

## Validering av PCR-metode for påvisning av *Salmonella* og *Listeria monocytogenes*

Halvor Nygaard og Kari M. Lie





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 390 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

**Hovedkontor Tromsø:**

Muninbakken 9–13  
Postboks 6122 Langnes  
NO-9291 Tromsø

**Ås:**

Osloveien 1  
Postboks 210  
NO-1433 ÅS

**Stavanger:**

Måltidets hus, Richard Johnsen gate 4  
Postboks 8034  
NO-4068 Stavanger

**Bergen:**

Kjerreidviken 16  
Postboks 1425 Oasen  
NO-5844 Bergen

**Sunndalsøra:**

Sjølsengvegen 22  
NO-6600 Sunndalsøra

**Alta:**

Kunnskapsparken, Markedsgata 3  
NO-9510 Alta

**Felles kontaktinformasjon:**

Tlf: 02140

E-post: [post@nofima.no](mailto:post@nofima.no)

Internett: [www.nofima.no](http://www.nofima.no)

**Foretaksnr.:**

**NO 989 278 835 MVA**



Creative commons gjelder når ikke annet er oppgitt

# Rapport

<i>Tittel:</i> <b>Validering av PCR-metode for påvisning av <i>Salmonella</i> og <i>Listeria monocytogenes</i></b>	ISBN 978-82-8296-585-9 (pdf) ISSN 1890-579X
Validation of PCR methods for detection of <i>Salmonella</i> and <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Rapportnr.:</i> 8/2019
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Halvor Nygaard og Kari M. Lie	<i>Tilgjengelighet:</i> <b>Åpen</b>
<i>Avdeling:</i> BioLab	<i>Dato:</i> 22. mars 2019
<i>Oppdragsgiver:</i> Nofima AS - Bergen	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 13
<i>Stikkord:</i> PCR, <i>Salmonella</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Oppdragsgivers ref.:</i>  <i>Prosjektnr.:</i> 11277
<p><i>Sammendrag/anbefalinger:</i></p> <p>Laboratoriet har gjennomført intern validering av PCR-metoder for påvisning av <i>Salmonella</i> og <i>Listeria monocytogenes</i>. Metodene benytter instrumentet Roche LightCycler96 Real Time PCR Cycler og kits for DNA preparering og deteksjon fra Bioteccon Diagnostics GmbH.</p> <p><i>Salmonella</i> PCR-metode viste fullt samsvar med referansem metode NMKL-71 ved analyse av prøver med kjent innhold av målorganismen (100 % relativ nøyaktighet, -sensitivitet og -spesifisitet). Metodens deteksjonsgrense ble bestemt til 1-10 <i>Salmonella</i>.</p> <p><i>Listeria monocytogenes</i> PCR-metode ga <u>et</u> falskt negativt resultat sammenlignet med referansem metode «Oxoid Listeria Precis» ved analyse av 30 prøver med kjent innhold av målorganismen (97 % relativ nøyaktighet, 93 % relativ sensitivitet og 100 % relativ spesifisitet). Den falske negative analysen kunne identifiseres som mulig positiv ved visuell kontroll av fluorescenskurve og bekreftes som positiv ved konfirmasjon. Metodens deteksjonsgrense ble bestemt til 1-10 <i>Listeria monocytogenes</i>.</p> <p>Begge metodene ga rett resultat for alle prøver i SLP arrangert av Statens Livsmedelsverk, januar 2019.</p> <p>De nye PCR-metodene ble vurdert som hensiktsmessige i forhold til laboratoriets behov. Metodenes målesikkerhet (nøyaktighet, sensitivitet, spesifisitet og deteksjonsgrense) vurderes som tilfredsstillende.</p>	
<p><i>English summary/recommendation:</i></p> <p>PCR methods for detection of <i>Salmonella</i> and <i>Listeria monocytogenes</i> was validated by comparing PCR results to results of conventional reference methods and by comparing to other laboratories in proficiency testing.</p>	

# Innhold

<b>1</b>	<b>Bakgrunn .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Behov for intern validering - valideringsplan.....</b>	<b>2</b>
2.1	Salmonella .....	2
2.2	Listeria .....	2
<b>3</b>	<b>Materialer og metoder .....</b>	<b>4</b>
3.1	Nye alternative metoder .....	4
3.2	Referansemetoder.....	4
3.3	Referansekulturer.....	4
<b>4</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>5</b>
4.1	Salmonella .....	5
4.2	Listeria .....	6
<b>5</b>	<b>Konklusjon.....</b>	<b>10</b>
<b>6</b>	<b>Referanser .....</b>	<b>11</b>
<b>7</b>	<b>Vedlegg.....</b>	<b>12</b>

# 1 Bakgrunn

Laboratoriet har erfaring med PCR-metode for påvisning av *Salmonella* siden 2006. På grunn av en uopprettelig feil på vår Roche LightCycler 1.5 PCR-maskin, ble det anskaffet nytt utstyr i januar 2019. Bioteccon Diagnostics installerte og testet utstyret i laboratoriet og ga videre opplæring og støtte til validering av metodene.

Den nye maskinen, Roche LightCycler 96 Real Time PCR Cycler, benytter et 96-brønn format der brønnene inneholder ferdig frysetørket reagensblanding (Foodproof *Salmonella* Detection LyoKit) mens den gamle benyttet glasskapillærer og flytende reagenser (Foodproof *Salmonella* Detection Kit) som måtte blandes og tilsettes i kapillærene før bruk.

For analyse av *Listeria monocytogenes* har laboratoriet til nå kun benyttet konvensjonell dyrkingsbasert metode; NMKL 136, men ønsker å gå over til tilsvarende PCR metode som for *Salmonella*.

## 2 Behov for intern validering - valideringsplan

### 2.1 Salmonella

#### Valideringsstatus

DNA-ekstraksjon og PCR-analyse av *Salmonella* ved hjelp av «Foodproof StarPrep One Kit» og «Foodproof *Salmonella* Detection LyoKit» etter preanrikning i bufret peptonvann (BPW) er eksternt validert (NordVal Certificate no: 023 og AOAC Performance tested Certificate no. 120301).

Laboratoriet vil gjennomføre konfirmering av PCR-positive og -ugyldig resultater med NMKL-71 (anrikning i RVS-medium, isolering på XLD- og OBSM-agar, rendyrking på NA før serologisk og biokjemisk konfirmering). NMKL-71 er validert i en kollaborativ avprøving, og laboratoriets NMKL-71 baserte metode har vært akkreditert siden 1995.

#### Valideringsplan

Verifisere relativ nøyaktighet/sensitivitet/spesifisitet og deteksjonsgrense. Undersøke metodens hensiktsmessighet i forhold til tenkt bruk.

- Teste to ulike PCR-protokoller (25 µl vs 5 µl DNA ekstrakt til PCR)
- Analysere prøver med ulike nivåer tilsatt *Salmonella* med ny metode og referansem metode (NMKL-71)
- Delta i ringtest arrangert av Statens Livsmedelsverk i januar 2019

### 2.2 Listeria

#### Valideringsstatus

DNA-ekstraksjon og PCR-analyse av *Listeria monocytogenes* ved hjelp av «Foodproof StarPrep Two Kit» og «Foodproof *Listeria monocytogenes* Detection LyoKit» er eksternt validert (Nordval Certificate no. 025 og AOAC Performance tested Certificate no. 070401).

AOAC konkluderte med at DNA kan ekstraheres fra Half Fraser Broth etter 48 timer anrikning med prosedyre A (short) eller etter 24 timer med prosedyre B (sensitive). Prosedyre B ekstraherer DNA fra 4 ganger større volum enn prosedyre A.

Biotecon Diagnostics har vist at 24 timer anrikning i Oxoid One Broth *Listeria* gir ca 100 ganger høyere *Listeria*-konsentrasjon enn i Half Fraser Broth. Oxoid selv oppgir at 24 timer anrikning i One Broth *Listeria* gir minst like høyt utbytte som anrikning etter ISO 11290 (tilsvarer NMKL 136), det vil si to trinns anrikning i Half Fraser Broth (1 dag) og Fraser Broth (2 dager).

Oxoid *Listeria* Precis er en AFNOR validert metode (AFNOR Certificate UNI 03/04 – 04/05) som benytter 24 timer anrikning i One Broth *Listeria* før isolering på Oxoid Brilliance *Listeria* Agar (OBLA) og konfirmering på Oxoid Biochemical Identification System (OBIS mono). I denne metoden overføres 10 µl kultur fra One Broth *Listeria* til OBLA. Vår ekstraksjonsprosedyre A (short) tar til sammenligning ut 200 µl av samme kultur og bruker 1/12 av volumet i PCR miksen, altså tilsvarende 16 µl kultur.

Vi ønsker primært å bruke One Broth *Listeria* til anrikning, og betrakter AFNOR valideringen av Oxoid *Listeria* Precis som dokumentasjon for at 24 t anrikning i One Broth *Listeria* gir høy nok *Listeria* konsentrasjon til PCR deteksjon med bruk av ekstraksjonsprosedyre A.

Laboratoriet vil confirmere PCR-positive eller ugyldig resultater med Oxoid *Listeria* Precis metoden.

### **Valideringsplan**

Verifisere relativ nøyaktighet/sensitivitet/spesifisitet og deteksjonsgrense. Undersøke metodens hensiktsmessighet i forhold til tenkt bruk.

- Teste to ulike ekstraksjonsprotokoller (A: Short vs B: Sensitive)
- Sammenligne anrikning på One Broth *Listeria* og Half Fraser Broth
- Analysere prøver med ulike nivåer tilsatt *Listeria monocytogenes* med ny metode og to referansemetoder (NMKL-136 og Oxoid *Listeria* Precis)
- Delta i ringtest arrangert av Statens Livsmedelsverk i januar 2019

### 3 Materialer og metoder

#### 3.1 Nye alternative metoder

BioLab A87: *Salmonella* PCR (LightCycler 96, Foodproof *Salmonella* Detection LyoKit, Foodproof StarPrep One Kit). (Dette blir ny gjeldende versjon av BioLab A87 f.o.m. overgang til LightCycler 96).

BioLab A115: *Listeria monocytogenes* PCR (LightCycler 96, Foodproof *Listeria monocytogenes* Detection LyoKit, Foodproof StarPrep Two Kit)

#### 3.2 Referansemetoder

BioLab A53: *Salmonella* (NMKL 71 *Salmonella* – Påvisning i Livsmedel)

BioLab A70: *Listeria monocytogenes* (NMKL 136 *Listeria monocytogenes* – Påvisning i Levnedsmidler)

BioLab A87: *Salmonella* PCR (LightCycler 1.5/2.0, Foodproof *Salmonella* Detection Kit, Foodproof ShortPrep I Kit). (Dette er gjeldende versjon av BioLab A87).

Oxoid *Listeria* Precis (metoden er integrert del av BioLab A115)

#### 3.3 Referansekulturer

*Salmonella montevideo* (Biolab 2018-1825-3). Isolat fra fiskemel, typebestemt ved Veterinærinstituttet.

*Listeria monocytogenes* (ATCC 7644).



## 4 Resultater

### 4.1 Salmonella

25 gram prøver av fiskemel (Biolab 2018-6335-2) ble tilsatt tre nivåer av fortynnet *Salmonella montevideo* kultur. *Salmonella*-konsentrasjon i kulturen ble bestemt som aerobe mikroorganismer (Afnor 3M 1/1-9/89). Lavt inokuleringsnivå utgjorde 2,3 *Salmonella* per prøve mens høyt nivå utgjorde 23 *Salmonella* per prøve. Ny alternativ metode detekterte *Salmonella* i begge prøvene (Tabell 1) med både standard mengde DNA-ekstrakt (25 µl) og redusert mengde (5 µl). Redusert mengde ekstrakt kan brukes dersom prøvematriks inhiberer PCR-reaksjonen.

Tabell 1 Analyse av fiskemel (Biolab 2018-6335-2) med tre nivåer av *S.montevideo* (0, 1-10, 10-100). DNA ble ekstrahert fra BPW-kulturene etter 20±2t inkubering ved 37 °C. De to metodevariantene tok utgangspunkt i samme BPW kulturer

	LC-96/25µl			LC-96/5µl		
	Fra BPW			Fra BPW		
Målg. tilsatt (KDE/prøve)		(2,3)	(23)		(2,3)	(23)
INTERVALL	0	1-10	10-100	0	1-10	10-100
Matriks: Fiskemel	0/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1

Tilsvarende forsøk ble deretter gjort med 5 parallellanalyser av hvert inokuleringsnivå. Resultatene av ny alternativ metode ble nå sammenlignet med resultatene av NMKL 71. De to metodene ga samme resultat for alle prøvene (Tabell 2).

Tabell 2 Analyse av fiskemel (Biolab 18-6335-2) tilsatt tre nivåer av *S.montevideo* (0, 1-10, 10-100). De to metodene tok utgangspunkt i samme BPW kulturer (BPW/20±2t/37 °C)

	LC-96/25µl			NMKL 71		
	Fra BPW			Fra BPW		
Målg. tilsatt (KDE/prøve)		(2)	(20)		(2)	(20)
INTERVALL	0	1-10	10-100	0	1-10	10-100
Matriks: Fiskemel	0/5	4/5	5/5	0/5	4/5	5/5

I en av prøvene med lavt inokuleringsnivå (2 *Salmonella* per prøve) ga begge metoder negativt resultat og vi antar derfor at denne prøven ikke hadde fått noen *Salmonella*. Analysene i tabell 1 og 2 viser at den alternative metodens deteksjonsgrense er 1-10 *Salmonella*.

Den nye alternative metodens ytelse (Tabell 3) i forhold til referansemotoden (NMKL 71) ble beregnet fra datamaterialet over. Det var ingen forskjell mellom resultatene av de to metodene.

Tabell 3 Ytelsesparametre for alternative metode sammenlignet med referansemetode NMKL-71. De to metodene tok utgangspunkt i samme BPW kulturer

MATRIKS	PA	NA	FN	FP	TP	SUM	Relativ nøyaktighet AC % <sup>1)</sup>	Relativ sensitivitet SE % <sup>2)</sup>	Relativ spesifisitet SP % <sup>3)</sup>
Fiskemel	9	6	0	0	0	15	100	100	100

PA = Positive Agreement, NA = Negative Agreement, FP = False Positive, TP = True Positive, FN = False Negative <sup>1)</sup> Relativ nøyaktighet (AC):  $(PA+NA+FP) \times 100/SUM$ . <sup>2)</sup> Relativ sensitivitet (SE):  $(PA+TP) \times 100/(PA+FN)$ . <sup>3)</sup> Relativ spesifisitet (SP):  $NA \times 100/(NA+FP)$ .

Laboratoriets resultater i ringtest arrangert av Statens Livsmedelsverk (SLV) i januar 2019 (Figur 4) er bedømt ut fra arrangørens preliminære resultatrapport (Endelig rapport utgis ca 26.04.2019). Laboratoriet rapporterte her inn resultatene fra ny alternativ metode, men analyserte prøvene også med PCR/LightCycler 2.0 (akkreditert metode) og NMKL-71 (akkreditert metode) med utgangspunkt i de samme preanrikningskulturene. Alle resultatene var korrekte.

Tabell 4 Resultater fra SLV ringtest Januar 2019

	Nofima Biolab			SLV
	LC-96 BPW	LC 2.0 BPW	NMKL 71 BPW	MEDIAN
SLV Januar 2019 Prøve A	NEG	NEG	NEG	NEG
SLV Januar 2019 Prøve B	POS	POS	POS	POS
SLV Januar 2019 Prøve C	POS	POS	POS	POS

## 4.2 Listeria

25 gram prøver av fiskemel (Biolab 2018-6335-2) ble tilsatt tre nivåer av fortyntet *Listeria monocytogenes*-kultur. *Listeria*-konsentrasjon i kulturen ble bestemt som aerobe mikroorganismer (Afnor 3M 1/1-9/89). Lavt inokuleringsnivå utgjorde 12 *L. monocytogenes* pr prøve mens høyt nivå utgjorde 120 pr prøve. Det ble brukt to alternative anrikningsmedier; One Broth *Listeria* og Half Fraser Broth.

*L. monocytogenes* ble detektert i alle prøver som var tilsatt målorganismen (Tabell 5).  $C_T$  verdiene viser at One Broth-*Listeria* ga betydelig høyere konsentrasjon av *L. monocytogenes* enn Half Fraser Broth etter 24 timer inkubering (Tabell 10).

Kulturene ble også forsøkt ekstrahert med både «Short» og «Sensitive» protokollene. 2 av de 6 «Sensitive» ekstraktene ga ugyldige resultater grunnet PCR-inhibering. Vi benyttet derfor kun «Short» protokollen i videre arbeid.

Tabell 5 Analyse av fiskemel (Biolab 2018-6335-2) med tre nivåer av *L. monocytogenes* (0, 10-100, 100-1000). DNA ble ekstrahert fra to ulike anrikningsmedier (One Broth *Listeria* og Half Fraser Broth) etter 24 t inkubering ved 30 °C)

	LC-96/25ul			LC-96/25ul		
	Fra OneBroth/24±2t			Fra Half Fraser/24±2t		
Målg. tilsatt (KDE/prøve)		(12)	(120)		(12)	(120)
INTERVALL	0	10-100	>100	0	10-100	>100
Matriks: Fiskemel	0/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1

Tilsvarende forsøk ble deretter gjort med 5 parallellanalyser av hvert inokuleringsnivå. Resultatene av ny alternativ metode ble sammenlignet med resultatene av Oxoid *Listeria* Precis (AFNOR UNI 03/04-04/05) som også benytter One Broth *Listeria* til anrikning. De to metodene tok derfor utgangspunkt i samme anrikningskulturer. *L. monocytogenes* ble detektert i de samme prøvene med begge metoder, bortsett fra i en av prøvene med lavt inokuleringsnivå hvor bare Oxoid *Listeria* Precis detektert målorganismen (Tabell 6).

Tabell 6 Analyse av fiskemel (Biolab 2018-6335-2) tilsatt tre nivåer av *L. monocytogenes* (0, 0-1, 1-10). Den alternative metoden ble sammenlignet med Oxoid *Listeria* Precis. De to metodene tok utgangspunkt i samme anrikningskulturer (One Broth *Listeria*, 24t, 30 °C)

	LC-96/25ul			Oxoid <i>Listeria</i> Precis		
	Fra OneBroth/24±2t			Fra OneBroth/24±2t		
Målg. tilsatt (KDE/prøve)		(0,6)	(6)		(0,6)	(6)
INTERVALL	0	0-1	1-10	0	0-1	1-10
Matriks: Fiskemel	0/5	3/5	5/5	0/5	4/5	5/5

Nytt forsøk med 5 parallellanalyser av hvert inokuleringsnivå ble gjentatt med annen prøvematriks, grovmalt laksefilet. Den nye alternative metoden ble nå sammenlignet med både Oxoid *Listeria* Precis og NMKL 136. Alternativ metode og Oxoid *Listeria* Precis tok igjen utgangspunkt i samme anrikningskulturer (One Broth *Listeria*) mens NMKL 136 benyttet Half Fraser Broth og Fraser Broth til hhv primær- og sekundæranrikning. *L. monocytogenes* ble detektert i de samme prøvene med ny alternativ metode og Oxoid *Listeria* Precis, mens NMKL 136 detekterte *L. monocytogenes* i to flere av prøvene med lavt inokuleringsnivå (Tabell 7). Det er imidlertid ikke samme prøver som er analysert med NMKL 136 som med de to andre metodene og ujevn fordeling av positive og negative prøver er ikke usannsynlig med inokuleringsnivå 0,4 *L. monocytogenes* per prøve.

Tabell 7 Analyse av grovmalt laksefilet med tre nivåer av *L. monocytogenes* (0, 0-1, 1-10). Den alternative metoden ble sammenlignet med Oxoid *Listeria* Precis og NMKL 136. Alternativ metode og Oxoid *Listeria* Precis tok utgangspunkt i samme anrikningskulturer (One Broth *Listeria*) mens NMKL 136 tok utgangspunkt i egne anrikningskulturer (Half Fraser Broth og Fraser Broth)

	LC-96/25ul			Oxoid <i>Listeria</i> Precis			(NMKL 136)		
	Fra OneBroth/24±2t			Fra OneBroth/24±2t			Fra HF/24±2t og F/72±2t		
Målg. tilsatt (KDE/prøve)		(0,4)	(4)		(0,4)	(4)		(0,4)	(4)
INTERVALL	0	0-1	1-10	0	0-1	1-10	0	0-1	1-10
Matriks: Laksefilet, grovmalt	0/5	1/5	5/5	0/5	1/5	5/5	0/5	3/5	5/5

Analysene i Tabell 6 og 7 viser at den nye alternative metodens deteksjonsgrense er 1-10 *Listeria monocytogenes*.

Den nye alternative metodens ytelse (Tabell 8) i forhold til referansemetoden Oxoid *Listeria* Precis ble beregnet fra datamaterialet over. De to metodene ga ulikt resultat i 1 av totalt 30 prøver ved at alternativ metode ga et falskt negativt resultat. Nærmere inspeksjon av fluorescenskurven til den aktuelle prøven viser at det faktisk er en stigning (Figur 1) som programvaren bedømmer til negativ, men som ved visuell kontroll kunne ha blitt vurdert som svak positiv/usikker og tatt videre til konfirmering.

(Programvaren til PCR-maskinen benytter to kriterier for å skille mellom positive og negative resultater, «Minimal Slope» og «Minimal Endpoint Fluorescence». Kurven til det falskt negative resultatet oppfylte ikke kravet til slope).

Tabell 8 Ytelsesparametre for alternative metode sammenlignet med referansemetode Oxoid *Listeria* Precis. De to metodene tok utgangspunkt i samme preanrikningskulturer

MATRIKS	PA	NA	FN	FP	TP	SUM	Relativ nøyaktighet AC %	Relativ sensitivitet SE %	Relativ spesifisitet SP %
Fiskemel	8	6	1	0	0	15	93	89	100
Laksefilet	6	9	0	0	0	15	100	100	100
TOTAL	14	15	1	0	0	30	97	93	100

PA = Positive Agreement, NA = Negative Agreement, FP = False Positive, TP = True Positive, FN = False Negative <sup>1)</sup> Relativ nøyaktighet (AC):  $(PA+NA+FP) \times 100/SUM$ . <sup>2)</sup> Relativ sensitivitet (SE):  $(PA+TP) \times 100/(PA+FN)$ . <sup>3)</sup> Relativ spesifisitet (SP):  $NA \times 100/(NA+FP)$ .

Laboratoriets resultater i ringtest arrangert av Statens Livsmedelsverk (SLV) i januar 2019 (Tabell 9) er bedømt ut fra arrangørens preliminnære resultatrapport (Endelig rapport utgis ca 26.04.2019). Laboratoriet rapporterte inn resultatene fra ny alternativ metode, men analyserte prøvene også med Oxoid *Listeria* Precis (felles anrikningskultur) og med NMKL-136. Alle resultatene var korrekte.

Tabell 9 Resultater fra SLV ringtest Januar 2019

	Nofima Biolab			SLV
	LC-96 One Broth L	Oxoid L Precis One Broth L	NMKL 136 HF/F	MEDIAN
SLV Januar 2019 Prøve A	POS	POS	POS	POS
SLV Januar 2019 Prøve B	NEG	NEG	NEG	NEG
SLV Januar 2019 Prøve C	NEG	NEG	NEG	NEG

Det ble gjort et forsøk der en fersk *L. monocytogenes* kultur som inneholdt  $4,0 \times 10^8$  KDE/ml (bestemt som aerobe mikroorganismer) ble fortynnet  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  og  $10^{-7}$  før DNA ekstraksjon og PCR-analyse med LC-96 (Figur 3 og 4). Figur 4 viser sammenheng mellom konsentrasjon av *L. monocytogenes* i ekstrahert kultur og  $C_T$  verdi for PCR deteksjon ved hjelp av LC-96. Figuren illustrerer også at fluorescenskurven blir lav når  $C_T$  for target (32 - 35) er større enn for internkontroll (31,5).

Konsentrasjonsforskjell av *L. monocytogenes* etter 24 timer anrikning i One Broth *Listeria* og Half Fraser Broth ble målt som differanse i  $C_T$  verdi ved PCR-analyse med LC-96 (Tabell 10). En  $C_T$  enhet

tilsvarende dobling av konsentrasjon. Konsentrasjonen er i snitt mer enn 100 ganger høyere i One Broth *Listeria* enn i Half Fraser Broth. Konsentrasjonen i One Broth *Listeria* etter 24 timer anrikning er i alle de tre undersøkte kulturene også minst 100 ganger høyere enn teoretisk minimum (60-70 cfu/ml) for deteksjon på LC-96.

Tabell 10 Konsentrasjonsforskjell av *L. monocytogenes* etter 24 ±2t timer anrikning ved 30 °C i One Broth *Listeria* og Half Fraser Broth beregnet fra C<sub>T</sub> differanse ved PCR-analyse med LC-96

Matriks, L.mono kons. ved start anrikning	OneBroth L (24±2t/30°C)	Half Fraser (24±2t/30°C)	C <sub>T</sub> differanse	Kons.-forskjell (OneBroth L/HF)
Fiskemel, 12 cfu/prøve	22,97	29,29	6,32	80
Fiskemel, 120 cfu/prøve	20,93	25,34	4,41	21
SLV Skummetmelk-pulver, ukjent kons.	19,77	27,70	7,93	244

## 5 Konklusjon

Testing av PCR-maskinen (Roche LightCycler 96) med compatible kits for DNA-ekstraksjon og PCR-analyse viser at systemet er hensiktsmessig og godt egnet for vårt laboratorium. PCR-kapasiteten er tredoblet i forhold til tidligere. Overgang fra flytende enkeltreagenser og glasskapillærer til strips med frysetørket reagensblanding forenkler arbeidsgangen og reduserer kontamineringsfaren.

*Salmonella* PCR-analyse med Foodproof StarPrep ONE Kit og Foodproof Salmonella Detection LyoKit viste høy relativ nøyaktighet (100 %), -sensitivitet (100 %) og -spesifisitet (100 %) sammenlignet med konvensjonell dyrkingsbasert metode (NMKL-71). Deteksjonsgrense ble bestemt til 1-10 *Salmonella*.

*Listeria monocytogenes* PCR-analyse med Foodproof StarPrep TWO Kit og Foodproof *Listeria monocytogenes* Detection LyoKit ga samme resultater som referansem metode Oxoid *Listeria* Preci bortsett fra 1 av 30 prøver hvor ny metode ga falskt negativt resultat. Ved visuell bedømmelse av fluorescenskurven ville denne prøven blitt bedømt som svak positiv og tatt videre til konfirmasjon.

Biotecon Diagnostics oppgir at de om kort tid vil lansere en ny programvare som gir bedre automatisk resultattolkning enn PCR-maskinens standard programvare. Uansett vil laboratoriet, som tidligere, foreta endelig konklusjon basert på visuell kontroll av fluorescenskurvene.

## 6 Referanser

Listeria monocytogenes, Biotecon PCR, AOAC Performance Tested Certificate 070401

[http://bc-diagnostics.com/downloads/certification/BCD\\_AOAC\\_Listeria-Detection-Kit\\_ShortPrep-II.pdf](http://bc-diagnostics.com/downloads/certification/BCD_AOAC_Listeria-Detection-Kit_ShortPrep-II.pdf)

Listeria monocytogenes, Biotecon PCR, Nordval Certificate

<https://www.nmkl.org/dokumenter/nordval/Sertifikater/NordVal0252017.pdf>

Listeria Precis, AFNOR Certificate UNI 03/04-04/05 [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/UNI-03-04-04-05_en.pdf)

[content/uploads/sites/2/2014/03/UNI-03-04-04-05\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/UNI-03-04-04-05_en.pdf)

Listeria Precis, AFNOR Summarized Study Report

[https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-UNI-03-04-04-05\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-UNI-03-04-04-05_en.pdf)

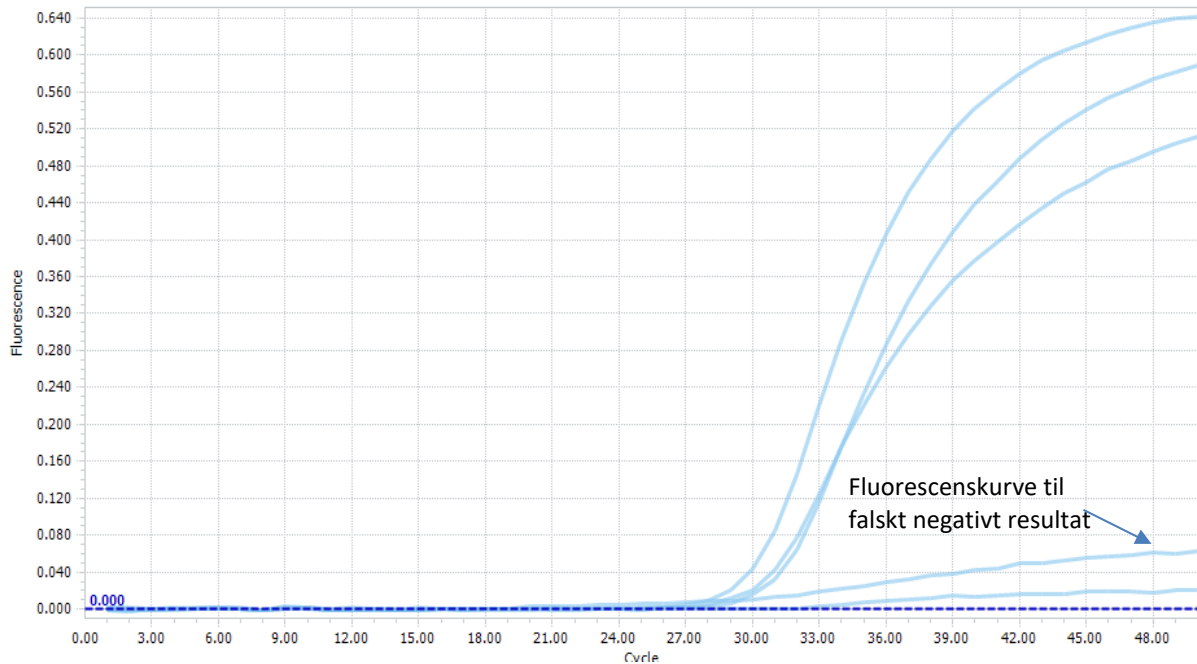
Salmonella, Biotecon PCR, AOAC Performance Tested Certificate 120301

[http://bc-diagnostics.com/downloads/certification/BCD\\_AOAC\\_Salmonella-Detection-Kit\\_ShortPrep-I\\_StarPrep-One.pdf](http://bc-diagnostics.com/downloads/certification/BCD_AOAC_Salmonella-Detection-Kit_ShortPrep-I_StarPrep-One.pdf)

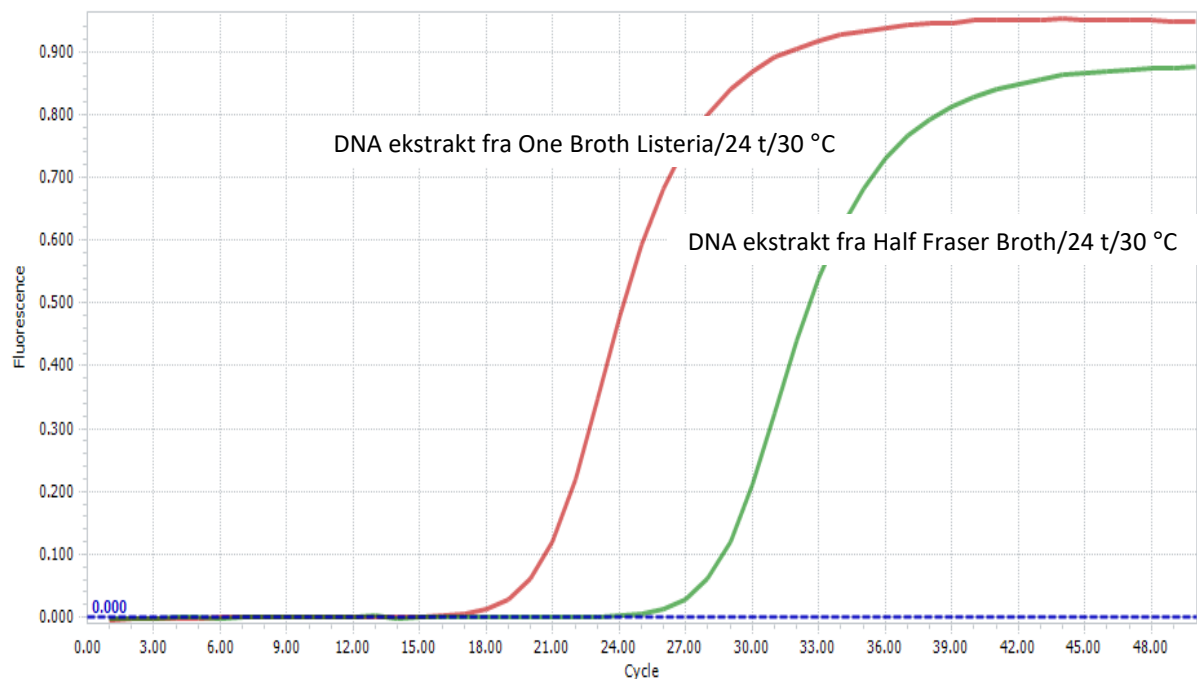
Salmonella, Biotecon PCR, Nordval Certificate

<https://www.nmkl.org/dokumenter/nordval/Sertifikater/NordVal0232017.pdf>

## 7 Vedlegg

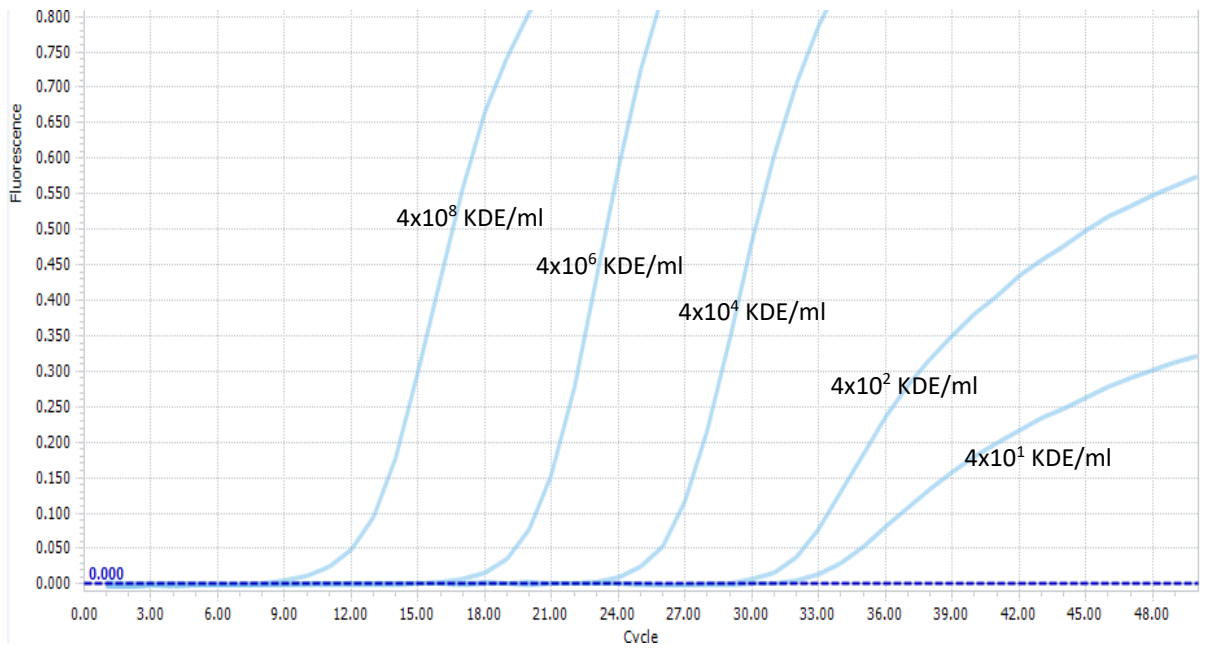


Figur 1 Fluorescenskurver fra *L. monocytogenes* PCR-analyse i 5 fiskemelprøver med lavt inokuleringsnivå (0-1 *L. monocytogenes* per prøve). Tre av fem analyser kom ut som positive, to som negative.

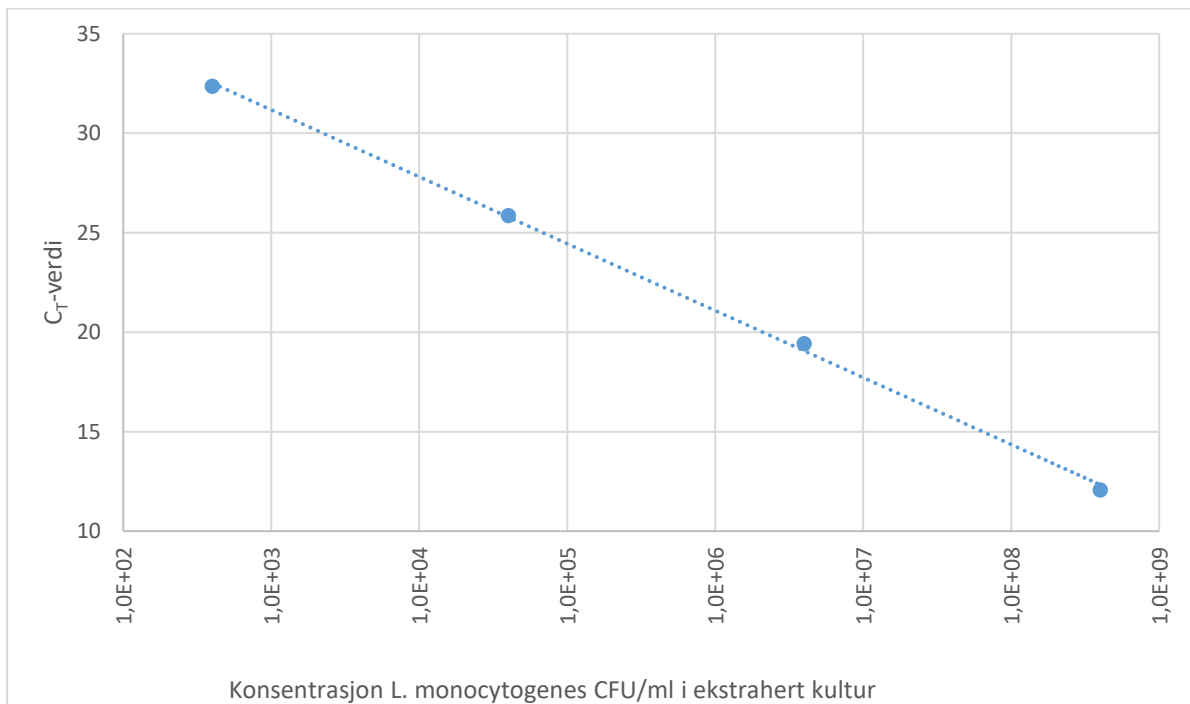


Figur 2 Deteksjon av *L. monocytogenes* ved hjelp av LC-96 i DNA ekstrakter fra One Broth Listeria og Half Fraser Broth inkubert i 24 timer ved 30 °C. Prøve A fra SLV ringtest Januar 2019.





Figur 3 Deteksjon av *L. monocytogenes* ved hjelp av LC-96 i DNA ekstrakter fra One Broth Listeria kultur; uforynnet ( $4 \times 10^8$  KDE/ml), x100 forynnet ( $4 \times 10^6$  KDE/ml), x10.000 forynnet ( $4 \times 10^4$  KDE/ml), x1.000.000 forynnet ( $4 \times 10^2$  KDE/ml), x10.000.000 forynnet ( $4 \times 10^1$  KDE/ml).



Figur 4 C<sub>T</sub> verdier ved PCR-analyse ved hjelp av LC96 som funksjon av *L. monocytogenes* konsentrasjon i ekstrahert kultur.

