénicos para los humanos. Las especies de *Salmonella* provocan salmonelosis no tifoidea o fiebre tifoidea. Se estima que cada año se producen mundialmente 93,8 millones de casos de salmonelosis no tifoidea, con 155 000 muertes.⁶ En los CDC se calcula que hay más de 1,2 millones de casos anuales de salmonelosis no tifoidea en Estados Unidos, con más de 23 000 hospitalizaciones y 450 muertes.⁵ La mayoría de los casos de salmonelosis no tifoidea son causados por *S. typhimurium* y *S. enteritidis*, mientras que la fiebre tifoidea es causada por *S. typhi* y *S. paratyphi* A, B o C. La transmisión de *Salmonella* ocurre a través de alimentos o agua contaminados o mediante el contacto con animales infectados. La dosis infecciosa de las especies de *Salmonella* varía de entre 1 a 1000 bacterias. La salmonelosis no tifoidea se produce tras un periodo de incubación de entre 6 a 72 horas con síntomas clínicos de náuseas, vómito, calambres abdominales, diarrea, fiebre y cefalea. Las personas con fiebre tifoidea desarrollan cefalea, dolores, fiebre alta (de 39 °C a 41 °C), síntomas gastrointestinales, como dolores abdominales y diarrea, en un plazo de entre 1 a 3 semanas después de la exposición al microorganismo.^{3, 7}

Yersinia enterocolitica es una de las tres especies de *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*) del género *Yersinia* que son patogénicas para los seres humanos y provocan la enfermedad gastrointestinal llamada yersiniosis.

De acuerdo con FoodNet, cada año, hay una tasa de incidencia de 1 infección por *Y. enterocolitica* por cada 100 000 personas en los Estados Unidos. El Centro de Prevención y Control de Enfermedades europeo reportó 8874 casos en 2007, de los cuales, alrededor de 5000 se presentaron en Alemania. La yersiniosis ocurre luego de la ingestión de alimentos o agua contaminados. La dosis infecciosa estimada es de entre 10⁴ a 10⁶ bacterias. Tras un periodo de incubación de entre 1 a 11 días, las personas con yersiniosis desarrollan diarrea, vómito y dolor abdominal.

Y. enterocolitica también ha sido asociada con artritis reactiva.^{3,8}

El cultivo es el método clásico para el establecimiento del diagnóstico en laboratorio de diarrea bacteriana, pero necesita de varios días.

3. Principio del ensayo

RIDA®GENE Bacterial Stool Panel es un ensayo PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. y *Yersinia enterocolitica* en muestras de heces humanas. Después de aislar el ADN, tiene lugar la amplificación de los fragmentos génicos específicos de *Salmonella* spp. (*ttr*), *Campylobacter* spp. (ADNr 16S) y *Y. enterocolitica* (*ystA/ystB*), si se encuentran presentes. Las dianas amplificadas de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Y. enterocolitica* se detectan mediante sondas de hidrólisis, marcadas en un extremo con un extintor de fluorescencia y en el otro con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo). En presencia de una diana, las sondas se hibridan a los amplicones. Durante el paso de extensión, la Taq-Polymerase rompe la proximidad del indicador-extintor.

El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta en función de la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA®GENE Bacterial Stool Panel contiene un **Internal Control DNA** (ICD) como control interno del procedimiento de preparación de la muestra o para determinar la posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones)

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarillo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rojo
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	naranja
N	No Template Control	1x	450 µl	blanco
P	Positive Control	1x	200 µl	azul

5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben conservarse protegidos de la luz y a una temperatura de -20 °C. Todos los reactivos pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Descongele con cuidado los reactivos antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a entre 2 °C y 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 20 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte a la eficacia diagnóstica del ensayo (p. ej., tras la primera descongelación, es conveniente separar en alícuotas y congelar de inmediato).
- Durante la preparación de la PCR, todos los reactivos deben conservarse en frío de manera adecuada (a entre 2 °C y 8 °C).

6. Reactivos necesarios no suministrados

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel es adecuado para utilizarse con las siguientes plataformas de extracción y equipos de PCR en tiempo real:

Tabla 2: Equipo necesario

Plataformas de extracción	
R-Biopharm	RIDA®Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Equipos de PCR en tiempo real	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: Utilice únicamente tubos de 0,1 ml en el Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si desea utilizar otras plataformas de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm en mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler® 480II o el LightCycler® 480 z
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)
- Centrífuga y rotor para los viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Pipetas (0,5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (agua de grado BioScience, sin nucleasas)

7. Precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

- Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respete las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.
- Siga las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución de la prueba.
- No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con piel herida o mucosas.
- Durante la manipulación de reactivos o muestras, lleve ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lávese las manos al finalizar la ejecución de la prueba.
- No fume, coma ni beba en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos.
- La extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha deben llevarse a cabo en diferentes salas para evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas, al igual que todos los reactivos y materiales expuestos a las muestras, y deben manipularse según las normativas nacionales de seguridad.
- No utilice el kit después de la fecha de caducidad.
- Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso. Consulte las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

Para obtener más información, consulte la hoja de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com.

8. Obtención y almacenamiento

8.1 Preparación de las muestras a partir de muestras de heces

Para el aislamiento del ADN a partir de muestras de heces humanas, use un kit de aislamiento de ADN (p. ej. RIDA® Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ADN (p. ej., Maxwell® RSC [Promega]) disponibles en el mercado. Extraiga el ADN siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se recomienda diluir las muestras de heces 1:3 con agua antes de la extracción. Agite intensamente en un mezclador vórtex la muestra de heces diluida y centrifúguela a 1000 x g durante 30 segundos. Use el volumen adecuado de sobrenadante según las instrucciones del fabricante.

El ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel contiene un **Internal Control DNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitoriza la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El **Internal Control DNA** puede usarse como control de inhibición de la PCR, o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el **Internal Control DNA** se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control DNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras **y** como control de inhibición de la PCR, se deben agregar 20 µl de **Internal Control DNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control DNA** debe añadirse siempre a la mezcla de búfer de lisado de muestras y **no** directamente a la muestra.

9. Ejecución de la prueba

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Calcule el número total de reacciones de PCR necesarias (reacciones de muestra y de control). En cada ensayo debe incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda calcular un 10 % de volumen adicional para compensar las imprecisiones en el pipeteo (consulte las tablas 3 y 4). Descongele, mezcle suavemente y centrifugue brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, el **Positive Control**, el **No Template Control** y el **Internal Control DNA** antes de utilizarlos. Conserve los reactivos correctamente en frío (2 °C a 8 °C) durante la etapa de trabajo.

Tabla 3: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de extracción y de inhibición de la PCR)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

Tabla 4: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de inhibición de la PCR únicamente)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

9.2 Preparación de la mezcla de PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (tubo o placa).
prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo.

Muestra: Agregue 5 µl de extracto de ADN a la mezcla maestra prepipeteada.

Control positivo: Agregue 5 µl de **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para la PCR del control positivo.

Tape los tubos o la placa. Centrifúguelos y colóquelos en el equipo de PCR en tiempo real. La PCR debe iniciarse según la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5, 6, 7 y 8).

Control negativo: Agregue 5 µl de **No Template Control** a la mezcla maestra

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil de ADN por PCR en tiempo real

Tabla 5: Perfil de PCR en tiempo real en los equipos LightCycler®, Rotor-Gene Q y **RIDA®CYCLER**

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Tabla 6: Perfil de PCR en tiempo real para Mx3005P, ABI 7500 y CFX96™

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en la misma etapa.

9.3.2 Perfil universal por PCR en tiempo real

Nota: El perfil universal por PCR en tiempo real se debe usar en los ensayos de ADN solo cuando se combinan en una corrida los ensayos de ADN RIDA®GENE y ARN RIDA®GENE por PCR en tiempo real.

Tabla 7: Perfil universal por PCR en tiempo real en los equipos LightCycler® y RIDA®CYCLER

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Tabla 8: Perfil universal por PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI 7500, Rotor-Gene Q y CFX96™

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 9: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
R-Biopharm RIDA®CYCLER	<i>Salmonella</i> spp.	Verde	-
	ICD	Amarillo	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Naranja	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Rojo	
Roche LightCycler® 480II	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	Se requiere el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	533/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	Se requiere el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	540/580	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	540/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno).
	ICD	HEX	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
ABI 7500	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna).
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
Qiagen Rotor- Gene Q	<i>Salmonella</i> spp.	Verde	La ganancia debe configurarse en 5, según la configuración predeterminada.
	ICD	Amarillo	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Naranja	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Rojo	

10. Control de calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real usado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. Los controles positivos y negativos deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 10, figuras 1, 2 y 3) para determinar una corrida válida.

El **Positive Control** tiene una concentración de 10^3 copias/ μ l. En cada corrida de PCR se usa una cantidad total de 5×10^3 copias, respectivamente.

Tabla 10: Para que un ensayo sea válido, deben cumplirse las siguientes condiciones

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del ICD	Ct de la diana
Positive Control	Positivo	ND *1	Consulte el certificado de garantía de calidad
Control negativo	Negativo	Ct > 20	No es detectable

*1 No se requiere un valor de Ct del ICD para determinar que el control positivo es positivo.

Si el control positivo no es positivo en el intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si no se cumplen los criterios requeridos, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos usados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta de la prueba

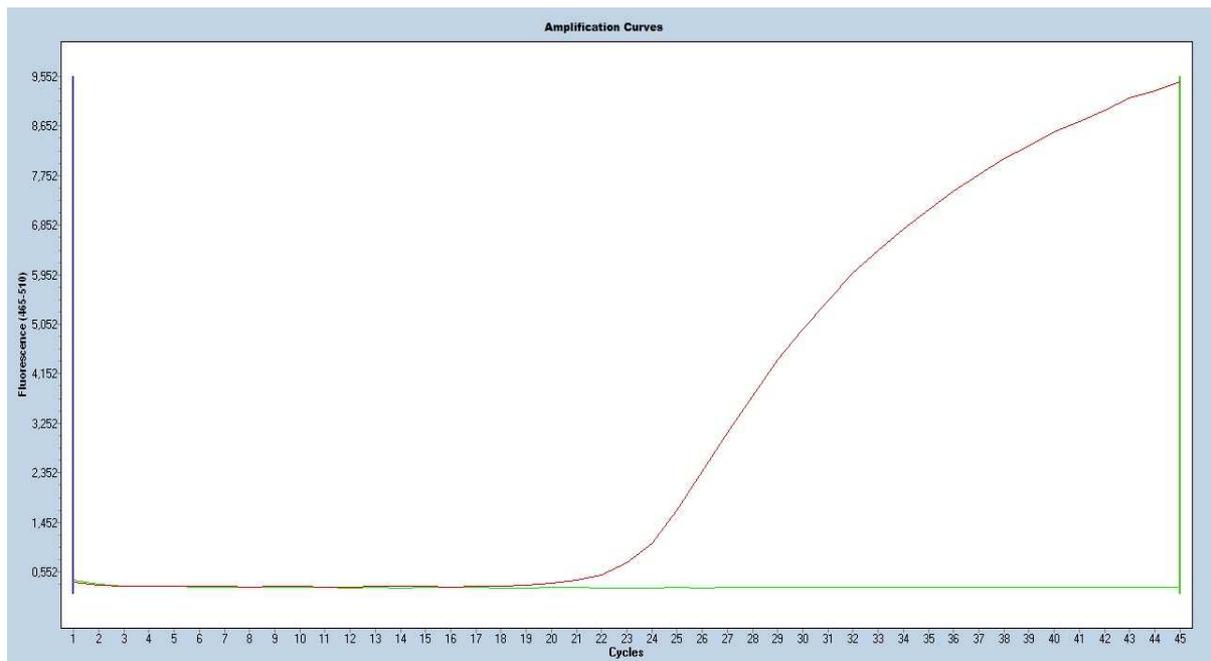


Figura 1: Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (*Salmonella* spp.) en el LightCycler® 480II

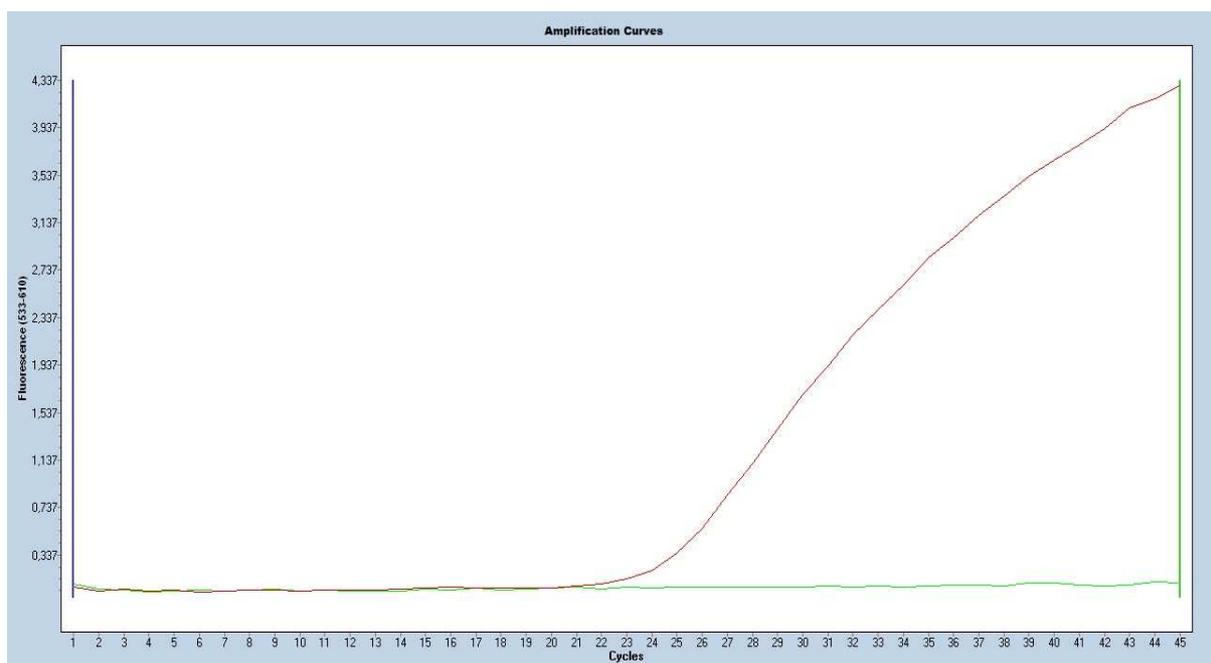


Figura 2: Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (*Yersinia enterocolitica*) en el LightCycler® 480II

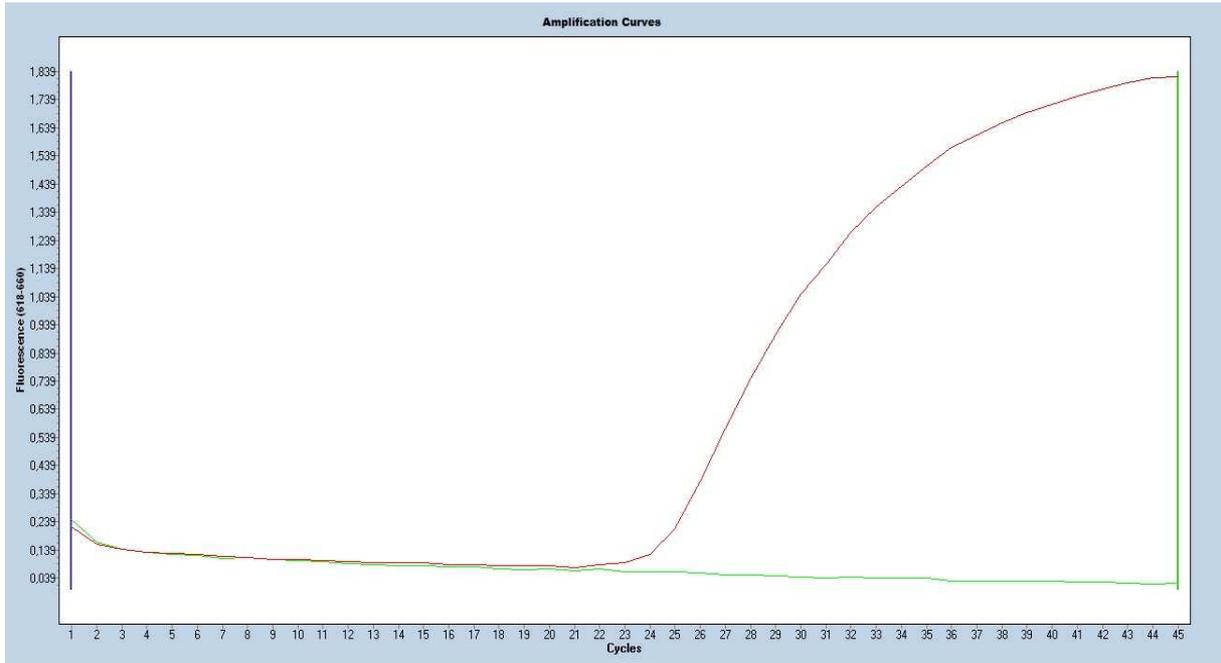


Figura 3: Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (*Campylobacter* spp.) en el LightCycler® 480II

11. Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 11.

Tabla 11: Interpretación de las muestras

Genes diana				
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Campylobacter</i> spp.	ICD	Resultado
positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	<i>Salmonella</i> spp. detectada
negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	<i>Yersinia enterocolitica</i> detectada
negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>Campylobacter</i> spp. detectada
positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	<i>Salmonella</i> spp. y <i>Yersinia enterocolitica</i> detectadas
positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>Salmonella</i> spp. y <i>Campylobacter</i> spp. detectadas
negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	<i>Yersinia enterocolitica</i> y <i>Campylobacter</i> spp. detectadas
positivo	positivo	positivo	positivo/negativo	<i>Salmonella</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i> y <i>Campylobacter</i> spp. detectadas
negativo	negativo	negativo	positivo	Genes diana no detectados
negativo	negativo	negativo	negativo	No válido

Se determina que una muestra es positiva si tanto la muestra como el **Internal Control DNA** presentan una señal de amplificación en el sistema de detección.

Se determina que una muestra es positiva si presenta señal de amplificación en el sistema de detección, pero el **Internal Control DNA** es negativo. La detección del **Internal Control DNA** no es necesaria debido a que las altas concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal del **Internal Control DNA** sea débil o esté ausente.

Se determina que una muestra es negativa si no presenta señal de amplificación en el sistema de detección, pero el **Internal Control DNA** es positivo. La inhibición de la reacción de PCR o un fallo en el procedimiento de extracción se pueden excluir por la detección del **Internal Control DNA**.

Se determina que una muestra no es válida si ni la muestra ni el **Internal Control DNA** presentan una señal de amplificación en el sistema de detección. La muestra contenía un inhibidor de la PCR o se produjo un fallo en el procedimiento de extracción. Es necesario diluir aún más la muestra extraída con agua para PCR (1:10) y amplificarla de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

12. Limitaciones del método

1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo solo está validado para muestras de heces.
3. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de la muestra, o una carga de patógenos en la muestra inferior a la sensibilidad analítica pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
4. La presencia de inhibidores de la PCR puede ocasionar resultados no válidos.
5. Las mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión del cebador o la sonda pueden afectar la detección de nuevas variantes, y producir un resultado negativo falso con el ensayo RIDA® GENE Bacterial Stool Panel.
6. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de la diana, por debajo del límite de detección (LD), pero los resultados podrían no ser reproducibles.
7. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. Sin embargo, un resultado positivo indica la presencia de los genes diana correspondientes (*Salmonella* spp. [ttr], *Y. enterocolitica* [ystA/ystB], *Campylobacter* spp. [ADNr 16S solo de *C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*]).
8. La mucina, la azitromicina y el ácido esteárico/palmítico pueden mostrar características de interferencia incluso en pequeñas cantidades.

13. Características de rendimiento

13.1 Rendimiento clínico

En un estudio de validación clínica retrospectivo se analizaron 282 muestras de heces extraídas con el ensayo RIDA®GENE Bacterial Stool Panel y con un ensayo de PCR en tiempo real interno, en un laboratorio en los Países Bajos.

Tabla 12: Correlación de los resultados de *Salmonella* spp entre el ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel y el ensayo de PCR en tiempo real interno de referencia.

		Ensayo de PCR en tiempo real interno			Comentarios
		Positivo	Negativo	Total	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positivo	50	0	50	Concordancia pos.:100 %
	Negativo	0	232	232	Concordancia neg.:100 %
	Total	50	232	282	

Tabla 13: Correlación de los resultados de *Yersinia enterocolitica* entre el ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel y el ensayo de PCR en tiempo real interno de referencia.

		Ensayo de PCR en tiempo real interno			Comentarios
		Positivo	Negativo	Total	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positivo	33	0	33	Concordancia pos.: 77 %
	Negativo	10	239	249	Concordancia neg.: 100 %
	Total	43	239	282	

Tabla 14: Correlación de los resultados de *Campylobacter* spp. entre el ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel y el ensayo de PCR en tiempo real interno de referencia.

		Ensayo de PCR en tiempo real interno			Comentarios
		Positivo	Negativo	Total	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positivo	41	1	42	Concordancia pos.: 82 %
	Negativo	9	231	240	Concordancia neg.: 100 %
	Total	50	232	282	

13.2 Sensibilidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de ADN por reacción para *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Yersinia enterocolitica*.

Las siguientes figuras 4, 5, 6 y 7 muestran una dilución seriada de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Yersinia enterocolitica* (10^5 a 10^1 copias de ADN por μ l en cada caso) en el LightCycler® 480II.

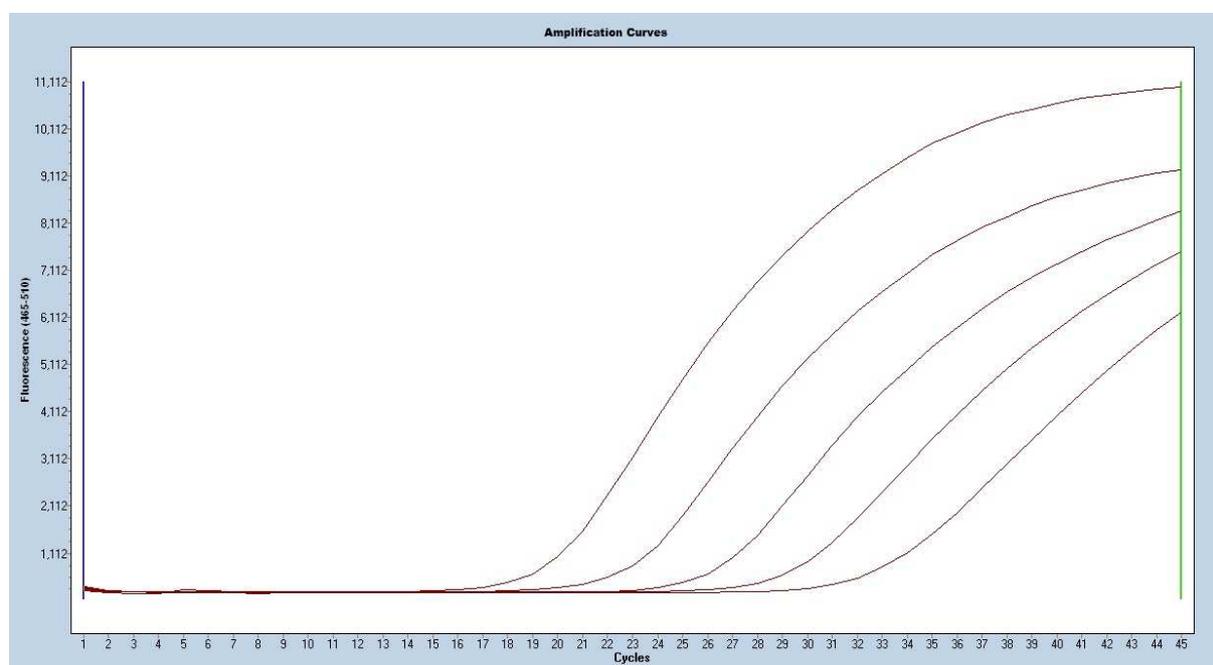


Figura 4: Dilución seriada de *Salmonella* spp. (10^5 a 10^1 copias de ADN por μ l) en el LightCycler® 480II

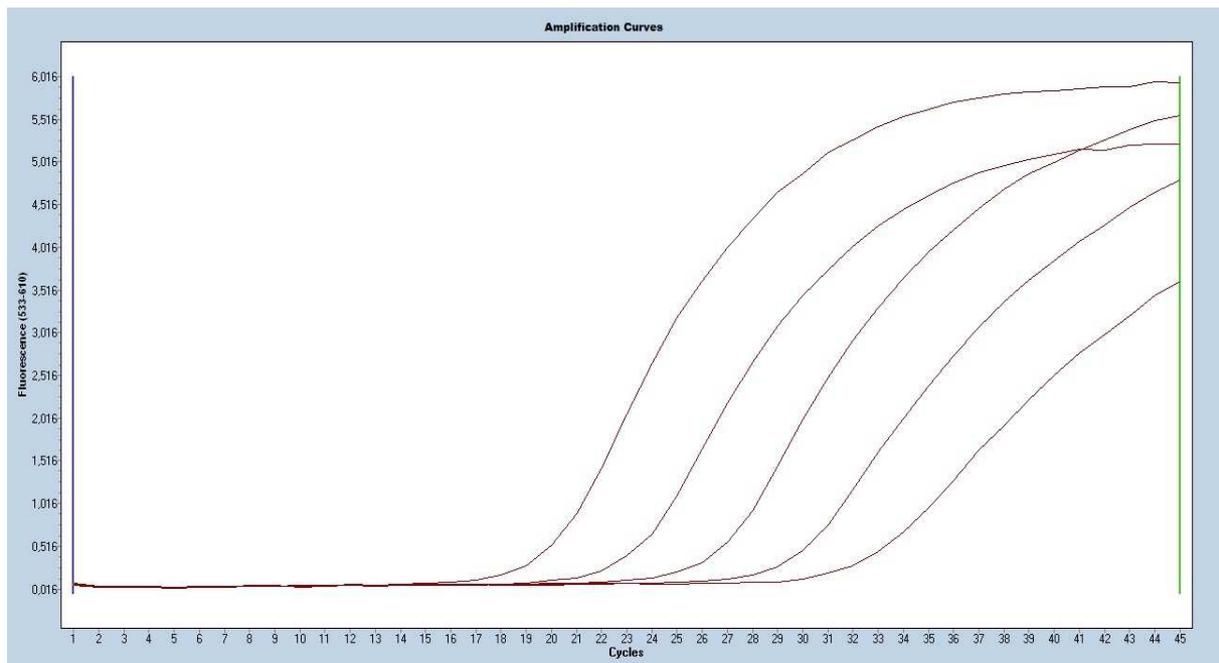


Figura 5: Dilución seriada de *Yersinia enterocolitica* (*ystA*) ($10^5 - 10^1$ copias de ADN por μl) en el LightCycler® 480II

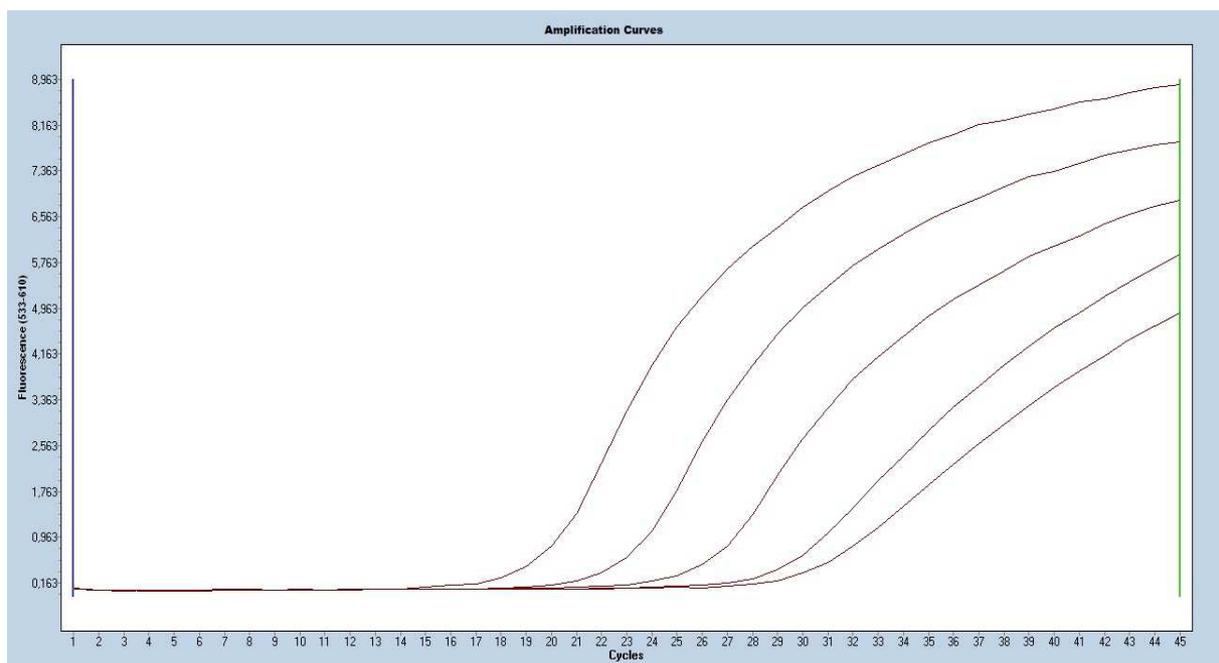


Figura 6: Dilución seriada de *Yersinia enterocolitica* (*ystB*) ($10^5 - 10^1$ copias de ADN por μl) en el LightCycler® 480II

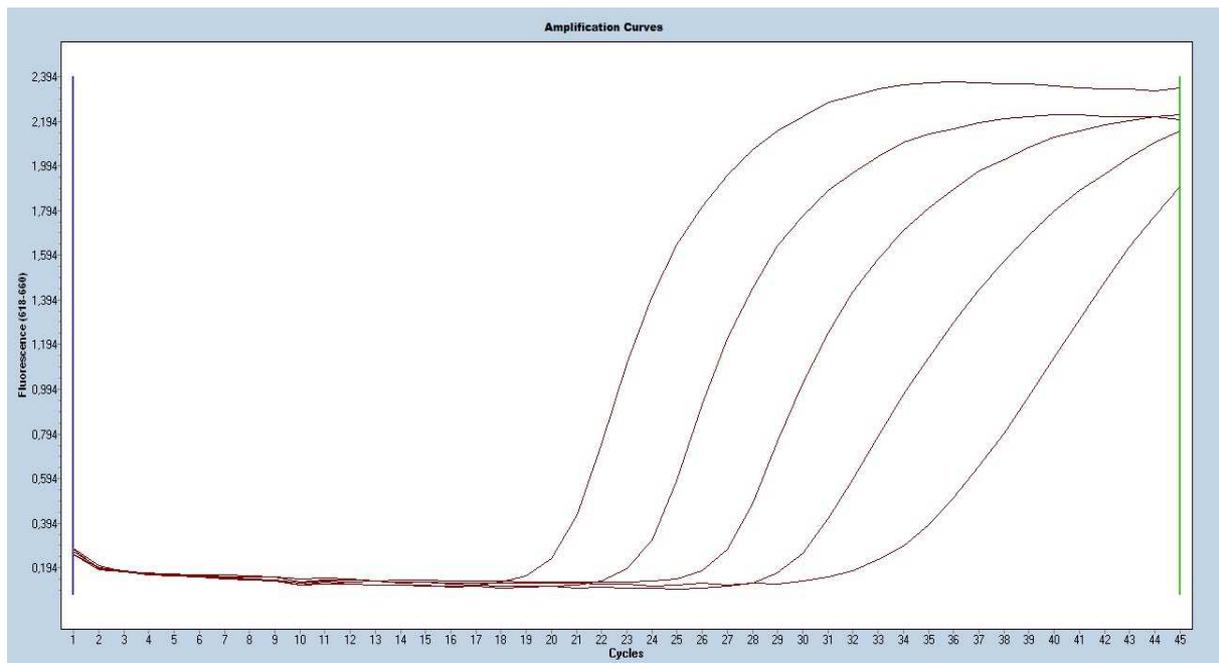


Figura 7: Dilución seriada de *Campylobacter* spp. (10^5 a 10^1 copias de ADN por μ l) en el LightCycler® 480II

El límite de detección de todo el procedimiento depende de la matriz de la muestra, la extracción del ADN y la concentración del ADN.

13.3 Especificidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel es específico para *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* y *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*). No se detectó reacción cruzada para las siguientes especies (consulte la tabla 15):

Tabla 15: Ensayos de reactividad cruzada

Adenovirus 40	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Adenovirus 41, humano, cepa Tak	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia frederiksenii</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Norovirus GG I	-	<i>Yersinia kristensenii</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Norovirus GG II	-	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Yersinia rohdei</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>Yersinia ruckeri</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Rotavirus, cepa Wa	-		

13.4 Reactividad analítica

La reactividad del ensayo PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel se evaluó contra serotipos múltiples de *Salmonella*, especies de *Campylobacter* y *Yersinia enterocolitica* (consulte la tabla 16). El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel detectó todos los serotipos de *Salmonella*, especies de *Campylobacter* y *Yersinia enterocolitica* del panel.

Tabla 16: Pruebas de reactividad analítica

Serotipos de Salmonella					
<i>S. abony</i>	+	<i>S. hadar</i>	+	<i>S. oranienburg</i>	+
<i>S. agona</i>	+	<i>S. heidelberg</i>	+	<i>S. paratyphi A</i>	+
<i>S. anatum</i>	+	<i>S. infantis</i>	+	<i>S. paratyphi B</i>	+
<i>S. arizonae</i>	+	<i>S. javiana</i>	+	<i>S. paratyphi C</i>	+
<i>S. bareilly</i>	+	<i>S. kedougou</i>	+	<i>S. saintpaul</i>	+
<i>S. bongori</i>	+	<i>S. mississippi</i>	+	<i>S. schwarzengrund</i>	+
<i>S. choleraesuis</i>	+	<i>S. montevideo</i>	+	<i>S. typhi</i>	+
<i>S. derby</i>	+	<i>S. muenchen</i>	+	<i>S. typhimurium</i>	+
<i>S. diarizonae</i>	+	<i>S. newport</i>	+	<i>S. worthington</i>	+
<i>S. dublin</i>	+	<i>S. nottingham</i>	+		
<i>S. enteritidis</i>	+	<i>S. ohio</i>	+		
Especies de Yersinia					
<i>Y. enterocolitica</i>	+	<i>Y. enterocolitica</i> subespecie <i>palaearctica</i>	+		
Subespecies de Campylobacter					
<i>C. coli</i>	+	<i>C. lari</i>	+	<i>C. jejuni</i>	+

14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2018-06-20	Versión anterior
2020-01-06	Revisión general 1. Uso previsto 3. Principio del ensayo 6. Reactivos necesarios no suministrados 9.3 Configuración del equipo de PCR 9.4 Configuración del canal de detección 10. Control de calidad 12. Limitaciones del método 13. Características de rendimiento

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Obsérvese las instrucciones de uso
	Número de lote
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

16. Bibliografía

1. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Acute diarrhea in adults and children: a global perspective.
2. UNICEF/WHO. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, 2009.
3. FDA. Bad Bug Book 2nd Edition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook 2012.
4. Ruiz-Palacios GM. The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 44:701–703.
5. CDC. National Salmonella Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.
6. Majowicz SE *et al.* The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 50:882–889.
7. Pui CF *et al.* *Salmonella*: A foodborne pathogen. Review Article. *International Food Research Journal* 2011; 18: 465-473.
8. Rosner BM *et al.* Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001-2008. *BMC Public Health* 2010; 10:337.