

Procedimiento de la OIE para la validación y la certificación de pruebas de diagnóstico Aprobación de la OIE de la solicitud para un nuevo protocolo abreviado para Check&Trace Salmonella (CTS)

Resumen de los estudios de validación: Datos suplementarios

Nombre del kit de diagnóstico: Check&Trace Salmonella Fabricante: Check-Points B.V.
--

Contenido

Información general sobre Check&Trace Salmonella	53
1. INFORMACION ACERCA DEL KIT	54
2. Resumen de los estudios de validación suplementarios	54
2.1 Tránsito	54
2.2 Objetivos de este estudio	54
2.3 Materiales y métodos	55
2.4 Resultados: Estudio de comparación de los protocolos	55
2.4.1 Comparación de la sensibilidad de ambos protocolos para identificar serovares de <i>Salmonella</i>	55
2.4.2 Ensayo de repetibilidad del protocolo abreviado	56
3. Conclusiones	57
4. Publicaciones	57

Información general sobre Check&Trace Salmonella

Enfermedad: Salmonellosis

Agente patógeno: *Salmonella* spp.

Tipo de análisis: El kit Check&Trace Salmonella (CTS) es una reacción multiplex LDR PCR seguida de la detección en una micromatriz diagnóstica.

Finalidad del análisis: Certificado por la OIE como apto para la confirmación (molecular) y el serotipado rápidos de presuntas *Salmonella* spp. de los siguientes 22 serotipos (utilizando el protocolo de prueba abreviado):

Agona, Anatum, Bredeney, Derby, Dublin, Enteritidis, Hadar, Heidelberg, Indiana, Infantis, Kottbus, Mbandaka, Montevideo, Newport, Paratyphi B, Paratyphi B v. Java, Saintpaul, Senftenberg, Tennessee, Typhimurium (y su variante monofásica 1,4,[5],12:i:-) y Virchow.

Especie y muestra: para la especie, véase la finalidad del análisis más arriba. Se puede usar la prueba para confirmar e identificar cepas que se cree que pertenecen a *Salmonella*. Estos aislados se pueden haber obtenido usando una gama de pruebas de *Salmonella* aplicadas de forma regular.

Si se usa el método ISO para *Salmonella* (ISO 6579), se deben tomar las muestras de aislados de un cultivo puro en el medio agar nutritivo (paso 9.5.2. de la norma ISO) para confirmar «*Salmonella*» y para la tipificación con CTS.

El medio en el que se cultivan no es relevante. La validación se ha realizado usando agar no selectivo (agar nutritivo), pero el resultado de la prueba es independiente del medio utilizado (véase la referencia: A. Brisabois – MedVetNet junio de 2008).

Solo se pueden enviar cultivos puros para la tipificación con CTS. Si hay dos cepas en el mismo aislado, el resultado será un genovar desconocido que combina los resultados de dos serotipos diferentes. Es necesario purificar el cultivo antes de realizar de nuevo la prueba CTS. Si el resultado del CTS sigue siendo un genovar desconocido, se recomienda enviar el cultivo a un laboratorio de referencia para el serotipado, ya que probablemente se trate de un serotipo no incluido en la base de datos del CTS.

Se debe realizar un cultivo reciente de las cepas antes de la prueba. El almacenamiento a largo plazo y las condiciones de envío habituales para *Salmonella* también son adecuados en este caso.

- 1. Información acerca del kit:** Se puede pedir información general acerca del kit en info@check-points.com. Las preguntas más técnicas se pueden enviar a serovar@check-points.com.
- 2. Resumen de los estudios de validación suplementarios**

2.1 Trasfondo

Check&Trace Salmonella (CTS) es un kit de diagnóstico molecular que permite un serotipado rápido y preciso de *Salmonella*. Tras la validación ampliada, el CTS obtuvo el certificado OIE en 2011. Este documento facilita datos suplementarios para el estudio de validación original a fin de revisar las instrucciones de uso para el kit en su versión registrada en la Secretaría de la OIE a cargo del registro de los kits de diagnóstico. Los experimentos de este documento demuestran que no se han observado diferencias en el rendimiento del kit (p. ej. sensibilidad y repetibilidad) al adoptar el protocolo abreviado.

2.2 Objetivos de este estudio

El objetivo de este estudio era proporcionar datos de validación suplementarios para Check&Trace Salmonella (CTS). En este estudio se compararon unas instrucciones de uso abreviadas para el kit con las instrucciones de uso originales para el kit previamente aprobadas. Este nuevo protocolo abreviado cambia varios pasos en todas las instrucciones de uso a fin de ahorrar 59 minutos en total en comparación con las instrucciones de uso originales (véase la Tabla 1).

Tabla 1: Lista de cambios en el protocolo

	Protocolo normal	Protocolo breve	Ahorro de tiempo
Lisis	15 min	5 min	10 min
A	24 x 5 min	25 x 4 min	20 min
B	45 min	30 min	15 min
C	Sin cambios	Sin cambios	
D: 1.º lavado	2 x 2 min	2 x 1 min	2 min
D: 1.º bloqueo	5 min	3 min	2 min
D: 2.º bloqueo	10 min	5 min	5 min
D: Conjugación	15 min	12 min	3 min
D: 2.º lavado	2 x 2 min	2 x 1 min	2 min
			59 min

2.3 Materiales y métodos

Este estudio se realizó usando el kit CTS y todos sus componentes de la manera descrita en el estudio de validación original de la OIE en 2011 y en el manual del CTS. Todos los experimentos de este estudio se realizaron usando el mismo lote de estos componentes.

2.4 Resultados: Estudio de comparación de los protocolos

2.4.1 Comparación de la sensibilidad de ambos protocolos para identificar serovars de *Salmonella*

El primer objetivo de este ensayo fue comparar la sensibilidad de ambos protocolos para identificar correctamente los serovars de *Salmonella*. Los aislados usados para este ensayo se serotiparon de acuerdo con el esquema de White-Kauffman-LeMinor en un laboratorio de referencia acreditado. Para alcanzar este objetivo se seleccionaron veintidós serotipos únicos representados por 110 cepas (Tabla 2). Cada cepa se analizó dos veces, lo cual dio lugar a 220 pruebas independientes. En la Tabla 3 se muestra un resumen de los resultados. A partir de esta tabla se pueden sacar las siguientes conclusiones: 110 pruebas de un total de 110 (100 %) dieron resultados correctos con el protocolo normal y 110 pruebas de un total de 110 (100 %) con el protocolo breve.

Tabla 2: Lista de serovars usados para el estudio

Serotipo aprobado en la solicitud original del OIE (2011)	Serotipo	Incluido en este estudio	Número de cepas
1,4,[5],12:i:-	1	Si	5
Agona	2	Si	5
Anatum	3	Si	5
Bredeney	4	Si	5
Derby	5	Si	5
Dublin	6	Si	5
Enteritidis	7	Si	5
Hadar	8	Si	5
Heidelberg	9	Si	5
Indiana	10	Si	5
Infantis	11	Si	5
Kottbus	12	Si	5
Mbandaka	13	Si	5
Montevideo	14	Si	5
Newport	15	Si	5
Paratyphi B	16	Si	5
Paratyphi B v. Java	17	Si	5
Saintpaul	18	Si	5
Senftenberg	19	Si	5
Tennessee	20	Si	5
Typhimurium	21	Si	5
Virchow	22	Si	5
	Total		110

Tabla 3: Comparación de la sensibilidad del protocolo normal (PN) y el protocolo abreviado (PA) para el nivel de serotipo

Serotipo KW	Número de cepas	Número de pruebas	Resultados correctos del PN	% de resultados correctos del PN	Resultados correctos del PA	% de resultados correctos del PA
1,4,[5],12:i:-	5	5	5	100%	5	100%
Agona	5	5	5	100%	5	100%
Anatum	5	5	5	100%	5	100%
Bredeney	5	5	5	100%	5	100%
Derby	5	5	5	100%	5	100%
Dublin	5	5	5	100%	5	100%
Enteriditis	5	5	5	100%	5	100%
Hadar	5	5	5	100%	5	100%
Heidelberg	5	5	5	100%	5	100%
Indiana	5	5	5	100%	5	100%
Infantis	5	5	5	100%	5	100%
Kottbus	5	5	5	100%	5	100%
Mbandaka	5	5	5	100%	5	100%
Montevideo	5	5	5	100%	5	100%
Newport	5	5	5	100%	5	100%
Paratyphi B	5	5	5	100%	5	100%
Paratyphi B v. Java	5	5	5	100%	5	100%
Saintpaul	5	5	5	100%	5	100%
Senftenberg	5	5	5	100%	5	100%
Tennessee	5	5	5	100%	5	100%
Typhimurium	5	5	5	100%	5	100%
Virchow	5	5	5	100%	5	100%
Total	110	110	110	100%	110	100%

2.4.2 Ensayo de repetibilidad del protocolo abreviado

Se usaron los mismos veintidós serovars únicos que se usaron en el estudio de sensibilidad para determinar la repetibilidad del protocolo abreviado. Los aislados usados para este ensayo se serotiparon de acuerdo con el esquema de White-Kauffman-LeMinor en un laboratorio de referencia acreditado. Tres técnicos realizaron las pruebas, de acuerdo con los protocolos de prueba estandarizados. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Cada técnico analizó al menos dos veces cada cepa. Todos los técnicos identificaron correctamente el 100 % de todas las cepas analizadas.

Tabla 4: Comparación entre técnicos que usaron el protocolo abreviado

Sérotipo KW	Técnico A				Técnico B			Técnico C		
	Nbre souches	Nbre tests	Resultados correctos	% de resultados correctos	Nbre tests	Resultados correctos	% de resultados correctos	Nbre tests	Resultados correctos	% de resultados correctos
1,4,[5],12:i:-	5	5	5	100%	3	3	100%	3	3	100%
Agona	5	5	5	100%	3	3	100%	3	3	100%
Anatum	5	5	5	100%	3	3	100%	3	3	100%
Bredeney	5	5	5	100%	3	3	100%	3	3	100%
Derby	5	5	5	100%	3	3	100%	3	3	100%
Dublin	5	5	5	100%	3	3	100%	3	3	100%
Enteritidis	5	5	5	100%	3	3	100%	3	3	100%
Hadar	5	5	5	100%	3	3	100%	3	3	100%
Heidelberg	5	5	5	100%	3	3	100%	3	3	100%
Indiana	5	5	5	100%	3	3	100%	3	3	100%
Infantis	5	5	5	100%	3	3	100%	3	3	100%
Kottbus	5	5	5	100%	2	2	100%	2	2	100%
Mbandaka	5	5	5	100%	2	2	100%	2	2	100%
Montevideo	5	5	5	100%	2	2	100%	2	2	100%
Newport	5	5	5	100%	2	2	100%	2	2	100%
Paratyphi B	5	5	5	100%	2	2	100%	2	2	100%
Paratyphi B v. Java	5	5	5	100%	2	2	100%	2	2	100%
Saintpaul	5	5	5	100%	2	2	100%	2	2	100%
Senftenberg	5	5	5	100%	2	2	100%	2	2	100%
Tennessee	5	5	5	100%	2	2	100%	2	2	100%
Typhimurium	5	5	5	100%	2	2	100%	2	2	100%
Virchow	5	5	5	100%	2	2	100%	2	2	100%
Total	110	110	110	100%	55	55	100%	55	55	100%

3. Conclusiones

En este estudio, no se observó ninguna diferencia en el rendimiento del kit (en cuanto a sensibilidad y repetibilidad) cuando se analizaron las muestras con el protocolo original presentado (protocolo normal) y el nuevo protocolo (protocolo abreviado). Dado que el protocolo abreviado permite a los técnicos completar el CTS en 59 minutos menos, ofrece ventajas en términos de calendario de trabajo.

4. Publicaciones

- Diep B., Barretto C., Portmann A., Fournier C., Karczmarek A., Voets G., Li S., Deng X., Klijn A. *Salmonella* Serotyping; Comparison of the Traditional Method to a Microarray-Based Method and an *in silico* Platform Using Whole Genome Sequencing Data *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10 (2554), pp. 1-8.
- Brisabois A. Fremy S, Moury F, Marault M, van Santen R, Dekker A, Fabre JM, Vos P, de Goeijen F. The Effect of the Culture Medium on the Performance of the Premi®Test Salmonella: A Multiplex Molecular Serotyping Test using a DNA Microarray System. Presentado en: 4.ª reunión de MED-VET-NET; 11-14 de junio de 2008; Saint-Malo, Francia.

