

# Estudio de Verificación de Desempeño Interlaboratorios

Version 230103

## PRODUCTO:

RESIST Food Listeria monocytogenes Detection Kit

## Versión

Esta versión corresponde a la versión 230103 del Estudio de verificación de desempeño del kit RESIST Food Listeria monocytogenes Detection Kit.

## Objetivo

Evaluar el desempeño RESIST Food Listeria monocytogenes Detection Kit para la detección de Listeria monocytogenes en muestras de superficie y producto terminado.

## Descripción del método

El kit está constituido por una mezcla de enzimas y partidores que permiten la detección de Listeria monocytogenes a través de LAMP. El método está diseñado para detectar una secuencia genómica específica de Listeria monocytogenes, a través de un indicador que permite bajo condiciones de excitación de luz azul a 470 nm emitir fluorescencia cuando hay una amplificación específica, lo que se asocia a una muestra positiva.

## Muestras analizadas y metodología de análisis.

El desempeño de RESIST Food Listeria monocytogenes Detection Kit fue evaluado en laboratorios de empresas dedicadas al rubro de la acuicultura.

### a. Muestras

El tipo de muestras utilizadas en esta verificación fueron de superficie de acero inoxidable y producto en diferentes versiones (congelado y crudo).

b. Cultivo

El medio de enriquecimiento para el cultivo de las muestras analizadas fue Half Fraser, caldo de enriquecimiento para Listeria (base) según FDA/IDF-FIL y Listeria Special Broth (LSB). Se prepararon 225 ml de medio para su incubación con 25 gr de producto, las muestras de superficie fueron tomadas con tómulas y esponjas, con 10 mL y 80 mL de medios de enriquecimiento respectivamente.

c. Tiempo y temperatura de incubación

Los tiempos de incubación fueron de entre 18 - 24 hrs. Para el caso del Half Fraser la temperatura fue de 37 °C y para LSB la temperatura de crecimiento fue de 30 °C.

d. Análisis

Para realizar los análisis se utilizaron 10 µL de medio de enriquecimiento post-incubación donde se asegura el crecimiento de la bacteria para realizar la determinación de bacterias vivas en este análisis.

En este estudio nombraremos los laboratorios como 1, 2, 3 con la finalidad de resguardar la confidencialidad de las empresas que compartieron su información con nosotros.

Tabla 1. Laboratorios y muestras analizadas

Lugar	Muestra	Tiempo y T°de incubación	Medio de enriquecimiento	Total de análisis
Laboratorio 1	Producto terminado	24 hrs 30 °C	Half Fraser	98
	Superficie			
Laboratorio 2	Producto terminado	24 hrs 30 °C	FDA	65
	Superficie			
Laboratorio 3	Producto terminado	24 hrs 37 °C	LSB	60
	Superficie			
<b>Total</b>				<b>223</b>

## Criterios de positividad y negatividad

Se definió la positividad o negatividad del método de referencia de acuerdo al resultado informado por laboratorio por las técnicas de confirmación establecidas internamente, para este estudio se utilizaron técnicas de crecimiento en medio selectivo Agar Cromo Listeria (ALOA). Asimismo, los criterios de positividad y negatividad para RESIST Food L. monocytogenes Detection Kit se encuentran en el Manual de Usuario <sup>1</sup>, donde la presencia de fluorescencia significa que la muestra es positiva, mientras que muestras negativas se mantienen igual al control negativo. Asimismo, se informan los valores de porcentaje de concordancia positiva, porcentaje de concordancia negativa y porcentaje de concordancia total, para expresar sensibilidad y especificidad, respectivamente <sup>2-3</sup>. Para mayor información, contactar a [help@avenire.com](mailto:help@avenire.com).

## Resultados

La evaluación del desempeño de RESIST Food Listeria monocytogenes Detection Kit se realizó con muestras de enriquecimiento, totalizando 223 análisis independientes. La comparación contra la metodología de confirmación por microbiología en medio selectivo ALOA se resume en Tabla 2.

Del total de muestras analizadas se obtuvieron dos muestras con resultado diferente al esperado, información entregada por los analistas del laboratorio. En el caso del lab 2 la muestra con discordancia dio positiva para la técnica RESIST Food, mientras que para el análisis utilizando la metodología de la competencia basada en lamp y además los resultados de la metodología de referencia, el resultado fue negativo. Luego de una revisión de la formulación del Kit, se realizaron cambios que permitieron la optimización del producto, eliminando la inespecificidad que se observó en este caso. Para esto se realizó un segundo análisis en el lab 2 donde se comprobó la mejora del producto RESIST Food.

La muestra que no tuvo concordancia en el lab 3 se analizó nuevamente en nuestro laboratorio de R&D y se determinó que la muestra era positiva, posiblemente el resultado que se obtuvo en laboratorio fue debido a una manipulación incorrecta de la muestra o la ausencia de esta en la reacción.

Los resultados globales del estudio se determinaron utilizando dos herramientas estadísticas a partir de una tabla de contingencia de 2x2 donde se determina la concordancia positiva (sensibilidad), concordancia negativa (especificidad) y concordancia total, y además es posible analizar el coeficiente estadístico kappa.

Los valores globales del estudio comparativo fueron para la concordancia total de 99.1% con una sensibilidad del 98,4% , una especificidad del 99.3% y un coeficiente kappa de 0,97. Dichos resultados establecen que RESIST Food L. monocytogenes detection Kit cumple con los estándares de aceptación de rendimiento. Los parámetros establecidos para cumplir con la performance establecida se establecen entre 84-89 % para sensibilidad y 92-94 % para especificidad<sup>2</sup>, mientras que el valor del coeficiente kappa se posiciona en la categoría de "casi perfecto" cuyo rango se encuentra entre los valores 0,81 - 1,00<sup>3</sup>.

Tabla 2. Cuadro comparativo de desempeño de RESIST Food Listeria monocytogenes Detection Kit con muestras por origen.

Origen	Fundamento de la técnica	N° muestras analizadas		RESIST Food L. monocytogenes		Concordancia		
		Positivas	Negativas	Positivas	Negativas	Positivas %	Negativas %	Total %
Lab 1	Inmunoensayo	21	77	21	77	100	100	100
Lab 2	LAMP	19	46	20	45	100	97.8	98.4
Lab 3	qPCR	25	35	24	36	96	100	98.3
<b>Totales estudio</b>		<b>65</b>	<b>158</b>	<b>65</b>	<b>158</b>	<b>98.4</b>	<b>99.3</b>	<b>99.1</b>

Tabla 3. Tabla de contingencia 2x2

		Metodología de referencia	
		POSITIVO	NEGATIVO
RESIST Food L. monocytogenes	POSITIVO	63 (a)	1 (b)
	NEGATIVO	1 (c)	158 (d)

**Porcentaje de concordancia positiva:**

$$VP \times 100 / (VP + FN) = 63 \times 100 / (63 + 1) = \mathbf{98.4\%}$$

**Porcentaje de concordancia negativa:**

$$VN \times 100 / (VN + FP) = 158 \times 100 / (158 + 1) = \mathbf{99.3\%}$$

**Porcentaje de concordancia total:**

$$(VP + VN) \times 100 / (VP + FN + VN + FP) = (63 + 158) \times 100 / (63 + 1 + 158 + 1) = \mathbf{99.1\%}$$

VP = Verdadero Positivo, VN = Verdadero Negativo, FN = Falso Negativo, FP = Falso Positivo

**Coefficiente Kappa:**

Para obtener el coeficiente Kappa se debe calcular la proporción de acuerdos observados ( $P_o$ ) y la proporción de acuerdos esperados ( $P_e$ ) utilizando los valores de la tabla 3 como se muestra a continuación:

$$P_o = \frac{(a+d)}{N} \quad P_e = \frac{(rt+su)}{N^2} \quad \kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

$$r = a + b \quad s = c + d \quad t = c + d \quad u = b + d \quad N = a + b + c + d$$

Al reemplazar los valores con el estudio realizado se obtienen los siguientes resultados:

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} \quad \kappa = \frac{0,99 - 0,59}{1 - 0,59} \quad \kappa = 0,97$$

**Conclusión**

Los resultados del análisis de la comparación de RESIST Food L. monocytogenes contra otras técnicas rápidas y procedimientos normalizados indican que está **apto** para ser utilizado en muestras de producto final y superficies. Los análisis estadísticos además entregan valores dentro de los rangos más altos para la categorización de RESIST Food.

## Referencias

1. Manual RESIST Food: Listeria monocytogenes Detection Kit versión 230103.
2. Salazar, G. J. V. (2017). Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio. Medicina & Laboratorio, 23(7), 365-386.
3. Abraira, V. (2001). El índice kappa. Semergen-Medicina de Familia, 27(5), 247-249.

### PRECAUCIONES Y DESCARGO DE RESPONSABILIDAD

Este documento y los productos en él descritos fueron diseñados para su uso exclusivo en tareas de investigación y desarrollo. Para el correcto uso del producto y su manejo seguro por favor consultar el Manual de Usuario.

### INFORMACIÓN DE CONTACTO Y ASISTENCIA TÉCNICA

Para hacer preguntas, resolver problemas, sugerir mejoras de protocolos o productos o informar nuevas aplicaciones, por favor contactarse en [www.resistfood.com](http://www.resistfood.com) o enviar un correo electrónico a [help@avenire.com](mailto:help@avenire.com).

### PATENTES Y MARCAS

©Kura Biotech SpA 2020. Todos los derechos reservados. La información contenida en este documento, incluyendo marcas comerciales, derechos de autor, propiedad intelectual e industrial, conocimiento técnico, son propiedad exclusiva de Kura Biotech SpA. Su uso, reproducción y/o divulgación total o parcial sin consentimiento por escrito se encuentra prohibido y está sancionado por ley.