

RIDA® UNITY Bacterial Stool Panel

REF UN2405



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

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



1. Uso previsto

Para diagnóstico *in vitro*. O teste RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel, realizado na plataforma RIDA®UNITY, é uma PCR multiplex em tempo real para detecção e diferenciação qualitativa direta de DNA de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* em amostras de fezes humanas não tratadas de pessoas com sinais e sintomas de gastroenterite aguda.

O teste RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel destina-se a oferecer suporte ao diagnóstico de infecções bacterianas (*Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica*) em pacientes com sintomas de gastroenterite em conjunto com outros achados clínicos e laboratoriais.

Resultados negativos não descartam a infecção por *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. ou *Yersinia enterocolitica* e não devem ser usados como única base para o diagnóstico.

O produto é destinado ao uso profissional.

2. Sumário e explicação do teste

As doenças diarreicas são um problema de saúde significativo e causam aproximadamente 1,7 bilhões de casos por ano em crianças em todo o mundo.⁽¹⁾ Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), com aproximadamente 525.000 mortes por ano, elas são a segunda principal causa de morte em crianças menores de 5 anos, especialmente em países em desenvolvimento.⁽¹⁾ Infecções por *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* são causas frequentes de casos de diarreia bacteriana.⁽²⁾

Em nível mundial, as espécies de *Campylobacter* são uma das quatro causas mais frequentes de diarreia bacteriana.⁽³⁾ Nos EUA, estes patógenos causam aproximadamente 1,5 milhão de casos (campilobacteriose) por ano.⁽⁴⁾ De acordo com o Instituto Robert Koch (RKI), a incidência na Alemanha é de 80 a 90 casos por 100.000 pessoas.⁽⁵⁾ A esmagadora maioria das infecções por *Campylobacter* relatadas é causada por *C. jejuni*, cuja incidência mundial supera até mesmo a da *E. coli*.^(2, 3) A *C. coli* é também uma espécie importante dentro do gênero e é responsável por 1 a 25 % de todos os casos de diarreia induzida por *Campylobacter*.⁽³⁾ As infecções por *Campylobacter* em humanos são principalmente relacionadas com alimentos. A principal via de transmissão é, portanto, o consumo de carne contaminada, mal cozida, bem como de leite cru e água contaminada. Uma dose infecciosa é relativamente baixa a 500 bactérias.⁽⁵⁾ O período típico de incubação da *Campylobacter* spp. é de 1 a 7 dias com diversos sintomas de doença. Os sintomas característicos da campilobacteriose são diarreia com fezes aquosas a sangrentas, febre, fraqueza e dor de estômago.^(2, 5)

As espécies de *Salmonella* são também uma das principais causas de gastroenterite bacteriana em todo o mundo. O gênero *Salmonella* está dividido em 2 espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, e atualmente inclui aproximadamente 2.500 serotipos. A salmonella pode causar três formas de salmonelose: não invasiva e não tifoide,

invasiva e não tifoide, e febre tifoide.⁽²⁾ De acordo com os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), há aproximadamente 1,35 milhão de casos de salmonelose por ano nos EUA, com mais de 26.500 internações hospitalares e 420 mortes.⁽⁶⁾ A maioria dos casos de salmonelose é causada por *S. typhimurium* e *S. enteritidis*. Em contraste, o tifo é causado por *S. typhi* e *S. paratyphi* A, B, ou C.⁽⁷⁾ Em todo o mundo, há quase 22 milhões de casos de tifo por ano, com 200.000 mortes.⁽⁸⁾ A salmonella é transmitida através do consumo de ovos ou produtos que contenham ovos mal preparados, carne crua, água contaminada ou contato com animais infectados.⁽⁷⁾ Uma dosagem infecciosa de salmonella varia de 1 a 1.000 bactérias. A salmonelose aparece após um período de incubação de 6 a 72 horas com sintomas clínicos como náuseas, vômitos, cólicas estomacais, diarreia, febre e dor de cabeça.^(2, 7) As pessoas com tifo sofrem de dor de cabeça, dores nos membros, febre alta (de 39 °C a 41 °C) , e queixas abdominais em 2 a 3 dias.⁽⁸⁾

Yersinia enterocolitica é uma das três espécies de *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*) do gênero *Yersinia*. *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* podem causar yersiniose intestinal. De acordo com o CDC, nos EUA ocorrem quase 117.000 casos de *Y. enterocolitica* por ano, com 640 internações hospitalares e 35 mortes.⁽⁹⁾ Uma infecção por *Y. enterocolitica* é oriunda de alimentos contaminados, especialmente carne de porco crua ou mal cozida, ou água contaminada.⁽¹⁰⁾ Após um período de incubação de 3 a 7 dias, as pessoas com yersiniose sofrem de diarreia, vômitos e dores de estômago. Os sintomas podem durar até 3 semanas.^(10, 11)

3. Princípio do teste

O teste RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel é uma PCR multiplex em tempo real para a detecção qualitativa direta de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* em amostras de fezes humanas.

O processamento é totalmente automatizado com o sistema RIDA®UNITY. Primeiro, os ácidos nucleicos são extraídos usando o RIDA®UNITY Universal Extraction Kit e o Kit de Controle Interno.

A sequência-alvo é detectada em um formato de RT-PCR em tempo real de uma etapa, ou seja, a transcrição reversa (RT) e a PCR subsequente são realizadas em um tubo de ensaio. No processo, o RNA isolado é transcrito para o cDNA com ajuda de uma transcriptase reversa. Os fragmentos de genes específicos para *Campylobacter* spp. (16S rDNA), *Salmonella* spp. (*ttr*), e *Yersinia enterocolitica* (*ystA/ystB*) são então amplificados usando a PCR em tempo real.

As sequências-alvo amplificadas de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Y. enterocolitica* são detectadas usando sondas de hidrólise que são rotuladas com um supressor em uma extremidade e um corante indicador fluorescente (fluoróforo) na outra. As sondas hibridam com o fragmento amplificado na presença de uma sequência-alvo. Durante a extensão, a Taq polimerase separa o marcador do supressor. O repórter emite um sinal fluorescente que é detectado pela unidade óptica de um instrumento de PCR em tempo real. O sinal fluorescente aumenta com a quantidade de fragmentos de amplicons formados. O RIDA®UNITY Internal Control Kit deve ser usado ao mesmo tempo para que seja possível verificar a preparação da amostra e/ou a potencial inibição da PCR.

4. Reagentes fornecidos

Os reagentes do kit são suficientes para 96 determinações.*

Tab. 1: Reagentes fornecidos

Reagente	Quantidade		Cor da tampa
Reaction Mix	1 ×	1935 µL	amarelo, pronto para uso
Enzyme Mix	1 ×	350 µL	vermelho, pronto para uso
Positive Control	1 ×	200 µL	azul, pronto para uso
Negative Control	1 ×	450 µL	branco, pronto para uso

*Com o uso repetido e em séries menores, o número de reações pode ser reduzido.

5. Instruções de armazenamento

- Siga as orientações de manuseio da Tabela 2 e guarde o kit diretamente após a utilização, de acordo com as informações especificadas.
- Todos os reagentes devem ser armazenados longe da luz de -16 °C a -28 °C e, se não abertos, podem ser usados até a data de validade impressa no rótulo. A garantia de qualidade não é válida após a data de validade.
- Todos os reagentes devem ser cuidadosamente descongelados antes do uso (por exemplo, em uma geladeira entre 2 - 8 °C).
- O congelamento/descongelamento repetido até 8 vezes não afeta as propriedades do teste.

- **Tab. 2:** Condições de armazenamento e informação

	Temperatura de armazenamento	Tempo máximo de armazenamento
fechado	-16 °C a -28 °C	Pode ser usado até a data de validade impressa
aberto	-16 °C a -28 °C	8 ciclos de congelamento-descongelamento

6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

O teste de RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel multiplex real-time RT-PCR é destinado exclusivamente para utilização com o sistema RIDA®UNITY. Os seguintes produtos são absolutamente necessários para utilização correta.

6.1 Reagentes

Os seguintes reagentes são necessários para realizar o teste RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel:

Reagentes	Número do item
RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

6.2 Equipamentos de laboratório

Os seguintes equipamentos são necessários para realizar o teste RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel:

Equipamentos
Sistema RIDA®UNITY (R-Biopharm)
Consumíveis RIDA®UNITY (pontas, placas, frascos de reação, filmes). Consultar as instruções de utilização do sistema RIDA®UNITY, solicitando informações sobre consumíveis.
Vortexer
Centrífuga de bancada
Luvas descartáveis sem pó

O kit RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel pode ser usado em conjunto com outros cicladores compatíveis. Os instrumentos alternativos de PCR em tempo real devem ser verificados/validados pelo usuário. Por favor, entre em contato com a R-Biopharm AG em pcr@r-biopharm.de para verificação de compatibilidade.

7. Avisos e medidas preventivas para os usuários

Para diagnóstico *in vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório qualificado. Devem ser observadas as diretrizes para trabalho em laboratórios médicos.

Ao realizar este teste, sempre siga estritamente o manual de operação.

Não pipete amostras ou reagentes usando a boca. Evite o contato com membranas mucosas e pele lesionada.

Utilize equipamentos de segurança pessoal (luvas adequadas, jaleco, óculos de segurança) ao manusear os reagentes e as amostras, e lave as mãos após concluir o teste.

Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras estiverem sendo manipuladas. Evite contaminar as amostras e componentes do kit com micróbios e nucleases (DNase/RNase).

As amostras clínicas devem ser vistas como potencialmente infecciosas e devem ser descartadas adequadamente, como todos os reagentes e materiais que entram em contato com amostras potencialmente infecciosas.

Não substitua ou combine os componentes (Reaction Mix, Enzyme Mix, Positive Control, Negative Control) de um lote de um kit com os componentes de outro lote.

O kit de teste pode ser usado dentro de 4 semanas após a primeira abertura e não deve ser usado após a data de validade. Estas especificações também são verificadas pelo sistema RIDA[®]UNITY.

Os usuários são os responsáveis por descartar de modo adequado todos os reagentes e materiais após sua utilização. Para o descarte, cumpra com os regulamentos nacionais.

Mais detalhes sobre as Folhas de Dados de Segurança (Safety Data Sheet, SDS) podem ser encontrados sob o número do item em <https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Para usuários na União Europeia: Comunicar todos os eventos adversos graves associados ao produto à R-Biopharm AG e às autoridades nacionais competentes.

O resumo de segurança e desempenho (SSP) deste produto estará disponível em <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> assim que a Base de Dados Europeia de Dispositivos Médicos (EUDAMED) for iniciada. Na base de dados, procure o dispositivo usando o UDI-DI localizado na embalagem externa do dispositivo.

8. Coleta e armazenamento de amostra

Recomenda-se a utilização de material de amostra fresca para obter o melhor desempenho possível do ensaio RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel.

Evite congelar e descongelar repetidamente a amostra.

Não colete as amostras de fezes em recipientes de transporte que contenham meios de transporte com conservantes, soros animais, íons metálicos, agentes oxidantes ou detergentes, pois tais substâncias podem interferir com os testes RIDA®UNITY.

Recomenda-se produzir alíquotas das amostras para evitar o descongelamento e o congelamento repetidos. As amostras congeladas devem ser descongeladas imediatamente antes da extração para evitar a degradação dos ácidos nucleicos.

Siga as especificações de armazenamento das amostras na Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5.

Tab. 3: Armazenamento de amostras - detecção de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*)

Amostras nativas - fezes		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 dias	≤ 7 dias	≤ 3 meses / ≤ 6 meses

Em eluato		
+30 °C	+4 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 7 dias

A uma temperatura de armazenamento de -20 °C / -80 °C, o congelamento/descongelamento repetido do eluato por até 3 vezes não afeta as propriedades do teste.

Tab. 4: Armazenamento de amostras - detecção de *Salmonella* spp.

Amostras nativas - fezes		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
< 1 dia	≤ 7 dias	≤ 6 meses

Em eluato		
+30 °C	+4 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 7 dias

A uma temperatura de armazenamento de -20 °C / -80 °C, o congelamento/descongelamento repetido das amostras/eluatos por até 3 vezes não afeta as propriedades do teste.

Tab. 5: Armazenamento de amostras - detecção de *Yersinia enterocolitica*

Amostras nativas - fezes		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
-	≤ 7 dias	≤ 6 meses

Em eluato		
+30 °C	+4 °C	-20 °C
≤ 24 horas	≤ 36 horas	≤ 7 dias

A uma temperatura de armazenamento de -20 °C / -80 °C, o congelamento/descongelamento repetido das amostras/eluatos por até 3 vezes não afeta as propriedades do teste.

8.1 Preparação de DNA a partir de amostras de fezes

Para isolar o DNA das amostras de fezes, use o RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (UN0001). Siga os procedimentos específicos de uso das instruções de utilização do RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (Seção: Preparação de ácido nucleico a partir de amostras de fezes).

9. Realização do teste

Coloque tanto as amostras como os reagentes do kit RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel no sistema RIDA®UNITY no início da utilização.

Antes, misture adequadamente a **Reaction Mix**, **Negative Control** e **Positive Control** usando um agitador vortex. Não agite a **Enzyme Mix**. Em seguida, centrifugue brevemente todos os componentes.

Os tubos de PCR das amostras a serem examinadas devem ser posicionados antecipadamente no ciclador de PCR integrado.

Os processadores estão configurados para carregar corretamente o sistema com reagentes e consumíveis. Para o processo de abastecimento, siga as instruções do sistema RIDA®UNITY. Observe as seções relevantes no manual do sistema RIDA®UNITY (Seção: Realização da execução).

O teste RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel pode ser usado apenas em combinação com o RIDA®UNITY Internal Control Kit. Isto permite o reconhecimento antecipado da potencial inibição da PCR, verificação da integridade do reagente e confirmação da extração bem-sucedida do ácido nucleico. O procedimento está descrito nas instruções de utilização do RIDA®UNITY Internal Control Kit (Seção: Realização do teste).

O processamento automatizado é descrito no manual do sistema RIDA®UNITY (Seção: Realização da execução).

9.1 Configurações do dispositivo

9.1.1 Perfil de PCR em tempo real universal

Para harmonizar os ensaios RIDA®GENE, o ensaio RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel é verificado exclusivamente no perfil universal. Isto torna possível combinar os ensaios de DNA e RNA um com o outro. De maneira geral, a transcrição reversa, portanto, vem em primeiro lugar no perfil universal.

Tab. 6: Perfil universal de PCR em tempo real para o RIDA®UNITY

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturação	10 s, 95 °C
Recozimento/extensão	15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição/ índice de subida	Tempo máximo

Nota: O recozimento e a extensão acontecem na mesma etapa.

9.2 Configuração do canal de detecção

Tab. 7: Seleção dos canais de detecção adequados

Instrumento de PCR em tempo real	Detecção	Canal de detecção	Indicação
R-Biopharm RIDA®UNITY	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	SEEK canal Sal
	Controle Interno	HEX	SEEK canal ICD
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	SEEK canal Yers
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	SEEK canal Campy

10. Controle de qualidade - indicação de instabilidade ou expiração de reagentes

As amostras são avaliadas usando o software analítico RIDA®SEEK do sistema RIDA®UNITY. O **Negative Control** e o **Positive Control** devem mostrar os resultados corretos (ver Tab. 8).

O **Positive Control** está presente em uma concentração de 10^3 cópias/ μ L. É usado em uma quantidade total de 5×10^3 cópias em cada execução de PCR.

O **Negative Control** já contém o RIDA®UNITY Internal Control. Uma vez que os controles não contêm um modelo, nenhum sinal deve ser antecipado nos canais-alvo. Os sinais positivos no canal IC com o qual o controle interno é detectado são essenciais (ver Tab. 8).

Tab. 8: Uma execução de PCR válida deve atender às seguintes condições:

Amostra	Resultado	IC Ct	Gene-alvo Ct
Controle positivo	+	n/a *	Ver Certificate of Analysis
Controle negativo	-	Ct > 20	0

* Um valor de Ct para o IC não é necessário para obter um resultado positivo do controle positivo.

Se o controle positivo não estiver dentro da faixa Ct especificada, mas o controle negativo for válido, todas as reações, incluindo os controles, precisam ser reanalisadas na PCR.

Se o controle negativo não for negativo, mas o controle positivo for válido, todas as reações, incluindo os controles, precisam ser reanalisadas na PCR.

Se os valores especificados não forem atingidos, verifique os seguintes itens antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento que está sendo utilizado
- Execução correta do teste

Se as condições ainda não forem cumpridas após repetir o teste, consulte o fabricante ou seu distribuidor local R-Biopharm.

11. Avaliação e interpretação

A avaliação e interpretação das amostras são feitas usando o software analítico do sistema RIDA®UNITY, o RIDA®SEEK.

Neste momento, não existe nenhum método de referência reconhecido internacionalmente ou material de referência para a padronização. Os materiais de controle são rastreáveis metrologicamente até o padrão interno da R-Biopharm AG com base em fragmentos amplificados de DNA específicos.

Para obter mais informações sobre rastreabilidade metrológica, entre em contato com a R-Biopharm AG.

Os valores especificados, intervalos e outros detalhes podem ser encontrados no Certificado de Análise (Certificate of Analysis, CoA) anexo.

Tab. 9: Interpretação dos resultados*

Detecção			IC	Resultado
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Campylobacter</i> spp.		
+	-	-	+/-	<i>Salmonella</i> spp. detectável
-	+	-	+/-	<i>Yersinia enterocolitica</i> detectável
-	-	+	+/-	<i>Campylobacter</i> spp. detectável
+	+	-	+/-	<i>Salmonella</i> spp. e <i>Yersinia enterocolitica</i> detectáveis
+	-	+	+/-	<i>Salmonella</i> spp. e <i>Campylobacter</i> spp. detectáveis
-	+	+	+/-	<i>Yersinia enterocolitica</i> e <i>Campylobacter</i> spp. detectáveis
+	+	+	+/-	<i>Salmonella</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i> e <i>Campylobacter</i> spp. detectáveis
-	-	-	+	Gene-alvo não detectável
-	-	-	-	Inválido

* + = positivo
- = negativo

Uma amostra é positiva se a amostra de DNA e o **Internal Control** mostrarem um sinal de amplificação no sistema de detecção.

A amostra também é positiva se o DNA da amostra mostrar um sinal de amplificação, mas nenhum sinal de amplificação puder ser visto para o **Internal Control** no sistema de detecção. A detecção do **Internal Control** não é necessária neste caso, porque as altas concentrações de fragmentos amplificados podem causar um sinal fraco ou ausente do **Internal Control**.

Uma amostra é negativa se a amostra de DNA não mostrar um sinal de amplificação, mas um sinal de amplificação for visível para o **Internal Control** no sistema de detecção. A inibição da reação de PCR pode ser excluída através da detecção do **Internal Control**.

Uma amostra é inválida se o DNA da amostra e o **Internal Control** não mostrarem um sinal de amplificação no sistema de detecção. Os inibidores de PCR estão presentes na amostra ou ocorreu um erro durante o processo de extração.

12. Limitações do método

1. O teste RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel detecta o DNA de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* de amostras de fezes humanas não tratadas. Uma conexão entre o nível do valor Ct determinado e a ocorrência de sintomas clínicos graves não pode ser derivada disso. Os resultados obtidos sempre devem ser interpretados em combinação com os sintomas clínicos como um todo.
2. O diagnóstico não deve ser baseado apenas no resultado da análise biológica molecular, mas deve sempre levar em conta a história médica e os sintomas do paciente.
3. Este teste somente é aprovado para processamento automatizado usando o sistema RIDA[®]UNITY.
4. Este teste somente é validado para amostras de fezes.
5. Amostragem, transporte, armazenamento e manuseio inadequado ou carga de patógenos abaixo da sensibilidade analítica do teste podem levar a resultados falso-negativos.
6. A presença de inibidores de PCR pode levar a resultados falsos negativos ou inválidos.
7. Como em todos os testes de diagnóstico *in vitro* baseados em PCR, concentrações extremamente baixas das sequências-alvo que estão abaixo do limite de detecção (LoD 95 %) podem ser detectadas. Os resultados obtidos nem sempre são reproduzíveis.
8. Mutações ou polimorfismos nos locais de ligação do iniciador ou da sonda podem interferir na detecção de variantes novas ou desconhecidas e podem levar a resultados falso-negativos usando o teste RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel.
9. Um resultado positivo nos testes não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. Um resultado positivo indica que os genes-alvo (*Salmonella* spp. (*ttr*), *Yersinia enterocolitica* (*ystA/ystB*), *Campylobacter* spp. (16S rDNA, apenas *C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*)) estão presentes.
10. Este ensaio deve ser realizado em conformidade com o regulamento sobre Boas Práticas Laboratoriais (BPL). Os usuários devem seguir as instruções do fabricante com precisão ao realizar o teste.

13. Características de desempenho

13.1 Características de desempenho clínico

O teste RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR foi comparado num laboratório externo com um teste de referência com marcação CE.

Um total de 405 amostras de fezes de pacientes com sintomas clínicos de infecção gastrointestinal, que foram pré-testados positivos ou negativos para *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica*, foram analisados usando o RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel e o teste de referência com marcação CE.

Os resultados dos patógenos individuais são mostrados nas Tabelas 10 a 12:

Tab. 10: Detecção de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*)

		PCR de referência		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

Sensibilidade relativa (IC 95 %)	91,5 % (85,3 % - 95,7 %)
Especificidade relativa (IC 95 %)	100 % (98,7 % - 100 %)

Tab. 11: Detecção de *Salmonella* spp.

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

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

Tab. 12: Detecção de *Yersinia enterocolitica*

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

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

13.2 Características de desempenho clínico

13.2.1 Limite de detecção (LoD 95 %)

Uma amostra de controle positivo (amostras negativas de fezes, fortificadas) foi medida em cinco etapas de diluição (em etapas de 0,25-log) para cada alvo e matriz com 20 réplicas por etapa em um lote para determinar o LoD. Isto foi seguido por uma análise de probit. Em seguida, o LoD calculado foi confirmado com 20 réplicas por alvo e matriz para a etapa/concentração da diluição calculada.

Para os testes foram utilizadas as seguintes estirpes:

Salmonella typhimurium: ATCC® 14028™

Yersinia enterocolitica: DSM 13030

Campylobacter jejuni: ATCC® 33291™

Campylobacter coli: ATCC® 43478™

Campylobacter lari: DSM 11375

Para detectar o DNA de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* usando o teste RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel, foram identificados os seguintes limites de detecção (LoD) no sistema RIDA®UNITY. Os resultados dessas medições são mostrados na Tabela 13.

Tab. 13: Limite dos resultados de detecção do teste RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel para os parâmetros *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. e *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>: 14.028 CFU*/mL • <i>Campylobacter jejuni</i>: 8.128 CFU*/mL • <i>Campylobacter lari</i>: 2.762 CFU*/mL 	144.212 CFU/mL	102.565 CFU/mL

*CFU: Colony Forming Units

O LoD para o parâmetro *Campylobacter coli* em amostras de fezes foi determinado em 14.028 CFU/mL.

O LoD para o parâmetro *Campylobacter jejuni* em amostras de fezes foi determinado em 8.128 CFU/mL.

O LoD para o parâmetro *Campylobacter lari* em amostras de fezes foi determinado em 2.762 CFU/mL.

O LoD para o parâmetro *Salmonella* spp. em amostras de fezes foi determinado em 144.212 CFU/mL.

O LoD para o parâmetro *Yersinia enterocolitica* em amostras de fezes foi determinado em 102.565 CFU/mL.

13.2.2 Especificidade analítica

Substâncias interferentes

A presença de inibidores de RT-PCR e de substâncias interferentes pode levar a resultados falso-negativos ou inválidos. Portanto, foram investigados os efeitos de várias substâncias que podem existir devido ao seu amplo uso para infecções gastrointestinais ou ocorrência generalizada nas amostras correspondentes. As substâncias que poderiam influenciar significativamente os resultados dos testes foram primeiramente examinadas em uma tela de interferência. Várias substâncias que poderiam estar presentes como resíduos da extração, seja devido ao uso disseminado em infecções gastrointestinais (medicamentos farmacêuticos ou de prescrição) ou devido à ocorrência disseminada nas amostras de controle correspondentes (por exemplo, mucinas na superfície das membranas mucosas ou sangue), foram previamente examinadas em altas concentrações (três vezes a dose diária ou simulação do pior caso).

Não foi encontrada nenhuma interferência para as substâncias listadas na Tabela 14.

Tab. 14: Substâncias potencialmente interferentes

Substância potencialmente interferente	Concentração
Mucina	5 % (v/v)
Sangue humano/hemoglobina	5 % (v/v)
Ácido palmítico/esteárico	40 % (v/v)
Comprimidos revestidos por película de Azithromycin-ratiopharm® 500 mg (azitromicina)	84 mg/mL (p/v)
Comprimidos de carvão	6,0 % (p/v)
Etanol	5 % com base no eluato
Cloreto de guanidínio	5 % com base no eluato

Reatividade cruzada

Foram investigados vários organismos (bactérias, parasitas, fungos e vírus) que são comumente encontrados na matriz das fezes. Os micro-organismos a serem investigados para este ensaio foram escolhidos porque ou eles ocorrem naturalmente em amostras de fezes, ou causam sintomas correspondentes como patógenos gastrointestinais. Para as análises foram usadas culturas bacterianas (entre 10⁶ e 10⁹ CFU/ml) ou culturas fúngicas, sobrenadantes de culturas virais, isoladas ou padrões LGC para os organismos em questão.

A RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR é específica para *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica*. Não foram detectadas reatividades cruzadas com as seguintes espécies (ver Tab. 15):

Tab. 15: Organismos potencialmente reativos cruzados

Organismo	Resultado do teste*		
	<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, estirpe Dugan	-	-	-
Adenovirus 41, humano, estirpe Tak	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	-	-
Astrovirus Tipo 2	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-
<i>Campylobacter fetus</i> subespécie <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>	-	-	-
Estirpe de rotavírus 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 Precisão

A precisão do teste RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel real-time PCR foi determinada para os seguintes níveis de consideração.

Precisão *Intraensaio*: Determinação de 5 amostras de controle usando 20 réplicas cada uma no RIDA®UNITY sob condições idênticas.

Precisão *Interensaio*: Determinação de 5 amostras de controle em 20 execuções em duplicado em 10 dias de trabalho (2 execuções por dia) realizadas por técnicos diferentes em condições reprodutíveis.

Os testes de precisão *intra* e *interensaio* foram realizados utilizando três lotes diferentes.

Os dados de precisão foram obtidos utilizando cinco amostras de controle, bem como o PTC e o NTC pertencentes ao ensaio.

Os coeficientes de variação obtidos de cada medida usando o teste PCR em tempo real do RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel no RIDA®UNITY foram inferiores a 4,19 %.

Tab. 16: Resultados de precisão do teste RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel para *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*).

Ct	Valor médio / CV	Intraensaio			Interensaio			Interlote
		Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do 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/a						

Tab. 17: Resultados para precisão do teste RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel para *Salmonella* spp.

Ct	Valor médio / CV	Intraensaio			Interensaio			Interlote
		Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do 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/a						

Tab. 18: Resultados de precisão do teste RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel para *Yersinia enterocolitica*.

Ct	Valor médio / CV	Intraensaio			Interensaio			Interlote
		Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote do kit 2	Lote 3 do kit	Lotes 1-3 do 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/a						

13.2.5 Reatividade analítica

A reatividade do RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR foi examinada com diversos sorotipos de *Salmonella*, espécies de *Campylobacter* e subespécie de *Yersinia enterocolitica* (ver Tab. 19).

Tab. 19: Testes de reatividade analítica

Estirpe	Concentração	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 × 10 ² CFU/mL	+	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	1,5 × 10 ³ CFU/mL	+	-	-
<i>Campylobacter lari</i> ssp. <i>lari</i>	1,04 × 10 ² CFU/mL	+	-	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Typhi</i>	1,49 × 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Typhimurium</i>	7,7 × 10 ³ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Enteritidis</i>	3,3 × 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Paratyphi A</i>	1,75 × 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Paratyphi B</i>	2,08 × 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Paratyphi C</i>	1,1 × 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Newport</i>	3,1 × 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Heidelberg</i>	5,9 × 10 ³ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Javiana</i>	1,79 × 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Dublin</i>	2,88 × 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Agona</i>	1,91 × 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Choleraesuis</i>	9,6 × 10 ³ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Infantis</i>	1,3 × 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serotipo <i>Montevideo</i>	8,4 × 10 ³ CFU/mL	-	+	-

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

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

- = negativo

14. Histórico de versões

Número da versão	Seção e designação
2022-04-28	Versão da edição

15. Explicação dos símbolos

Símbolos gerais

	Diagnóstico <i>in vitro</i>
	Siga as instruções de uso
	Número do lote
	Data de validade
	Temperatura de armazenamento
	Número do item
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

Símbolos específicos do teste

	Mistura de reação
	Mistura de enzimas
	Controle negativo
	Controle positivo

16. Referências

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