

RIDA® UNITY Bacterial Stool Panel

REF UN2405



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Alemania

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com



1. Uso previsto

Para el uso diagnóstico *in vitro*. La prueba RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel, realizada en la plataforma RIDA®UNITY, es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de ADN de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. y *Yersinia enterocolitica* en muestras de heces humanas no tratadas de personas con signos y síntomas de gastroenteritis aguda.

La prueba RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel está destinada a apoyar el diagnóstico diferencial de infecciones bacterianas (*Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. y *Yersinia enterocolitica*) en pacientes con síntomas de gastroenteritis en relación con otros hallazgos clínicos y de laboratorio.

Los resultados negativos no descartan una infección por *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. o *Yersinia enterocolitica* y no deben utilizarse como única base para el diagnóstico.

El producto está destinado a un uso profesional.

2. Resumen y descripción del ensayo

Las enfermedades diarreicas son un importante problema de salud y causan aproximadamente 1700 millones de casos anuales en niños de todo el mundo⁽¹⁾. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), con aproximadamente 525 000 muertes al año, son la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años, especialmente en los países en desarrollo⁽¹⁾. Las infecciones por *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Yersinia enterocolitica* son causas comunes de casos de diarrea bacteriana⁽²⁾.

En todo el mundo, las especies de *Campylobacter* son una de las cuatro causas más comunes de diarrea bacteriana.⁽³⁾ En Estados Unidos, estos patógenos causan aproximadamente 1,5 millones de casos (campilobacteriosis) al año.⁽⁴⁾ Según el Instituto Robert Koch (RKI), la incidencia en Alemania es de 80 a 90 enfermedades por cada 100 000 personas.⁽⁵⁾ La inmensa mayoría de las infecciones por *Campylobacter* notificadas están causadas por *C. jejuni*, cuya incidencia mundial supera incluso a la de *E. coli*.^(2, 3) La bacteria *C. coli* también es una especie importante dentro del género y es responsable del 1 al 25 % de todos los casos de diarrea inducidos por *Campylobacter*.⁽³⁾ Las infecciones por *Campylobacter* en humanos están relacionadas principalmente con los alimentos. La principal vía de transmisión es, por tanto, el consumo de carne contaminada y poco cocinada, así como de leche cruda y agua contaminada. Una dosis infecciosa es relativamente baja, de 500 bacterias. El tiempo de incubación típico de *Campylobacter* spp. es de entre 1 y 7 días, con diversos síntomas de enfermedad. Los síntomas característicos de la campilobacteriosis son diarrea con heces acuosas o sanguinolentas, fiebre, debilidad y dolor de estómago.^(2, 5)

Las especies de *Salmonella* son también una de las causas principales de gastroenteritis bacteriana a nivel mundial. El género *Salmonella* se divide en

2 especies, *S. enterica* y *S. bongori*, y actualmente incluye unos 2500 serotipos. La salmonela puede causar tres formas de salmonelosis: no invasiva y no tifoidea, invasiva y no tifoidea, y fiebre tifoidea.⁽²⁾ Según los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, Centers for Disease Control and Prevention), se producen aproximadamente 1,35 millones de casos de salmonelosis al año en EE. UU., con más de 26 500 hospitalizaciones y 420 muertes.⁽⁶⁾ La mayoría de los casos de salmonelosis están causados por *S. typhimurium* y *S. enteritidis*. El tifus, en cambio, está causado por *S. typhi* y *S. paratyphi* A, B o C⁽⁷⁾. En todo el mundo hay casi 22 millones de casos de tifus al año, con 200 000 muertes.⁽⁸⁾ La salmonela se transmite a través del consumo de huevos o productos que contienen huevo mal preparados, carne cruda, agua contaminada o contacto con animales infectados.⁽⁷⁾ La dosis infecciosa de la *salmonela* varía de entre 1 a 1000 bacterias. La salmonelosis aparece tras un tiempo de incubación de 6 a 72 horas con síntomas clínicos como náuseas, vómitos, calambres estomacales, diarrea, fiebre y dolor de cabeza.^(2, 7) Las personas con tifus sufren de dolor de cabeza, dolor en las extremidades, fiebre alta (de 39 °C a 41 °C) y molestias abdominales en un plazo de 2 a 3 días⁽⁸⁾.

Yersinia enterocolitica es una de las tres especies de *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*) del género *Yersinia*. *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* pueden causar yersiniosis intestinal. Según los CDC, en Estados Unidos se producen cada año cerca de 117 000 casos de *Y. enterocolitica*, con 640 hospitalizaciones y 35 muertes.⁽⁹⁾ La infección por *Y. enterocolitica* procede de alimentos contaminados, especialmente de carne de cerdo cruda o poco cocinada, o de agua contaminada.⁽¹⁰⁾ Tras un tiempo de incubación de entre 3 a 7 días, las personas con yersiniosis desarrollan diarrea, vómito y dolor abdominal. Los síntomas pueden durar hasta 3 semanas^(10, 11).

3. Principio del ensayo

RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel es una 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.

El procesamiento está totalmente automatizado con el sistema RIDA®UNITY. En primer lugar, se extraen los ácidos nucleicos utilizando el RIDA®UNITY Universal Extraction Kit y el Internal Control Kit.

La secuencia diana se detecta en un formato de RT-PCR en tiempo real en un paso, donde la transcripción inversa (RT) y la posterior PCR se realizan en un vial de reacción. Durante el proceso, el ARN aislado se transcribe a ADNc mediante transcriptasa inversa. A continuación se amplifican los fragmentos de genes específicos de *Campylobacter* spp. (ADNr 16S), *Salmonella* spp. (*ttr*) y *Yersinia enterocolitica* (*ystA/ystB*) mediante PCR en tiempo real.

Las secuencias diana amplificadas de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Y. enterocolitica* se detectan mediante sondas de hidrólisis marcadas con un extintor de fluorescencia en un extremo y un colorante fluorescente indicador (fluoróforo) en el otro. Las sondas se hibridan con el amplicón en presencia de una secuencia diana. Durante la extensión, la Taq polymerase separa al indicador del 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 con la cantidad de amplicones formados. El RIDA®UNITY Internal Control Kit debe utilizarse al mismo tiempo para poder comprobar la preparación de las muestras o la posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Los reactivos del kit son suficientes para 96 determinaciones.*

Tabla 1: Reactivos suministrados

Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
Reaction Mix	1 ×	1935 µL	amarillo, listo para usar
Enzyme Mix	1 ×	350 µL	rojo, listo para usar
Positive Control	1 ×	200 µL	azul, listo para usar
Negative Control	1 ×	450 µL	blanco, listo para usar

*Con el uso repetido y en series más pequeñas, el número de reacciones puede reducirse.

5. Instrucciones de almacenamiento

- Siga las directrices de manipulación de la tabla 2 y almacene el kit directamente después de su uso, de acuerdo con la información especificada.
 - Todos los reactivos deben almacenarse protegidos de la luz, a una temperatura de entre -16 °C y -28 °C, y, en caso de no abrirlos, pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. La garantía de calidad deja de ser válida después de la fecha de caducidad.
 - Todos los reactivos deben descongelarse cuidadosamente antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a 2 - 8 °C).
 - La congelación y descongelación repetida hasta 8 veces no afecta a las propiedades de la prueba.
- **Tabla 2:** Condiciones de almacenamiento e información

	Temperatura de conservación	Tiempo máximo de almacenamiento
sin abrir	-16 °C a -28 °C	Puede utilizarse hasta la fecha de caducidad indicada.
abierto	-16 °C a -28 °C	8 ciclos de congelación y descongelación

6. Reactivos necesarios no suministrados

La prueba RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel multiplex real time RT-PCR está pensada exclusivamente para su uso con el sistema RIDA®UNITY. Los siguientes productos son absolutamente necesarios para un uso correcto del kit:

6.1 Reactivos

Los siguientes reactivos son necesarios para realizar la prueba RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel:

Reactivos	Número de artículo
RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

6.2 Equipo de laboratorio

El siguiente equipo es necesario para realizar la prueba RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel:

Equipo
Sistema RIDA®UNITY (R-Biopharm)
Consumibles RIDA®UNITY (puntas, placas, viales de reacción, películas). Consulte las instrucciones de uso del sistema RIDA®UNITY, información sobre pedidos de consumibles.
Mezclador vórtex
Centrífuga de sobremesa
Guantes desechables sin talco

El kit RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel puede utilizarse junto con otros termocicladores compatibles. El usuario debe verificar/validar los equipos alternativos de PCR en tiempo real. Póngase en contacto con R-Biopharm AG en pcr@r-biopharm.de para comprobar la compatibilidad.

7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Para el uso diagnóstico *in vitro*.

Esta prueba solo debe llevarla a cabo personal de laboratorio cualificado. Deben respetarse las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.

Siga siempre estrictamente el manual de instrucciones al realizar este ensayo.

No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con heridas de la piel y membranas mucosas.

Lleve equipo de protección personal (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas de protección) al manipular los reactivos y las muestras y lávese las manos después de finalizar el ensayo.

No fume, ni coma ni beba en las zonas en que se manipulen las muestras.

Evite contaminar las muestras y los componentes del kit con microbios y nucleasas (DNasa/RNasa).

Las muestras clínicas deben considerarse potencialmente infecciosas y se deben desechar adecuadamente, así como todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas.

No intercambie ni mezcle los componentes (Reaction Mix, Enzyme Mix, Positive Control, Negative Control) de un lote de un kit con los componentes de otro lote.

El kit de prueba puede utilizarse dentro de las 4 semanas siguientes a la primera apertura y no debe utilizarse después de la fecha de caducidad. Estas especificaciones también son comprobadas por el sistema RIDA®UNITY.

Los usuarios son responsables de desechar de manera correcta todos los reactivos y materiales una vez utilizados. Respete la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

Encontrará más detalles sobre la hoja de datos de seguridad (Safety Data Sheet, SDS) con el número de artículo en <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Para los usuarios de la Unión Europea: notificar todos los efectos adversos graves asociados al producto a R-Biopharm AG y a las autoridades nacionales competentes.

El resumen de seguridad y funcionamiento (SSP) de este producto estará disponible en <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> una vez que se ponga en marcha la Base de Datos Europea de Productos Sanitarios (EUDAMED). En la base de datos, busque el dispositivo utilizando el UDI-DI situado en el embalaje exterior del equipo.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

Se recomienda utilizar material de muestra fresco para lograr el mejor rendimiento posible del ensayo RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel.

Evite congelar y descongelar repetidamente la muestra.

No recoja las muestras de heces en recipientes de transporte que contengan medios con conservantes, sueros animales, iones metálicos, agentes oxidantes o detergentes, porque estas sustancias pueden interferir con las pruebas RIDA[®]UNITY.

Se recomienda preparar alícuotas de las muestras para evitar la descongelación y congelación repetidas. Las muestras congeladas deben descongelarse inmediatamente antes de la extracción para evitar la degradación de los ácidos nucleicos.

Siga las especificaciones de almacenamiento de muestras de las Tablas 3, 4 y 5.

Tabla 3: Almacenamiento de muestras: detección de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*)

Muestras nativas, heces		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 días	≤ 7 días	≤ 3 meses / ≤ 6 meses

En eluato		
+30 °C	+4 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 7 días

A una temperatura de almacenamiento de -20 °C / -80 °C, la congelación/descongelación repetida del eluato hasta 3 veces no afecta las propiedades de la prueba.

Tabla 4: Almacenamiento de muestras: detección de *Salmonella* spp.

Muestras nativas, heces		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
< 1 día	≤ 7 días	≤ 6 meses

En eluato		
+30 °C	+4 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 7 días

A una temperatura de almacenamiento de -20 °C / -80 °C, la congelación/descongelación repetida de las muestras/eluato hasta 3 veces no afecta a las propiedades de la prueba.

Tabla 5: Almacenamiento de muestras: detección de *Yersinia enterocolitica*

Muestras nativas, heces		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
-	≤ 7 días	≤ 6 meses

En eluato		
+30 °C	+4 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 7 días

A una temperatura de almacenamiento de -20 °C / -80 °C, la congelación/descongelación repetida de las muestras/eluato hasta 3 veces no afecta a las propiedades de la prueba.

8.1 Preparación del ADN a partir de muestras de heces

Para aislar el ADN de las muestras de heces, utilice el RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (UN0001). Siga los procedimientos directos en las instrucciones de uso del RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (Sección: Preparación de ácido nucleico a partir de muestras de heces).

9. Ejecución de la prueba

Coloque tanto las muestras como los reactivos del kit RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel en el sistema RIDA®UNITY al inicio de su uso.

Previamente, mezcle de manera apropiada la **Reaction Mix**, el **Negative Control** y el **Positive Control** utilizando un mezclador vórtex. No agite en un mezclador vórtex la **Enzyme Mix**. Después, centrifugue brevemente todos los componentes.

Los tubos de PCR para las muestras a examinar deben colocarse previamente en el termociclador de PCR integrado.

Existen soportes para cargar correctamente el sistema con reactivos y consumibles. Para el proceso de carga, siga las instrucciones del sistema RIDA®UNITY. Observe las secciones correspondientes del manual del sistema RIDA®UNITY (Sección: Realización de un análisis).

La prueba RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel solo puede utilizarse en combinación con el RIDA®UNITY Internal Control Kit. Esto permite el reconocimiento temprano de la inhibición potencial de la PCR, la verificación de la integridad de los reactivos y la confirmación de la extracción exitosa de ácidos nucleicos. El procedimiento se describe en las instrucciones de uso del RIDA®UNITY Internal Control Kit (Sección: Realización de la prueba).

El procesamiento automatizado se describe en el manual del sistema RIDA®UNITY (Sección: Realización de un análisis).

9.1 Configuración del dispositivo

9.1.1 Perfil universal por PCR en tiempo real

Para armonizar los ensayos RIDA®UNITY, el ensayo RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel se verificó exclusivamente en el perfil universal. Esto permite combinar los ensayos de ADN y ARN entre sí. En términos generales, la transcripción inversa es lo primero en el perfil universal.

Tabla 6: Perfil universal por PCR en tiempo real para el RIDA®UNITY

<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	Tiempo de almacenamiento

Nota: La hibridación y la extensión se producen en el mismo paso.

9.2 Configuración del canal de detección

Tabla 7: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
R-Biopharm RIDA®UNITY	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	Canal SEEK Sal
	Control interno	HEX	Canal SEEK ICD
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	Canal SEEK Yers
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	Canal SEEK Campy

10. Control de calidad: indicación de inestabilidad o caducidad de los reactivos

Las muestras se evalúan con el software analítico RIDA®SEEK del sistema RIDA®UNITY. El **Negative Control** y el **Positive Control** deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 8).

El **Positive Control** está presente en una concentración de 10^3 copias/ μ L. Se usa en una cantidad total de 5×10^3 copias en cada corrida de PCR.

El **Negative Control** ya contiene el control interno RIDA®UNITY. Como los controles no contienen una plantilla, no hay que prever ninguna señal en los canales de destino. Las señales positivas en el canal IC con el que se detecta el control interno son esenciales (consulte la tabla 8).

Tabla 8: Una corrida de PCR válida debe cumplir las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado	IC Ct	Ct de genes diana
Control positivo	+	n/a *	Ver el Certificate of Analysis
Control negativo	-	Ct > 20	0

** No es necesario tener un valor de Ct para el IC para obtener un resultado positivo del control positivo.*

Si el control positivo no se detecta en el intervalo de Ct especificado pero el control negativo es válido, es necesario volver a analizar en la PCR todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, es necesario volver a analizar todas las reacciones, incluidos los controles.

Si los valores especificados no se cumplen, compruebe lo siguiente antes de repetir el ensayo:

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

Si las condiciones tampoco se cumplen después de repetir el ensayo, consulte al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

11. Interpretación de los resultados

La evaluación y la interpretación de las muestras se realizan con el software analítico del sistema RIDA®UNITY, RIDA®SEEK.

En este momento, no existe ningún método de referencia o material de referencia reconocido internacionalmente para la normalización. Los materiales de control son metrológicamente trazables a los estándares internos de R-Biopharm AG basados en amplicones específicos de ADN.

Para obtener más información sobre la trazabilidad metrológica, póngase en contacto con R-Biopharm AG.

Los valores especificados, los rangos y otros detalles se encuentran en el certificado de análisis (Certificate of Analysis, CoA).

Tabla 9: Interpretación de los resultados*

Detección			IC	Resultado
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Campylobacter</i> spp.		
+	-	-	+/-	<i>Salmonella</i> spp. detectable
-	+	-	+/-	<i>Yersinia enterocolitica</i> detectable
-	-	+	+/-	<i>Campylobacter</i> spp. detectable
+	+	-	+/-	<i>Salmonella</i> spp. y <i>Yersinia enterocolitica</i> detectables
+	-	+	+/-	<i>Salmonella</i> spp. y <i>Campylobacter</i> spp. detectables
-	+	+	+/-	<i>Yersinia enterocolitica</i> y <i>Campylobacter</i> spp. detectables
+	+	+	+/-	<i>Salmonella</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i> y <i>Campylobacter</i> spp. detectables
-	-	-	+	Genes diana no detectables
-	-	-	-	No válido

* + = positivo
- = negativo

Una muestra es positiva si el ADN de la muestra y el Internal Control presentan señal de amplificación en el sistema de detección.

Una muestra también es positiva si el ADN de la muestra presenta señal de amplificación pero no se observa ninguna señal de amplificación para el Internal Control en el sistema de detección. La detección del Internal Control no es necesaria en este caso debido a que las concentraciones altas de amplicón pueden dar lugar a una señal débil o ausente del Internal Control.

Una muestra es negativa si el ADN de la muestra no presenta señal de amplificación pero se observa una señal de amplificación para el **Internal Control** en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR se puede excluir por la detección del **Internal Control**.

Una muestra no es válida si el ADN de la muestra y el **Internal Control** no muestran una señal de amplificación en el sistema de detección. Hay inhibidores de la PCR en la muestra o se produjo un error durante el proceso de extracción.

12. Limitaciones del método

1. La prueba RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel detecta el ADN de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. y *Yersinia enterocolitica* en muestras de heces humanas no tratadas. Este ensayo no permite derivar una conexión entre el valor Ct determinado y la ocurrencia de síntomas clínicos graves. Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con los síntomas clínicos completos.
2. El diagnóstico no debe basarse únicamente en el resultado del ensayo de biología molecular, sino que siempre deben tenerse en cuenta la historia clínica y los síntomas del paciente.
3. Esta prueba está aprobada únicamente para el procesamiento automático mediante el sistema RIDA[®]UNITY.
4. Este ensayo solo está verificado para muestras de heces.
5. La obtención, el transporte, el almacenamiento y el procesamiento incorrectos de las muestras, o una carga de patógenos inferior a la sensibilidad analítica de la prueba, pueden dar lugar a resultados falsos negativos.
6. La presencia de inhibidores de PCR puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos.
7. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de las secuencias diana, por debajo del límite de detección (LoD 95 %). Los resultados obtenidos no son siempre reproducibles.
8. Las mutaciones o polimorfismos en los sitios de unión de la sonda o el cebador pueden interferir con la detección de variantes nuevas o desconocidas, y pueden dar lugar a resultados falsos negativos con RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel.
9. Un resultado positivo de la prueba no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. Un resultado positivo indica que los genes diana (*Salmonella* spp. [*ttr*], *Yersinia enterocolitica* [*ystA/ystB*], *Campylobacter* spp. [ADNr 16S, solo de *C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*]) están presentes.
10. Este ensayo debe realizarse de conformidad con la normativa de las buenas prácticas de laboratorio (GLP). Los usuarios deben seguir atentamente las instrucciones del fabricante al realizar la prueba.

13. Características de rendimiento

13.1 Características de rendimiento clínico

La prueba RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR se comparó en un laboratorio externo con una prueba de referencia con marca CE.

Se analizó un total de 405 muestras de heces de pacientes con síntomas clínicos de una infección gastrointestinal, que dieron positivo o negativo en las pruebas de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Yersinia enterocolitica*, utilizando el RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel y la prueba de referencia con marca CE.

Los resultados de cada patógeno se muestran en las tablas 10 a 12:

Tabla 10: Detección de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*)

		PCR de referencia		Total
		Positivo	Negativo	
RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel - <i>Campylobacter</i> spp. (<i>C. coli</i> , <i>C. lari</i> , <i>C. jejuni</i>)	Positivo	118	0	118
	Negativo	11	276	287
	Total	129	276	405

Sensibilidad relativa (IC 95 %)	91,5 % (85,3 % - 95,7 %)
Especificidad relativa (IC 95 %)	100 % (98,7 % - 100 %)

Tabla 11: Detección de *Salmonella* spp.

		PCR de referencia		Total
		Positivo	Negativo	
RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel - <i>Salmonella</i> spp.	Positivo	118	1	119
	Negativo	18	268	286
	Total	136	269	405

Sensibilidad relativa (IC 95 %)	86,8 % (79,9 % - 92,0 %)
Especificidad relativa (IC 95 %)	99,6 % (97,9 % - 100 %)

Tabla 12: Detección de *Yersinia enterocolitica*

		PCR de referencia		Total
		Positivo	Negativo	
RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel - <i>Yersinia enterocolitica</i>	Positivo	94	0	94
	Negativo	8	303	311
	Total	102	303	405

Sensibilidad relativa (IC 95 %)	92,2 % (85,1 % - 96,6 %)
Especificidad relativa (IC 95 %)	100 % (98,8 % - 100 %)

13.2 Características de rendimiento analíticas

13.2.1 Límite de detección (LoD 95 %)

Se midió una muestra de control positivo (muestras de heces negativas, enriquecidas) en cinco pasos de dilución (en pasos de 0,25 log) para cada objetivo y matriz con 20 réplicas por paso en un lote para determinar el LoD. A continuación, se realizó un análisis probit. A continuación, se confirmó el LoD calculado con 20 réplicas por objetivo y matriz para el paso de dilución/concentración calculado. Se utilizaron las siguientes cepas para las pruebas:

Salmonella typhimurium: ATCC® 14028™

Yersinia enterocolitica: DSM 13030

Campylobacter jejuni: ATCC® 33291™

Campylobacter coli: ATCC® 43478™

Campylobacter lari: DSM 11375

Para detectar el ADN de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. y *Yersinia enterocolitica* utilizando el ensayo RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel, se identificaron los siguientes límites de detección (LoD) en el sistema RIDA®UNITY. Los resultados de las mediciones se muestran en la tabla 13.

Tabla 13: Resultados del límite de detección de la prueba RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel para los parámetros *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. y *Yersinia enterocolitica*.

	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>
LoD	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Campylobacter coli</i>: 14028 CFU*/mL • <i>Campylobacter jejuni</i>: 8128 CFU*/mL • <i>Campylobacter lari</i>: 2762 CFU*/mL 	144 212 CFU/mL	102 565 CFU/mL

*CFU: Unidades formadoras de colonias (Colony Forming Units)

El LoD para el parámetro *Campylobacter coli* en las muestras de heces se determinó en 14 028 CFU/mL.

El LoD para el parámetro *Campylobacter jejuni* en muestras de heces se determinó en 8128 CFU/mL.

El LoD para el parámetro *Campylobacter lari* en muestras de heces se determinó en 2762 CFU/mL.

El LoD para el parámetro *Salmonella* spp. en muestras de heces se determinó en 144 212 CFU/mL.

El LoD para el parámetro *Yersinia enterocolitica* en las muestras de heces se determinó en 102 565 CFU/mL.

13.2.2 Especificidad analítica

Sustancias interferentes

La presencia de inhibidores de la RT-PCR y sustancias interferentes puede conducir a resultados falsos negativos o no válidos. Por lo tanto, se investigaron los efectos de diversas sustancias que pueden existir dado su uso generalizado para las infecciones gastrointestinales o la ocurrencia generalizada en las muestras correspondientes.

Las sustancias que podrían influir significativamente en los resultados del ensayo se examinaron primero en un cribado de interferencia. Diversas sustancias que podrían estar presentes como residuos de la extracción, bien debido a su uso generalizado en las infecciones gastrointestinales (diversos medicamentos de farmacia o de prescripción), bien por su presencia generalizada en las correspondientes muestras de control (p. ej., mucinas de la superficie de las mucosas o sangre) se examinaron inicialmente a concentraciones elevadas (tres veces la dosis diaria o simulando el "peor caso").

No se identificó interferencia para las sustancias enumeradas en la tabla 14.

Tabla 14: Sustancias potencialmente interferentes

Sustancia potencialmente interferente	Concentración
Mucinas	5 % (v/v)
Sangre humana/hemoglobina	5 % (v/v)
Ácido esteárico/palmítico	40 % (v/v)
Azithromycin-ratiopharm® 500 mg tabletas recubiertas con película (azitromicina)	84 mg/mL (p/v)
Pastillas de carbón vegetal	6,0 % (p/v)
Etanol	5 % basado en el eluato
Clorhidrato de guanidinio	5 % basado en el eluato

Reactividad cruzada

Se investigaron diversos organismos (bacterias, parásitos, hongos y virus) que suelen encontrarse en la matriz de las heces. Los microorganismos a investigar para este ensayo se eligieron porque, o bien están presentes de forma natural en las muestras de heces, o bien causan los síntomas correspondientes como patógenos gastrointestinales. Para los análisis se utilizaron cultivos de bacterianos (entre 10⁶ y 10⁹ CFU/mL) o cultivos fúngicos, sobrenadantes de cultivos virales, aislados o estándares de LGS de los microorganismos en cuestión.

La prueba RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR es específica para *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. y *Yersinia enterocolitica*. No se detectó reactividad cruzada con las siguientes especies (consulte la tabla 15):

Tabla 15: Microorganismos con posible reactividad cruzada

Microorganismo	Resultados de la prueba*		
	<i>Campylobacter</i> spp. (<i>C. coli</i> , <i>C. lari</i> , <i>C. jejuni</i>)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Adenovirus 40, humano, cepa Dugan	-	-	-
Adenovirus 41, humano, cepa Tak	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	-	-
Astrovirus tipo 2	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-
<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	-	-	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-
<i>Clostridium bifermentans</i>	-	-	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	-	-
<i>Clostridium novyi</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-
<i>Clostridium septicum</i>	-	-	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	-	-
<i>Cryptosporidium muris</i>	-	-	-
<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	-	-

<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	-	-
<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	-	-
<i>E. coli</i> (O6)	-	-	-
<i>Entamoeba histolytica</i> HK-9	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
<i>Giardia lamblia</i>	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-
Norovirus GI	-	-	-
Norovirus GII	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
Rotavirus, cepa Wa	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-

* - = negativo

13.2.4 Precisión

La precisión de la prueba RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel real-time PCR se determinó para los siguientes niveles de consideración.

Precisión intraensayo: determinación de 5 muestras de control con 20 réplicas cada una en el RIDA®UNITY en condiciones idénticas.

Precisión interensayo: determinación de 5 muestras de control en 20 corridas por duplicado en 10 días de trabajo (2 corridas por día) realizadas por técnicos diferentes en condiciones reproducibles.

las pruebas de precisión intra e interensayo se llevaron a cabo con tres lotes diferentes.

Los datos de precisión se obtuvieron utilizando cinco muestras de control, así como el PTC y el NTC pertenecientes al ensayo.

Los coeficientes de variación obtenidos de cada medición con la prueba RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel real-time PCR en el RIDA®UNITY fueron inferiores al 4,19 %.

Tabla 16: Resultados de precisión de la prueba RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel para *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*).

Ct	Valor medio/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1-3 del kit
1	Ct	24,31	25,0	24,3	23,4	23,4	24,3	23,4
	CV (%)	0,95	0,43	0,35	1,86	1,81	1,90	1,86
2	Ct	31,3	31,2	31,4	27,9	27,9	27,9	27,9
	CV (%)	0,77	0,59	0,74	4,19	3,82	3,84	3,96
3	Ct	30,8	30,6	30,5	30,4	30,1	30,2	30,3
	CV (%)	0,49	0,67	0,84	1,73	2,44	1,73	2,00
4	Ct	29,0	28,9	29,3	29,1	28,9	29,0	29,0
	CV (%)	0,41	0,30	0,80	3,08	2,99	3,01	3,03
5	Ct	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

Tabla 17: Resultados de precisión de la prueba RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel para *Salmonella* spp.

Ct	Valor medio/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1-3 del kit
1	Ct	23,6	23,7	23,7	23,6	23,7	23,6	23,7
	CV (%)	0,86	0,41	0,39	1,34	1,32	1,44	1,37
2	Ct	30,4	30,4	30,4	27,0	26,9	27,0	27,0
	CV (%)	0,71	0,58	0,74	1,31	1,24	1,29	1,27
3	Ct	30,3	30,3	30,1	30,2	30,2	30,2	30,2
	CV (%)	0,38	0,65	0,74	1,02	1,03	1,20	1,09
4	Ct	27,3	27,2	27,3	27,9	27,8	27,8	27,9
	CV (%)	0,54	0,54	0,60	1,30	1,22	1,21	1,24
5	Ct	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

Tabla 18: Resultados de precisión de la prueba RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel para *Yersinia enterocolitica*.

Ct	Valor medio/CV	Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lote 1 del kit	Lote 2 del kit	Lote 3 del kit	Lotes 1-3 del kit
1	Ct	25,1	26,1	25,2	24,4	24,4	24,4	24,4
	CV (%)	0,84	0,36	0,58	1,61	1,61	1,70	1,64
2	Ct	32,6	32,5	32,4	28,6	28,5	28,4	28,5
	CV (%)	1,63	1,15	1,31	1,51	1,45	1,78	1,58
3	Ct	31,9	31,8	31,8	31,5	31,4	31,4	31,4
	CV (%)	0,81	0,91	1,08	1,60	1,58	1,45	1,54
4	Ct	29,1	29,0	29,2	29,7	29,6	29,7	29,7
	CV (%)	0,63	0,54	0,59	2,22	2,22	2,19	2,21
5	Ct	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

13.2.5 Reactividad analítica

La reactividad de la prueba RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR se examinó utilizando diversos serotipos de *Salmonella*, especies de *Campylobacter* y subespecies de *Yersinia enterocolitica* (consulte la tabla 19).

Tabla 19: Pruebas de reactividad analítica

Cepa	Concentración	Resultado*		
		<i>Campylobacter</i> spp. (<i>C. coli</i> , <i>C. lari</i> , <i>C. jejuni</i>)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Campylobacter coli</i>	6,5 x 10 ² CFU/mL	+	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	1,5 x 10 ³ CFU/mL	+	-	-
<i>Campylobacter lari</i> ssp. <i>lari</i>	1,04 x 10 ² CFU/mL	+	-	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Typhi</i>	1,49 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Typhimurium</i>	7,7 x 10 ³ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Enteritidis</i>	3,3 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Paratyphi A</i>	1,75 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Paratyphi B</i>	2,08 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Paratyphi C</i>	1,1 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Newport</i>	3,1 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Heidelberg</i>	5,9 x 10 ³ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Javiana</i>	1,79 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Dublin</i>	2,88 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Agona</i>	1,91 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Choleraesuis</i>	9,6 x 10 ³ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Infantis</i>	1,3 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Montevideo</i>	8,4 x 10 ³ CFU/mL	-	+	-

<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Anatum</i>	2,38 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Mississippi</i>	2,27 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Bareily</i>	1,43 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> ssp. <i>enterocolitica</i>	4,2 x 10 ³ CFU/mL	-	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i> ssp. <i>paleartica</i>	4,9 x 10 ³ CFU/mL	-	-	+

*+ = positivo (al menos 2 de 3 réplicas positivas)










- = negativo

14. Historial de versiones

Número de versión	Sección y designación
2022-04-28	Versión de lanzamiento

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	Siga las instrucciones de uso
	Número de lote
	Fecha de caducidad
	Temperatura de conservación
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

	Mezcla de reacción
	Mezcla enzimática
	Control negativo
	Control positivo

16. Bibliografía

1. World Health Organisation. Diarrhoeal disease 2017, May 2 [Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease#:~:text=Infection%3A%20Diarrhoea%20is%20a%20symptom%20of%20infections%20caused,and%20safe%20water%20for%20drinking%2C%20cooking%20and%20cleaning.>] 2021-09-07
2. Chlebicz A, Śliżewska K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(5).
3. Costa D, Iraola G. Pathogenomics of Emerging Campylobacter Species. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(4).
4. Centers for Disease Control and Prevention. Campylobacter (Campylobacteriosis) 2021 [Available from: <https://www.cdc.gov/campylobacter/index.html>.] 2021-09-07
5. Institut RK. Campylobacter-Enteritis 2018 [Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Campylobacter.html.] 2021-09-07
6. Centers for Disease Control and Prevention. Salmonella 2019 [Available from: <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>.]
7. Robert Koch Institut. Salmonellose 2016 [Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Salmonellose.html.] 2021-09-07
8. Robert Koch Institut. Typhus abdominalis, Paratyphus. 2015.
9. Centers for Disease Control and Prevention. Yersinia enterocolitica (Yersiniosis) 2016 [Available from: <https://www.cdc.gov/yersinia/index.html>.] 2021-09-07
10. Rosner BM, Stark K, Werber D. Epidemiology of reported Yersinia enterocolitica infections in Germany, 2001-2008. *BMC Public Health*. 2010;10(1):337.
11. Robert Koch Institut. Yersiniose 2019 [Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Yersiniose.html.] 2021-09-07