

Check&Trace Salmonella 2.0

Para su uso con los termocicladores de PCR en tiempo real CFX 96 y CFX Opus 96 de Bio-Rad



1 USO PREVISTO

El ensayo Check&Trace Salmonella 2.0 es una prueba de PCR en tiempo real semiautomática y cualitativa diseñada para la confirmación y tipificación de presuntas cepas aisladas de *Salmonella* a partir medios de cultivo enriquecidos. El procedimiento de confirmación permite determinar si un resultado de posible (presunta) *Salmonella* (según la norma ISO-6579-1) es un resultado confirmado de *Salmonella spp.* o un resultado negativo para *Salmonella*. El procedimiento de tipificación genera un resultado de serovariedad o un código de “genovariedad” que define de forma única cada aislado bacteriano analizado.

La prueba se realiza después de un simple paso de preparación de muestras de bacterias procedentes del cultivo. A continuación, la muestra se utiliza como material de preamplificación para un ensayo múltiple de PCR en tiempo real en 6 tubos realizado en los sistemas CFX 96 o CFX Opus 96 de Bio-rad. Para cada PCR múltiple se evalúan la presencia y ausencia de secuencias diana para su confirmación y tipificación, y se genera automáticamente un resultado final utilizando un software específicamente desarrollado para esta prueba.

2 RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

La *Salmonella* es una de las principales causas de intoxicación alimentaria; por este motivo, su detección en alimentos y piensos es obligatoria en muchos países. Los protocolos estándar para la detección de *Salmonella* requieren mucho tiempo y tardan varios días en generar un resultado final positivo o negativo de la prueba. (ISO-6579/1). Si el resultado es positivo para *Salmonella*, muchos países requieren su tipificación adicional para evaluaciones de riesgos epidemiológicos y sanitario. Tradicionalmente, esto se realiza utilizando la serotipificación para los antígenos de proteína flagelar (H) y los lipopolisacáridos somáticos (O) (ISO-6579/3). Sin embargo, la *Salmonella* es antigénicamente compleja con más de 2 400 serovariedades que presentan varias combinaciones de 46 antígenos O y 85 H (3). Por lo tanto, una vez obtenido un resultado positivo, la posterior tipificación adicional de este resultado positivo de *Salmonella* puede tardar de nuevo varios días en completarse, lo que requiere muchos antisueros frente a O y H para la tipificación completa.

La tipificación por ADN difiere de la serotipificación. Con la serotipificación se detecta la presencia de antígenos en la superficie celular y en los flagelos; lo cual se basa en la expresión de genes ubicados en dos segmentos específicos del genoma de la *Salmonella*. La prueba CTS 2.0 detecta la variación genética en 21 loci repartidos por todo el genoma de *Salmonella*, generando genotipos específicos de la bacteria, también denominados genovariedades. La base de datos de CTS 2.0 vincula las genovariedades con una serie de serovariedades de *Salmonella* bien caracterizadas. De este modo, se indicará una genovariedad como resultado de la prueba si no hay una serovariedad establecida para la genovariedad generada por el ensayo CTS 2.0.

Con el ensayo CTS 2.0, la confirmación y tipificación de *Salmonella* se puede realizar en aproximadamente 2,5 horas a partir de bacterias de una placa de agar XLD o agar nutritivo (AN). La presencia de secuencias diana de ADN para tipificación y confirmación se detecta en paralelo con varios controles internos. CTS 2.0 utiliza un proceso de preparación de muestras rápido y sencillo, y minimiza la intervención del operador una vez que las muestras se colocan en el sistema de PCR en tiempo real.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Se genera una lista de trabajo en el portal de análisis de CTS 2.0. Los especímenes de bacterias se recolectan a partir de medios XLD o AN utilizando “muestreadores de colonias” incluidos en el kit CTS 2.0. A continuación, los muestreadores de colonias se colocan en tubos de 1,5 ml previamente rellenos con 200 µl de tampón de muestra. Las bacterias se resuspenden en este tampón y los tubos se cierran y se transfieren a un bloque calefactor precalentado a 98 °C. Los tubos se incuban durante 10 minutos a 98 °C y se dejan enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Este procedimiento genera un lisado sin procesar de los especímenes que liberan el ADN bacteriano en el tampón de muestra. Este lisado crudo es adecuado para el proceso de amplificación en tiempo real de CTS 2.0 sin purificación adicional.

140 µl Del lisado crudo son transferidos a un tubo nuevo previamente relleno con 35 µl de Master Mix de PCR y se mezcla pipeteando arriba y abajo 3 veces. A continuación, se añaden 25 µl de la solución de Master Mix/lisado crudo a cada uno de los 6 tubos de la tira de reactivos de PCR CTS 2.0. Esta tira de reactivos contiene todos los cebadores y sondas de PCR para la amplificación y detección de secuencias diana mediante PCR en tiempo real. Finalmente, la tira de reactivos de PCR se coloca en el instrumento de PCR en tiempo real y se inicia el proceso de amplificación.

Las dianas de ADN amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis (TaqMan®), marcadas en un extremo con un colorante informador fluorescente (fluoróforo) y en el otro extremo con un resto desactivador. Se utilizan sondas marcadas con diferentes fluoróforos para detectar las distintas secuencias diana; así se pueden usar hasta 5 fluoróforos por cada tubo de reacción. El CTS 2.0 puede detectar un total de 27 marcadores de ADN, incluidos 6 controles, utilizando 6 PCR múltiples en tiempo real en paralelo. Los marcadores de control permitirán evaluar la presencia o ausencia de *Salmonella* y detectar fallos en la reacción. La ausencia o presencia de cada uno de los 21 marcadores de ADN restantes genera una “huella genética” exclusiva que se utiliza para determinar el tipo de *Salmonella*.

El ensayo CTS 2.0 utiliza un software específico para la generación de resultados en un proceso de dos pasos. En el primer paso se establece la ausencia y presencia de cada uno de los 27 marcadores de ADN. Esto genera un patrón exclusivo de presencia/ausencia para todos los marcadores de ADN, es decir, la “huella genética”. En un segundo paso, esta “huella genética” se compara con una base de datos que contiene las huellas genéticas de muchas serovariedades de *Salmonella*. Si se encuentra una coincidencia, el software emitirá un resultado de serovariedad de los ensayos de CTS 2.0; si no se encuentra ninguna coincidencia pero se confirma el género de *Salmonella*, se emitirá un resultado de genovariedad.

| Contenido del kit | Cantidad |
|--|---|
| Tiras de reactivos para PCR CTS 2.0 <i>Tiras de PCR (con tapas) con 12 tubos cada una y 6 conjuntos duplicados de sondas fluorescentes y cebadores específicos de diana en formato seco.</i> | 3 bolsas, cada una con 8 tiras de reactivos de PCR con 12 tubos |
| Master Mix para PCR CTS 2.0 <i>Mezcla maestra para PCR con ADN polimerasa, dNTP, tampón de reacción y estabilizadores</i> | 2 tubos con 1 ml cada uno |
| Tampón de muestra | 1 vial con 12 ml |
| Muestreadores de colonias | 90 |

3 EQUIPO Y MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Sistema de PCR en tiempo real CFX 96 o CFX Opus 96 de Bio-Rad
- Mezclador vorticial
- Bloque calefactor para tubos Eppendorf
- Centrífuga para tubos Eppendorf
- Centrífuga para placas de microtitulación
- Soporte para tubos Eppendorf
- Tubos Eppendorf
- Soporte para tiras de reactivos de PCR
- Pipetas y puntas desechables con filtro hidrófobo para volúmenes de 20 a 200 µl
- Bata de laboratorio y guantes desechables sin talco

4 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- El ensayo CTS 2.0 está destinado exclusivamente para su uso en el laboratorio.
- No utilice el kit si la etiqueta de precinto de la caja exterior está rota.
- No utilice los reactivos si al recibirlos las bolsas protectoras están abiertas o rotas.
- Cierre las bolsas protectoras de los reactivos con el cierre hermético inmediatamente después de cada uso. Antes de cerrar las bolsas, elimine el exceso de aire.
- No retire el desecante de las bolsas de reactivos.
- No utilice los reactivos si el desecante no está presente o está roto dentro de las bolsas de reactivos.
- No mezcle reactivos de diferentes bolsas, kits o lotes.
- No utilice reactivos ni materiales caducados.
- No exponga las tiras de reactivos de PCR a una luz excesiva para evitar la degradación de los fluoróforos debido al fotoblanqueo.
- Utilice guantes sin talco y evite dejar huellas dactilares y escribir en las tapas de las tiras de reactivos de PCR.
- Es fundamental una buena técnica de laboratorio para realizar correctamente esta prueba. Debido a la alta sensibilidad analítica de esta prueba, se debe tener extrema precaución para conservar la pureza de todos los materiales y reactivos.
- Para evitar la contaminación por amplicones, no abra las tiras de reactivos para PCR CTS 2.0 después de su uso y deséchelas de inmediato.
- Manipule siempre los especímenes de conformidad con los procedimientos de seguridad del laboratorio para laboratorios microbiológicos.
- Utilice ropa protectora y guantes desechables cuando manipule los reactivos.
- Lávese bien las manos después de realizar el ensayo.
- No fume, beba, mastique ni coma en zonas en las que se manipulan los especímenes o los reactivos del kit.
- Deseche los reactivos no utilizados de conformidad con los reglamentos locales, estatales, provinciales y/o federales.







5 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Los reactivos y componentes del ensayo CTS 2.0 son estables a una temperatura de entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad indicada. No utilice componentes caducados. Las tiras de reactivos para PCR CTS 2.0 se suministran en bolsas herméticas. Para proteger el producto frente a la humedad, cierre de inmediato la bolsa después de haberla abierto.

Las tiras de reactivos para PCR son estables durante un máximo de 30 días a una temperatura de entre 2 y 8 °C después de la apertura inicial de la bolsa y su cierre posterior.

6 INSTRUCCIONES DE USO

Generar una lista de trabajo

1. Inicie sesión en el portal de análisis CTS 2.0 de Check-Points [con](#) una dirección de correo electrónico y una contraseña.
2. Abra el menú haciendo clic en el icono  en la parte superior izquierda.
3. Abra la pestaña de sesiones de análisis haciendo clic en **“Sesiones de análisis”**.
4. Añada una nueva sesión de análisis haciendo clic en el icono  en la parte superior derecha. El identificador global se genera automáticamente y no se puede cambiar. El identificador de análisis personalizado se puede crear en **“Datos”**.
5. Para añadir muestras, haga clic en el icono de la pipeta  e introduzca la información de la muestra. Los **“Nombres de las muestras”** son obligatorios; también puede introducirse información adicional como **“Ubicación de la muestra”**, **“Lote de producción”**, **“Origen de la muestra”**, **“Dispositivo de muestreo”** y **“Fecha de muestreo”**.
6. Haga clic en **“Guardar + Nuevo”** para ir a la siguiente muestra y continuar hasta la muestra final y, a continuación, haga clic en **“Guardar”**.
7. También puede hacer clic en el icono de importación de muestras  para cargar un archivo CSV o XLSX con información de las muestras. El formato de archivo se puede descargar usando el botón de exportación .
8. Continúe para seleccionar más información en la sección **“Datos”**. La **“ID del termociclador de PCR en tiempo real”** y el **“Número de lote del kit”** son obligatorios, el **“Identificador de análisis personalizado”** y las **“Notas de la sesión de análisis”** son opcionales.
9. Haga clic en **“Guardar sesión de análisis”** para guardar toda la información del análisis.
10. Vuelva a abrir la sesión de análisis y haga clic en **“Descargar archivo de análisis cfx”**. Así se genera el archivo de análisis para iniciar la PCR en tiempo real en el paso **“Funcionamiento del sistema de PCR”**.
11. A continuación, descargue e imprima una lista de trabajo para su uso en el laboratorio haciendo clic en el icono  en la parte superior derecha.
12. Continúe con la preparación de las muestras.

Preparación de muestras

NOTA: Se utiliza una (1) tira de reactivos de PCR para dos (2) muestras. En caso de que el número de muestras sea impar, complemente con muestras de una cepa de control (referencia).

1. Encienda el bloque calefactor a **98 °C**.
2. Añada **200 µl** de tampón de muestra en un tubo de 1,5 ml. Use un tubo diferente para cada muestra y escriba la muestra ID de la muestra en el tubo.
3. Atreviese una única colonia del agar con el muestreador de colonias. Toque ligeramente el fondo de la placa y saque el muestreador. Mantenga siempre el muestreador de colonias en posición vertical como se muestra en la Figura 1.

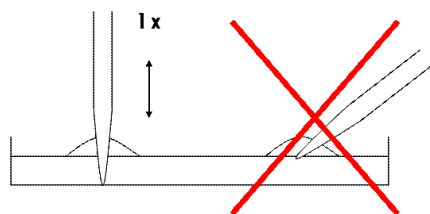


Figura 11: Técnica correcta de muestreo

- Coloque el muestreador de colonias en el tubo de 1,5 ml con **200 µl** de tampón de muestra y gire el muestreador entre el pulgar y el índice al menos 5 veces de un lado a otro manteniéndolo dentro del tampón.
- Retire y deseche el muestreador de colonias.
- Cierre el tubo y mezcle brevemente en el agitador vorticial.
- Coloque los tubos en el bloque calefactor precalentado e incube la muestra durante **10 minutos a 98 °C**.
- Mezcle los tubos en el agitador vorticial y colóquelos en la mesa de laboratorio para que se enfríen a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos. Si las muestras no se utilizan inmediatamente después, centrifúguelas brevemente y almacene los tubos a -20 °C.
- Continúe con “Configuración de PCR en tiempo real”.

Configuración de PCR en tiempo real

NOTA: Las muestras a -20 °C deben colocarse a temperatura ambiente durante 15 minutos, mezclarse en el agitador vorticial y centrifugarse brevemente.

- Añada **35 µl** de Master Mix en un tubo de 1,5 ml. Use un tubo diferente para cada muestra y escriba la muestra ID de la muestra en el tubo.
- Centrifugue brevemente las muestras del paso anterior (Preparación de muestras) y añada **140 µl** de muestra al Master Mix. Mezcle pipeteando arriba y abajo suavemente 3 veces.
- Saque la cantidad necesaria de tiras de reactivos de PCR de sus bolsas protectoras. Retire el exceso de aire y cierre las bolsas con el cierre hermético. Etiquete el extremo de cada tira de reactivo de PCR con la identificación del espécimen adecuado.
- Retire las tapas de las tiras con cuidado y manténgalas separadas.

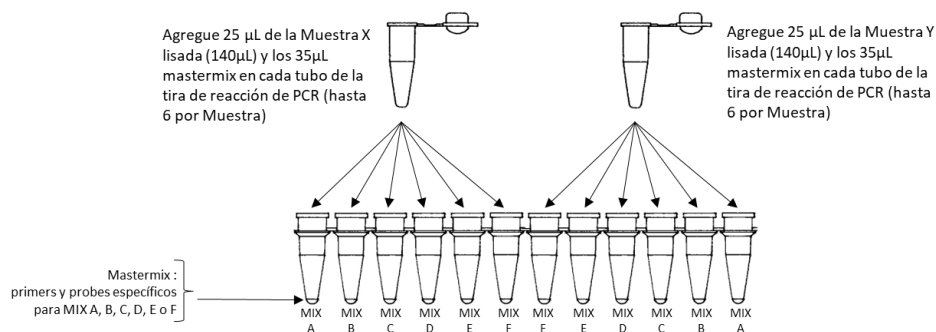


Figura 22 Esquema de pipeteo de especímenes de muestra/mezcla maestra

- Transfiera **25 µl** del primer espécimen de muestra/Master Mix al tubo 1 de la tira de reactivos de PCR (Figura 22). Repita el proceso para los tubos 2 a 6.
- Transfiera **25 µl** del segundo espécimen de muestra/Master Mix al tubo 7 con su tira de reactivos de PCR. Repita el proceso para los tubos 8 a 12 (Figura 22).
- Continúe hasta que todos los especímenes de muestra/Master Mix se hayan transferido a sus tiras reactivas de PCR.
- Vuelva a colocar con cuidado las tapas de las tiras en las tiras correspondientes. Asegúrese de que las tapas de las tiras estén herméticamente cerradas para evitar la evaporación durante la PCR y centrifugue las muestras brevemente.
- Encienda el sistema de PCR y el ordenador.
- Abra la tapa del termociclador de PCR en tiempo real.
- Coloque las tiras de reactivos de PCR en el aparato de PCR utilizando la lista de trabajo creada en la sección “Generar una lista de trabajo”. Si es necesario, coloque tiras de reactivos de PCR “ficticias”

de acuerdo con la lista de trabajo para distribuir las tiras uniformemente sobre el bloque de calefactor de PCR.

12. Cierre la tapa del termociclador de PCR en tiempo real.
13. Continúe con “Funcionamiento del sistema de PCR”.

Funcionamiento del sistema de PCR

NOTA: Se requiere un ordenador conectado al termociclador para usar el archivo LIMS.

1. Inicie el software Bio-Rad CFX Manager.
2. Haga clic en “Archivo”, vaya a “Abrir” y haga clic en “Abrir archivo del LIMS”. A continuación, importe el archivo de análisis CFX desde el portal de análisis CTS 2.0 de Check-Points.
3. Haga clic en “Inicio” para iniciar el análisis.
4. Al final del análisis, guarde el archivo de datos (extensión .PCRD) en una ubicación de red específica o en un dispositivo USB.

Procesamiento de datos y resultados




1. Inicie sesión en el portal de análisis de CTS 2.0 de Check-Points.
2. Abra la sesión de análisis generada en la sección “Generar una lista de trabajo”.
3. Haga clic en la pestaña “Cargar archivo de resultados CFX” y cargue el archivo .pcrd que contiene los datos de análisis de PCR.
4. Haga clic en el bñer que aparece o en el icono  para iniciar el procesamiento de datos.
5. El procesamiento de datos se ejecuta en segundo plano y no es necesario mantener la ventana abierta. El procesamiento tardará entre 5 y 10 minutos y los resultados aparecerán automáticamente. Si no aparecen los resultados, actualice el navegador una vez (F5) y compruebe la pestaña “Mensajes”.
6. Los informes se pueden imprimir haciendo clic en la pestaña “Informes”. Use las casillas de verificación para seleccionar resultados para su impresión y utilice  para descargar informes individuales o  para descargar un informe de resumen.
7. En la **Tabla 11** a continuación se muestran los resultados e interpretaciones que se pueden obtener.

Tabla 11 Interpretación de los resultados de la prueba de CTS

| Resultado de la prueba notificado | Interpretación del resultado | Siguiente paso |
|---|---|---|
| Serovariedad de <i>Salmonella</i> | Resultado positivo para <i>Salmonella</i> y serovariedad | Resultado final |
| <i>Salmonella</i> Serovariedad 1 o serovariedad 2 | Resultado positivo para <i>Salmonella</i> con dos posibles resultados de serovariedades | Resultado final |
| Positivo para <i>Salmonella</i> , genovariedad | Resultado positivo para <i>Salmonella</i> con código de genovariedad | Repita la muestra una vez con nuevo aislado |
| Resultado de tipificación no concluyente, positivo para <i>Salmonella</i> | Resultado positivo para <i>Salmonella</i> sin tipificación | Repita la muestra una vez con nuevo aislado |
| No es <i>Salmonella</i> | Bacterias gramnegativas detectadas pero no es <i>Salmonella</i> | Resultado final |
| No se ha detectado ADN | No se han detectado bacterias gramnegativas | Repita la muestra una vez con nuevo aislado |
| La reacción no es correcta | Fallo en la reacción: muestra inhibidora o fallo en el reactivo; sin amplificación de control interno | Repita la muestra una vez con nuevo aislado |

Repetición del procedimiento

En las siguientes circunstancias, se recomienda repetir la muestra de nuevo con un aislado nuevo recién obtenido:

- Positivo para *Salmonella* con código de genovariedad
- Resultado positivo para *Salmonella* con tipificación no concluyente
- No se ha detectado ADN
- La reacción no es correcta

Se puede obtener un resultado positivo de *Salmonella* con código de genovariedad o tipificación no concluyente en caso de que uno (1) de los 21 marcadores de tipificación haya dado un resultado erróneo generando un código de genovariedad, para el cual no existe asociación con una serovariedad conocida en la base de datos de CTS 2.0. Esto es poco frecuente para marcadores individuales, pero significativo para el total de los 21 marcadores de tipificación. Al repetir de nuevo la muestra se generará un resultado de serovariedad si se ha producido este problema específico, y debe anotarse como el resultado final. Es posible que el resultado inicial de genovariedad o de tipificación no concluyente sea el resultado correcto, por lo que la repetición del ensayo generará el mismo resultado en estos casos.

También se recomienda repetir la muestra de nuevo en caso de “La reacción no es correcta” o “No se ha detectado ADN” con un aislado recién obtenido. A menudo estos resultados se deben a condiciones de reacción no óptimas o a impurezas en la muestra. En muchos casos, repetir la reacción con un aislado nuevo recién obtenido generará un resultado adecuado en la segunda ocasión.

Es posible que el ensayo Check&Trace Salmonella 2.0 no genere una confirmación o un resultado de tipificación concluyente, incluso después de repetir la prueba. En tal caso, se recomienda utilizar un método alternativo para obtener el resultado final de la prueba (1,2).

7 CONTROL DE CALIDAD

Los procedimientos de control de calidad permiten supervisar el rendimiento del ensayo. Los laboratorios deben establecer la cantidad, el tipo y la frecuencia de las pruebas de los materiales de control de acuerdo con las directrices o los requisitos de las normativas locales, provinciales, estatales y/o federales o las organizaciones de acreditación para supervisar todo el proceso analítico.

En el ensayo CTS 2.0 no se utilizan controles positivos y negativos externos para la interpretación de los resultados de la prueba. El ensayo CTS 2.0 cuenta con un total de 6 controles internos para supervisar posibles fallos de reacción. Sin embargo, se recomienda analizar muestras de control a diario hasta que se logre una validación adecuada del proceso. La reducción en la frecuencia de las pruebas de control deberá realizarse de conformidad con las normativas aplicables.

Los controles externos deberán producir los resultados esperados: la serovariedad de *Salmonella* para el control positivo externo y “No es *Salmonella*” para el control negativo externo. Cualquier otro resultado en los controles externos es indicativo de un fallo del sistema.

En la Tabla 22 a continuación se especifican una serie de cepas de referencia que pueden utilizarse como controles externos positivos o negativos. También se pueden utilizar otras cepas de control para la que se disponga de resultados de la prueba bien documentado.

Tabla 22 Cepas disponibles en el mercado para controles externos positivos y negativos

| Cepa de control externo | Resultado de prueba |
|--|--|
| <i>Salmonella enterica subesp. enterica serovar</i> Enteritidis (NCTC 12694) | <i>Salmonella enteritidis</i> |
| <i>Salmonella enterica subesp. enterica serovar</i> Typhimurium (NCTC 10413) | <i>Salmonella typhimurium</i> |
| <i>Salmonella enterica subesp. enterica serovariedad</i> Typhimurium (monofásica); I 4,5,12:i:- (NCTC 13952) | <i>Salmonella typhimurium</i> monofásica |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) | No es <i>Salmonella</i> |

8 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Este producto solo se puede utilizar en los sistemas CFX-96 o CFX Opus 96 de Bio-Rad.
- Pueden obtenerse resultados erróneos debido a la recolección, manipulación y almacenamiento inadecuados de las muestras, errores técnicos y confusión con las muestras.
- Si los resultados de CTS 2.0 son “Positivo para *Salmonella* y código de genovariedad”, “Resultado de tipificación no concluyente, positivo para *Salmonella*”, “No se ha detectado ADN” o “La reacción no es correcta”, entonces la prueba debe repetirse con un aislado nuevo recién obtenido.
- En las pruebas y análisis de inclusión se han determinado que es posible detectar las siguientes serovariedades de *Salmonella*: Abaetetuba, Agona, Alachua, Albany, Anatum, Bovismorbificans, Braenderup, Brandenburg, Bredeney, Cerro, Choleraesuis, Corvallis, Cubana, Derby, Dublin, Enteritidis, Gallinarum Gallinarum, Gallinarum Pullorum, Give, Goldcoast, Hadar, Havana, Heidelberg, Idikan, Infantis, Javiana, Kentucky, Livingstone, London, Mbandaka, Minnesota, Molade, Montevideo, Muenchen, Muenster, Newport, Ohio, Oranienburg, Orion, Ouakam, Panama, *paratyphi B* (posiblemente Java), Poona, Reading, Rissen, Saintpaul, Sandiego, Schwarzengrund, Senftenberg, Stanley, Tennessee, Thompson, Typhimurium, Uganda, Virchow, Worthington, Yoruba, variante monofásica de *Salmonella typhimurium* (1,4,[5],12:i:-), 4,[5],12:d:-. Otras serovariedades de *Salmonella* generarán un código de genovariedad. En algunos casos, CTS 2.0 puede indicar “Positivo para *Salmonella* con serovariedad A o serovariedad B”.
- Las mutaciones o los polimorfismos en las regiones de unión del cebador o la sonda pueden afectar a la detección de determinadas variantes de secuencia (tipos de secuencias) de las serovariedades incluidas en el ensayo CTS 2.0. En tales casos, CTS 2.0 indicará un código de genovariedad en lugar del resultado de serovariedad.
- CTS 2.0 no puede discriminar especies o subespecies de *Salmonella*; es decir, las especies *bongori* y *enterica* y las subespecies de *enterica arizonae*, *diarizonae*, *enterica*, *houtenae*, *indica* y *salamae*. En todos estos casos, el resultado de CTS 2.0 será “Positivo para *Salmonella* con código de genovariedad”.
- CTS 2.0 es una prueba cualitativa y no proporciona valores cuantitativos ni indica la cantidad de organismos presentes.
- El rendimiento del CTS 2.0 se ha evaluado en agar nutritivo y agar XLD. Otros medios deberán evaluarse por separado para que cualquier laboratorio verifique el rendimiento adecuado en dichos medios.

9 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

General

La validación del ensayo CTS 2.0 fue realizada por Microval Expert Laboratory WFC, Arkel, Países Bajos, bajo la supervisión del Comité Técnico de Microval (CTMV). Se utilizó la norma ISO-16140, parte 6, como estándar para redactar el protocolo y preparar el informe, incluidos los criterios de aceptación. Se utilizaron las normas ISO-6579/1 e ISO-6579/3 como métodos de referencia para la confirmación y tipificación, respectivamente. La validación del ensayo constaba de dos partes principales: 1) un estudio de comparación de métodos (ECM) y 2) un estudio interlaboratorio (ILS). El ECM se llevó a cabo utilizando bacterias de los dos medios, agar nutritivo (AN) y agar XLD (XLD) en dos plataformas de PCR en tiempo real, Bio-Rad CFX 96 y Bio-Rad CFX Opus 96. El ILS se llevó a cabo con un único medio, XLD, utilizando Bio-Rad CFX 96 o Bio-Rad CFX Opus 96, cualquiera que estuviera disponible en los diferentes centros del ILS.

Estudio de confirmación de inclusión

Se realizó un estudio de inclusión para la confirmación de *Salmonella* conforme a la norma ISO-16140_6. Se utilizaron un total de 150 cepas de *Salmonella* previamente caracterizadas. En la

Tabla 33 a continuación se muestran los resultados para la confirmación de *Salmonella* a partir de estas cepas.

Tabla 33 Resultados de 150 cepas de *Salmonella* para la confirmación de su presencia; es decir, el resultado es "Serovariedad de *Salmonella*", "Genovariedad de *Salmonella*" o "Resultado de tipificación no

concluyente, positivo para *Salmonella*", en dos medios, agar nutritivo (AN) y agar XLD, y dos plataformas de PCR, Bio-Rad CFX 96 y Bio-Rad CFX Opus 96.

| Número de cepas | Sistema de qPCR | Medio | Concordancia de inclusión | Discordancia de inclusión |
|-----------------|---------------------|-------|---------------------------|---------------------------|
| 150 | Bio-Rad CFX 96 | AN | 150 | 0 |
| | | XLD | 150 | 0 |
| | Bio-Rad CFX OPUS 96 | AN | 150 | 0 |
| | | XLD | 150 | 0 |

En resumen, se confirmó que las 150 cepas de *Salmonella* eran realmente *Salmonella* según el ensayo CTS 2.0 en ambos sistemas y con ambos medios.

Estudio de confirmación de exclusión

Se realizó un estudio de exclusión para la confirmación de no *Salmonella* conforme a la norma ISO-16140_6. Se utilizaron un total de 102 cepas no *Salmonella* previamente caracterizadas. En la Tabla 44 a continuación se muestran los resultados para la confirmación de no *Salmonella* a partir de estas cepas.

Tabla 44 Resultados de 102 cepas para la confirmación de no Salmonella; es decir, el resultado es "No es Salmonella", en dos medios, agar nutritivo y agar XLD, y dos plataformas de PCR, Bio-Rad CFX 96 y Bio-Rad CFX Opus 96. Tenga en cuenta que los números pueden variar ligeramente en caso de no proliferación en XLD

| Número de cepas | Sistema de qPCR | Medio | Concordancia de exclusión | Discordancia de exclusión |
|-----------------|---------------------|-------|---------------------------|---------------------------|
| 102 | Bio-Rad CFX 96 | AN | 102 | 0 |
| | | XLD | 95 | 0 |
| | Bio-Rad CFX OPUS 96 | AN | 101 | 0 |
| | | XLD | 96 | 0 |

En resumen, todas las cepas que no eran de *Salmonella* con un resultado de prueba concluyente fueron confirmadas como no *Salmonella* por el ensayo CTS 2.0 en ambos sistemas y con ambos medios.

Estudio de tipificación de inclusión

Se realizó un estudio de inclusión para la tipificación de *Salmonella* conforme a la norma ISO-16140_6. Se utilizaron un total de 315 cepas de *Salmonella* previamente caracterizadas de 59 serovariedades diferentes. En la Tabla 55 a continuación se muestran los resultados de la tipificación de *Salmonella* a partir de estas cepas.

Tabla 55 Resultados de 315 cepas de serovariedades de Salmonella para su tipificación, es decir, el resultado es "Serovariedad de Salmonella", en dos medios, agar nutritivo (AN) y agar XLD, y dos plataformas de PCR, Bio-Rad CFX 96 y Bio-Rad CFX Opus 96. En algunas cepas se obtuvo un resultado no concluyente. Tenga en cuenta que la "genovariedad de Salmonella" se consideró como un resultado de tipificación no concluyente para la tipificación de inclusión.

| Número de cepas | Sistema de qPCR | Medio | Concordancia de inclusión | Discordancia de inclusión |
|-----------------|---------------------|-------|---------------------------|---------------------------|
| 315 | Bio-Rad CFX 96 | AN | 311 | 0 |
| | | XLD | 300 | 0 |
| | Bio-Rad CFX OPUS 96 | AN | 308 | 1 |
| | | XLD | 309 | 1 |

En resumen, 1208 de los 1210 resultados de la prueba de serovariedad de *Salmonella* coincidieron con los resultados esperados de la prueba. Dos (2) resultados de la prueba de serovariedad de *Salmonella* no coincidieron con los resultados esperados, una cepa de *Salmonella* Poona se notificó como *Salmonella* Abaetetuba con el CFX Opus 96 en ambos medios.

Estudio de tipificación de exclusión

Se realizó un estudio de exclusión para la tipificación de *Salmonella* conforme a la norma ISO-16140_6. Se utilizaron un total de 104 cepas, 78 serovariedades de exclusión de *Salmonella* y 26 de *Enterobacteriaceae* no *Salmonella*. En la Tabla 66 a continuación se muestran los resultados de las pruebas realizadas con estas cepas.

Tabla 66 Resultados combinados de las pruebas para 78 cepas de exclusión de serovariedades de *Salmonella* y 26 cepas de *Enterobacteriaceae* no *Salmonella* en dos medios, agar nutritivo (AN) y agar XLD, y dos plataformas de PCR, Bio-Rad CFX 96 y Bio-Rad CFX Opus 96. En algunas cepas se obtuvo un resultado no concluyente. Tenga en cuenta que las serovariedades de exclusión de *Salmonella* deben dar un resultado "Concordancia de exclusión" para las genovariedades.

| Número de cepas | Sistema de qPCR | Medio | Concordancia de exclusión | Discordancia de exclusión |
|-----------------|---------------------|-------|---------------------------|---------------------------|
| 104 | Bio-Rad CFX 96 | AN | 103 | 1 |
| | | XLD | 102 | 0 |
| | Bio-Rad CFX OPUS 96 | AN | 101 | 2 |
| | | XLD | 102 | 1 |

En resumen, 408 de los 412 resultados de las pruebas mostraron concordancia con el resultado esperado, "Genovariedad de *Salmonella*" para serovariedades de exclusión de *Salmonella* y "No es *Salmonella*" para *Enterobacteriaceae* no *Salmonella*. Cuatro (4) serovariedades de exclusión de *Salmonella* dieron un resultado incorrecto, es decir, "Serovariedad de *Salmonella*" en lugar de "Genovariedad de *Salmonella*". *Salmonella* Coeln se notificó como "*Salmonella* Saintpaul" en AN con ambos sistemas de PCR. *Salmonella* Matopeni se notificó como "*Salmonella* Braenderup" en CFX Opus 96 con ambos medios.

Estudio interlaboratorio

Se enviaron 30 cepas bacterianas a 15 colaboradores de 13 centros participantes en el estudio interlaboratorio (ILS) que incluían 16 serovariedades de inclusión de *Salmonella*, 4 serovariedades de exclusión de *Salmonella*, una (1) serovariedad de *Salmonella enterica subesp. arizonae*, una (1) *Salmonella bongori* y 8 *Enterobacteriaceae* no *Salmonella*. Se usaron 24 de los 30 resultados de prueba para el estudio de confirmación del ILS y otro grupo de 24 de los 30 resultados de prueba para el estudio de tipificación del ILS; por lo tanto, se usó un grupo de 18 resultados de prueba tanto para tipificación como para la confirmación. Las pruebas de referencia solo se realizaron para la parte de confirmación del estudio. Las pruebas se realizaron con agar XLD utilizando exclusivamente los sistemas de PCR de los colaboradores; es decir, 11 sistemas Bio-Rad CFX 96 y 4 sistemas Bio-Rad CFX Opus 96.

Estudio de confirmación del ILS

Los datos de 13 de los 15 colaboradores se incluyeron en el ILS, un colaborador no informó de los datos a tiempo y el otro no respetó las instrucciones de uso. En la Tabla 7 a continuación se muestran los resultados del estudio de confirmación de ILS para los 13 colaboradores.

Tabla 77 Resultados de las pruebas para la confirmación del ILS, 16 cepas de inclusión y 8 cepas de exclusión, todas Enterobacteriaceae no Salmonella.

| Colaborador | Confirmación de inclusión | | Confirmación de exclusión | |
|--------------|---------------------------|----------------|---------------------------|----------------|
| | Método de referencia | CTS 2.0 | Método de referencia | CTS 2.0 |
| 1 | 16/16 | 15/16 | 8/8 | 8/8 |
| 2 | 16/16 | 16/16 | 8/8 | 8/8 |
| 3 | 16/16 | 16/16 | 7/8 | 8/8 |
| 4 | 16/16 | 16/16 | 8/8 | 8/8 |
| 5 | 16/16 | 16/16 | 8/8 | 8/8 |
| 6 | 16/16 | 16/16 | 8/8 | 8/8 |
| 7 | 16/16 | 16/16 | 8/8 | 8/8 |
| 8 | 16/16 | 15/16 | 7/8 | 8/8 |
| 9 | 16/16 | 16/16 | 8/8 | 8/8 |
| 10 | 16/16 | 16/16 | 8/8 | 8/8 |
| 11 | 16/16 | 16/16 | 8/8 | 8/8 |
| 12 | 16/16 | 16/16 | 8/8 | 8/8 |
| 13 | 16/16 | 16/16 | 8/8 | 8/8 |
| Total | 208/208 | 206/208 | 102/104 | 104/104 |

En resumen, 310 de los 312 resultados de prueba para la confirmación de CTS 2.0 coincidieron con el resultado esperado. Dos (2) de las 312 muestras no dieron un resultado concluyente. No se notificaron resultados discordantes de las pruebas.

Estudio de tipificación del ILS

Los datos de 13 de los 15 colaboradores se incluyeron en el ILS, un colaborador no informó de los datos a tiempo y el otro no respetó las instrucciones de uso. En la Tabla 88 a continuación se muestran los resultados del estudio de tipificación del ILS para estos 13 colaboradores.

Tabla 88 Resultados de las pruebas para tipificación, 16 cepas de inclusión y 8 cepas de exclusión; es decir, 4 serovariedades de exclusión de Salmonella y 4 Enterobacteriaceae no Salmonella.

| Colaborador | Inclusión de tipificación | | Exclusión de tipificación | |
|-------------|---------------------------|---------|---------------------------|---------|
| | Método de referencia | CTS 2.0 | Método de referencia | CTS 2.0 |
| 1 | n.p. | 15/16 | n.p. | 8/8 |
| 2 | n.p. | 16/16 | n.p. | 8/8 |
| 3 | n.p. | 16/16 | n.p. | 7/8 |
| 4 | n.p. | 16/16 | n.p. | 8/8 |
| 5 | n.p. | 14/16 | n.p. | 8/8 |
| 6 | n.p. | 16/16 | n.p. | 8/8 |
| 7 | n.p. | 16/16 | n.p. | 8/8 |

| Colaborador | Inclusión de tipificación | | Exclusión de tipificación | |
|--------------|---------------------------|----------------|---------------------------|----------------|
| | Método de referencia | CTS 2.0 | Método de referencia | CTS 2.0 |
| 8 | n.p. | 14/16 | n.p. | 8/8 |
| 9 | n.p. | 16/16 | n.p. | 8/8 |
| 10 | n.p. | 16/16 | n.p. | 8/8 |
| 11 | n.p. | 16/16 | n.p. | 8/8 |
| 12 | n.p. | 16/16 | n.p. | 8/8 |
| 13 | n.p. | 16/16 | n.p. | 8/8 |
| Total | n.p. | 203/208 | n.p. | 103/104 |

En resumen, 306 de los 312 resultados de prueba para la tipificación de CTS 2.0 coincidieron con el resultado esperado. Seis (6) de las 312 muestras no dieron un resultado concluyente. No se notificaron resultados discordantes de las pruebas.

Resumen del Certificado MicroVal



Por la presente, MicroVal declara que la evaluación de certificación ha demostrado que Check & Trace Salmonella 2.0 (CTS 2.0) ha sido validado y se presenta como mínimo equivalente al método de referencia, según muestra el informe del estudio de validación. El resumen del informe de validación está disponible en el sitio web de Microval: www.microval.org

Métodos de referencia: ISO-6579-1:2017 e ISO/TR 6579-3:2014.

Alcance: Confirmación de presuntos aislados de *Salmonella* a partir de agares AN no selectivo y XLD selectivo, así como tipificación de 59 serovariedades de *Salmonella*.



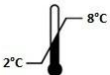



La validación y certificación se han realizado de acuerdo con la norma ISO 16140-6:2019 y el esquema de certificación y normas de MicroVal versión 9.1

Número de certificado: 2021LR07

10 REFERENCIAS

1. ISO 6579-1. Microbiology of the food chain – Horizontal method for detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella* spp. [ISO 6579-1:2017].
2. ISO 6579-3. Microbiology of the food chain – Horizontal method for detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 3: Guidelines for serotyping of *Salmonella* spp. [ISO 6579-3:2014].
3. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. Grimont, P.A.D. and Weill, F.X. Vol.9, 2007.
4. ISO 16140-1:2016 Microbiology of the food chain – Method validation – Part 1: Vocabulary.
5. ISO 16140-6:2016 Microbiology of the food chain – Method validation – Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures.

11 GLOSARIO DE SÍMBOLOS

| Símbolo | Significado |
|---|--|
|  | Fabricante |
|  | Contiene suficiente para <n> pruebas |
|  | Límite de temperatura |
|  | Consultar las instrucciones de uso En caso de instrucciones de uso electrónicas, se ha añadido la URL al símbolo. |
|  | Mantener seco |
|  | Mantener alejado de la luz |

