

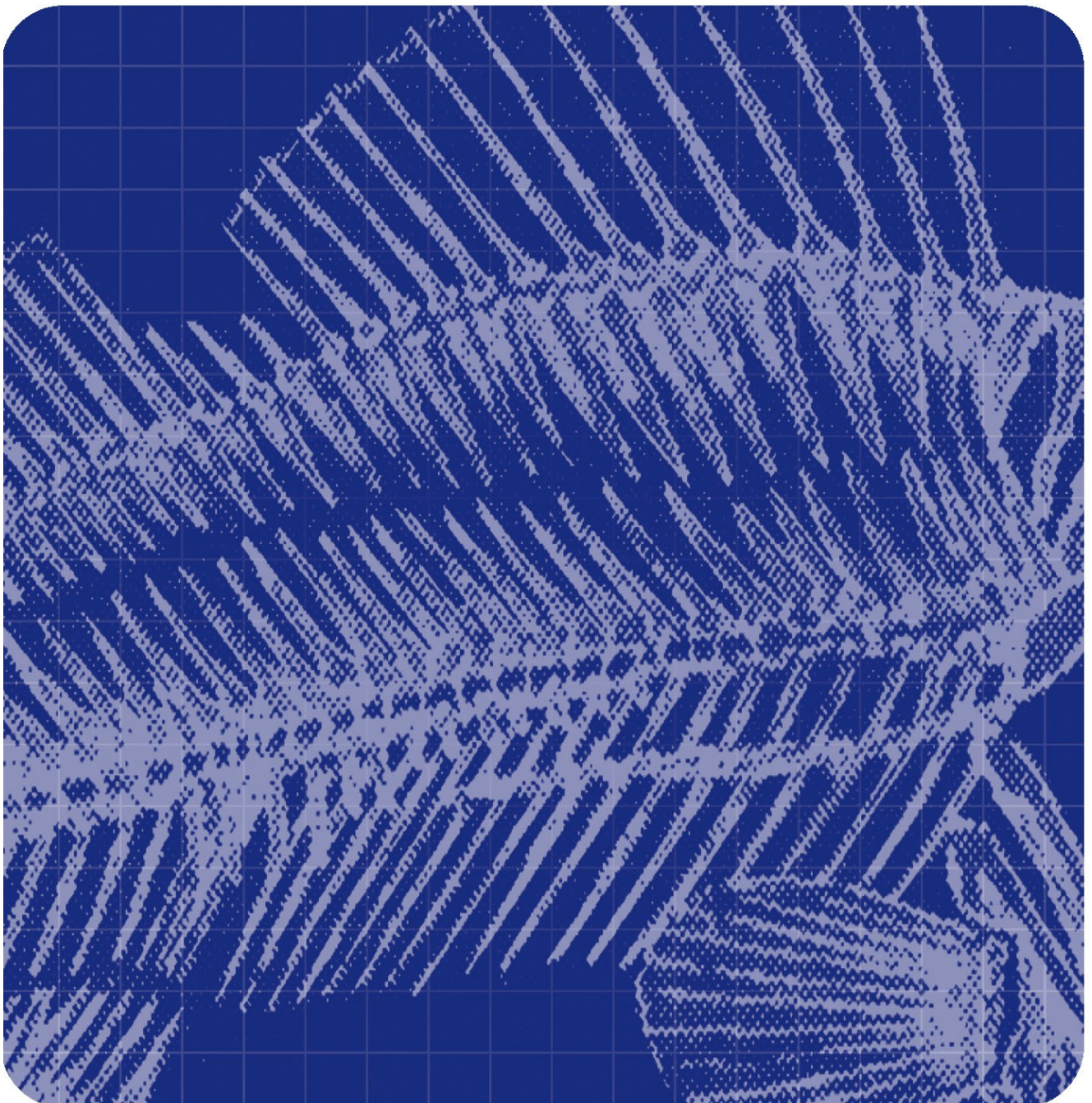


Fiskeriforskning

RAPPORT 16/2003 • Utgitt desember 2003

Real Time PCR for Salmonella-analyse i fiskemel og andre fôrvarer

Halvor Nygaard og Kari M. Lie





Norut Gruppen er et konsern for anvendt forskning og utvikling og består av morselskap og seks datterselskaper. Konsernet ble etablert i 1992 – fundamentert på daværende FORUTs fire avdelinger og Fiskeriforskning.

Konsernet består i dag av følgende selskaper:

Fiskeriforskning, Tromsø

Norut IT, Tromsø

Norut Samfunnsforskning, Tromsø

Norut Medisin og Helse, Tromsø

Norut Teknologi, Narvik

Norut NIBR Finnmark, Alta

Konsernet har til sammen vel 240 ansatte.



Fiskeriforskning (Norsk institutt for fiskeri- og havbruksforskning AS) utfører forskning og utvikling for fiskeri- og havbruksnæringen innen

- sjømat og industriell foredling
- marin bioteknologi og fiskehelse
- fôrutvikling og marin prosessering
- havbruk
- økonomi og marked

Fiskeriforskning har ca. 160 ansatte fordelt på Tromsø (110) og Bergen (50). Fiskeriforskning har velutstyrte laboratorier og forsøksanlegg i Tromsø og Bergen.

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9-13

Postboks 6122

N-9291 Tromsø

Telefon: 77 62 90 00

Telefaks: 77 62 91 00

E-post: post@fiskeriforskning.no

Avdelingskontor Bergen:

Kjerreidviken 16

N-5141 Fyllingsdalen

Telefon: 55 50 12 00

Telefaks: 55 50 12 99

E-post: office@fiskeriforskning.no

Internett: www.fiskeriforskning.no

RAPPORT

Tilgjengelighet:

Åpen

Rapportnr:

16/2003

ISBN:

82-7251-526-1

Tittel:

Real Time PCR for Salmonella-analyse i fiskemel og andre fôrvarer

Dato:

3. desember 2003

Antall sider og bilag:

18

Forfatter(e):

Halvor Nygaard og Kari M. Lie

Sign. forskningssjef:

Ola Flesland

Prosjektnr.:

0056

Oppdragsgiver:

FHL-fiskemel

Oppdragsgivers ref.:

3 stikkord:

Salmonella, PCR, fiskemel

Sammendrag: (maks 200 ord)

Polymerase Chain Reaction (PCR) er en av de viktigste teknikker innen moderne molekylærbiologi. Ved bruk av PCR i mikrobiologisk analyse, amplifiseres (mangfoldiggjøres) DNA-segmenter som er unike for den søkte organisme. PCR-produktet kan detekteres på ulike måter. I "Real Time PCR" blir produktet detektert automatisk under amplifiseringen. I den senere tid er det utviklet flere "Real Time PCR" metoder for påvisning av Salmonella. Metodene er hurtige og tilpasset et stort analyseomfang.

Fiskeriforskning har gjennomført validering av to "Real Time PCR" metoder for analyse av Salmonella i fiskemel og andre fôrvarer. **Light-Cycler Instrument** (Rôche Diagnostics) og **iCycler IQ System** (BioRad Laboratories) ble benyttet parallellt med referansemetoden Malthus Konduktans Metode/NMKL 71. Prøvematerialet var ordinære fôrvarer og kulturer av ulike Salmonella-serovar i eller uten matrix.

Begge PCR-metoder detekterte alle de 41 undersøkte Salmonella serovar som kunne påvises med referansemetoden. Ved analyse av Salmonella i ordinære fôrvarer ga begge PCR-metodene innledningsvis en del falske negative resultater. Etter modifikasjon av prosedyrene for prøvepreparering ble frekvensen av falske negative resultater redusert til et akseptabelt nivå.

Begge PCR-metoder ga over 99 % samsvar med referansemetoden når det ble benyttet modifisert prøvepreparering og kulturbasert anrikning/isolering/konfirmering av alle positive og ugyldige PCR-resultater.

English summary: (maks 100 ord)

A validation study of LightCycler Instrument (Roche Diagnostics) and i-Cycler IQ System (Bio Rad Laboratories) for analysis of Salmonella in fishmeal and other feedingstuffs was undertaken. A total of 1193 samples, including naturally contaminated material and material spiked with different serovars of Salmonella, were analysed with the two PCR methods and Malthus Automated Conductance Method (reference method). With slight modifications to the DNA extraction procedures and with confirmation of PCR-positive and invalid samples, more than 99 % relative trueness was obtained.

INNHold

1	BAKGRUNN.....	1
2	MATERIALER OG METODER.....	2
2.1	FORSØKSOPPLEGG	2
2.2	ANALYSEMETODER	2
2.2.1	Malthus konduktans metode AOAC 991.38 [3] / NMKL 71 [4].....	2
2.2.2	i-Cycler iQ System (Bio-Rad Laboratories)	2
2.2.3	Light-Cycler Instrument (Rôche Diagnostics).....	3
2.3	PRØVER	3
2.3.1	Fiskemel, fiskefôr og andre fôrvarer.....	3
2.3.2	Renkulturer av Salmonella.....	4
2.3.3	Matrix tilsatt Salmonella (<10 Salmonella pr. 25 gram fiskemel eller -olje)	4
2.4	DEFINISJONER	4
2.4.1	Positivt avvikende resultater (positive deviation).....	4
2.4.2	Falskt negative resultater (false negative result).....	4
2.4.3	Sensitivitet (sensitivity)	4
2.4.4	Spesifisitet (specificity)	5
2.4.5	Samsvar (relative trueness)	5
3	RESULTATER OG DISKUSJON	6
3.1	I-CYCLER.....	6
3.1.1	Analyse av Salmonella i fôrvarer/miljøprøver.....	6
3.1.2	Analyse av Salmonella i renkultur/matrix	7
3.1.3	Vurdering av resultater	7
3.2	LIGHT CYCLER	8
3.2.1	Analyse av Salmonella i fôrvarer/miljøprøver.....	8
3.2.2	Analyse av Salmonella i renkultur/matrix	9
3.2.3	Vurdering av resultater	9
4	KONKLUSJON	11
5	REFERANSER.....	12
	VEDLEGG.....	13

1 BAKGRUNN

Fiskemel og fiskefôr som omsettes, skal kontrolleres for Salmonella og oppfylle krav gitt i "Forskrift om fiskemel, fiskeolje, m.v." [1] og "Forskrift om fôrvarer" [2]. Ved påvisning av Salmonella skal berørte partier gjennomgå behandling slik at Salmonella ikke kan påvises ved ny kontroll.

I norsk fiskemel- og fiskefôrindustri utføres årlig til sammen ca 10.000 Salmonella-analyser i ferdigvare. I tillegg kontrolleres råvarer, prosessprøver og miljøprøver. Hurtig analysesvar er av stor betydning for industrien, fordi det letter disponering av tilgjengelig lagerkapasitet og kan begrense omfanget av feilproduksjon.

Tradisjonelle dyrkingsbaserte analysemetoder for Salmonella tar ca. 5 døgn. Malthus konduktans metode som brukes i dag ved Fiskeriforsknings analyselaboratorium tar 2 døgn ved negativt resultat. Kun disse metodene er pr. i dag godkjent av Fiskeridirektoratet for offisiell kontroll i fiskemel- og fiskefôrindustrien.

Fiskeriforskning vurderer å erstatte nåværende Malthus konduktans metode med en PCR-basert metode for analyse av Salmonella. Det er en forutsetning at PCR-metoden kan akkrediteres og at Fiskeridirektoratet aksepterer metoden for bruk innen deres tilsyns-område. Fiskeridirektoratet og Norsk Akkreditering krever i den forbindelse dokumentert at metoden har minst samme sensitivitet og spesifisitet som aksepterte referansemeterer ved analyse av relevante prøvemateriale. En PCR-basert analysemetode for Salmonella er av interesse for Fiskeriforskning fordi den er tilpasset et stort analyseomfang og kan redusere analysetid fra 2 til 1 døgn.

Metoden er planlagt brukt i kombinasjon med en tradisjonell dyrkingsbasert analysemetode der PCR-negative resultater vil være endelige, mens PCR-positive og -ugyldige resultater skal betraktes som presumtvt positive og følges opp med anrikning, isolering og konfirmering. Bruk av slik kombinert metodikk eliminerer muligheten for rapportering av falske positive resultater, og er også nødvendig for å kunne framskaffe isolater til bruk ved serotyping og evt. andre epidemiologiske undersøkelser.

Det er gjennomført validering av to "Real Time PCR" systemer for analyse av Salmonella i fiskemel og andre fôrvarer. Light-Cycler Instrument (Rôche Diagnostics) og iCycler iQ System (BioRad Laboratories) ble benyttet parallellt med referansemeteren Malthus Konduktans Metode/NMKL 71. Prøvematerialet var ordinære fôrvarer og kulturer av ulike Salmonella-serovar med eller uten matrix.

Utstyrspresidentene og deres norske representanter har stilt instrumenter og reagenser til disposisjon for Fiskeriforskning i forsøksperioden. De har også gitt nødvendig opplæring.

2 MATERIALER OG METODER

2.1 FORSØKSOPPLEGG

PCR-metode og referansemetode ble startet med utgangspunkt i identiske (felles) preanrikningskultur.

Sensitivitet, spesifisitet og samsvar ble beregnet for:

- PCR-metodene brukt alene til presumptiv påvisning av Salmonella
- PCR-metodene brukt i kombinasjon med kulturbasert anrikning/isolering/konfirmering av PCR-positive og PCR-ugyldige resultater til påvisning av Salmonella.

2.2 ANALYSEMETODER

2.2.1 Malthus konduktans metode AOAC 991.38 [3] / NMKL 71 [4]

Preanrikning: 25 gram prøve ble overført til 225 ml BPW/L/G (Bufret Peptonvann Lysin Glukose) [5] og inkubert ved 37 °C. Inkuberingstid var 16-18 timer når ikke annet er angitt.

Anrikning: 100 µl preanrikningskultur ble overført til rør med 5 ml anrikningsmedium SS1 (Selenitt Cystein TMAO Dulcitol Medium) [6] og SS2 (Modifisert Lysin Medium) [7]. Rørene ble inkubert i Malthus-inkubator ved 37 °C i 24-30 timer. Ledningsevne i mediene ble registrert kontinuerlig. Kulturer uten Salmonella-typisk ledningsevne-respons ble avsluttet. Kulturer med Salmonella-typisk ledningsevne-respons ble testet mot Oxoid Salmonella Latex Test (Oxoid FT 0203A). Kulturer som ikke agglutinerte ble avsluttet.

Selektiv diagnostisk isolering: Anrikningskulturer som hadde Salmonella-typisk ledningsevne-respons og som agglutinerte, ble strøket ut på Bacto XLT-4 Agar (Difco 0234-17-9 og 0353-72-6) og Oxoid Salmonella Chromogenic Medium (Oxoid CM 1007 og SR 194E). Skålene ble inkubert ved 36-37 °C i 18-24 timer. Skåler uten kolonier ble avsluttet.

Rendyrking: Utvalgte kolonier ble overført til Nutrient Agar (Fluka 70148) og inkubert ved 37 °C i 18-24 timer.

Konfirmering: Utvalgte kolonier ble testet serologisk med Oxoid Salmonella Latex Test (Oxoid FT 0203A) og biokjemisk med BBL Enterotube II (Becton Dickinson 273176).

2.2.2 i-Cycler iQ System (Bio-Rad Laboratories)

DNA-ekstraksjon:

Standard ekstraksjonsprosedyre: 1 ml preanrikningskultur ble overført til rør og sentrifugert ved 13.000 rpm i 2-3 min. Supernatant ble kastet og 200 µl lysisreagens tilsatt pellet. Innholdet ble blandet og røret plassert i varmeblokk ved 56 °C i 15 min. Innholdet ble blandet

og røret plassert i varmeblokk ved 100 °C i 8 min. Innholdet ble blandet og røret sentrifugert ved 13.000 rpm i 2-3 min.

Modifisert ekstraksjonsprosedyre: 1 ml preanrikningskultur ble overført til rør og sentrifugert ved 13.000 rpm i 2-3 min. Supernatant ble kastet og 200 µl lysisreagens tilsatt pellet. Innholdet ble blandet og røret plassert i varmeblokk ved 100 °C i 15 min. Innholdet ble blandet og røret sentrifugert ved 13.000 rpm i 2-3 min.

Amplifisering og deteksjon: 5 µl DNA ekstrakt, evt. fortynnet i autoklavert vann, ble tilsatt 45 µl reagensmix i mikrobrønnskål, og PCR-run startet.

Data-analyse: Reagensmixen inneholder to fluoroporer. FAM detekterer Salmonella, mens Texas Red detekterer internkontroll. Positiv FAM-respons indikerer Salmonella. Negativ FAM-respons samtidig med positiv Texas Red respons indikerer fravær av salmonella. Negativ respons på begge indikerer inhibering av PCR-reaksjon pga. feil ved reagensmix, eller innhold av PCR-inhiberende komponenter i prøven.

2.2.3 Light-Cycler Instrument (Rôche Diagnostics)

DNA-ekstraksjon:

Standard ekstraksjonsprosedyre: Rør med lysisreagens ble sentrifugert ved 500 G i 1 min. 50 µl preanrikningskultur ble tilsatt i røret. Innholdet ble blandet og røret plassert i varme-blokk ved 95 °C i 10 min. Innholdet ble blandet og røret sentrifugert ved 8000 G i 1 min.

Modifisert ekstraksjonsprosedyre: Rør med lysisreagens ble sentrifugert ved 500 G i 1 min. 1000 µl preanrikningskultur ble sentrifugert ved 8000 G i 5 min. og supernatant fjernet vha pippette. Pellet ble resuspendert i lysisreagens og røret plassert i varmeblokk ved 95 °C i 10 min. Innholdet ble blandet og røret sentrifugert ved 8000 G i 1 min.

Amplifisering og deteksjon: 2,5 µl DNA-ekstrakt ble tilsatt 17,5 µl reagens-mix i glass-kappilær, og PCR-run startet.

Data-analyse: Reagensmixen inneholder to fluoroporer som avleses på fluorescenskanal hhv. F2 og F3/F1. F2 detekterer Salmonella, mens F3/F1 detekterer internkontroll. Positiv F2-respons indikerer Salmonella. Negativ F2-respons samtidig med positiv F3/F1 respons indikerer fravær av salmonella. Negativ respons på begge indikerer inhibering av PCR-reaksjon pga. feil ved reagensmix, eller innhold av PCR-inhiberende komponenter i prøven.

2.3 PRØVER

2.3.1 Fiskemel, fiskefôr og andre fôrvarer

Det ble gjort et utvalg av ordinære prøver mottatt fra kunder for Salmonella-kontroll i forsøksperioden. I tillegg ble det benyttet lagrede prøver som var analysert tidligere med påvisning av Salmonella. De fleste prøvetypene som laboratoriet normalt mottar var representert.

Av til sammen 1120 prøver var de 749 første felles for begge PCR-metodene. Øvrige prøver ble kun analysert med en av PCR-metodene og referansemetoden.

2.3.2 Renkulturer av Salmonella

Fryselagrede Salmonella stamkulturer (35 ulike serovar¹) ble inokulert i BPW/L/G (225 ml) og inkubert natten over.

Alle prøvene var felles for begge PCR-metodene.

2.3.3 Matrix tilsatt Salmonella (<10 Salmonella pr. 25 gram fiskemel eller -olje)

Fiskemel eller -olje (25 g) ble suspendert i BPW/L/G (225 ml), tilsatt fortynnede kulturer av Salmonella (38 ulike serovar¹) og inkubert natten over. Fiskemelet var i utgangspunktet fritt for Salmonella.

Alle prøvene var felles for begge PCR-metodene.

2.4 DEFINISJONER

2.4.1 Positivt avvikende resultater (positive deviation)

Positivt avvikende resultat opptrer når den alternative metoden gir et positivt resultat uten konfirmering, når referansemetoden gir et negativt resultat. Dette avviket blir et falskt positivt resultat når det sanne resultatet kan bevises å være negativt. [8]

Positivt resultat med PCR-metode og negativt resultat med referansemetoden, ble registrert som positivt avvikende resultat. Positivt avvikende resultater kan omfatte både falske positive resultater og reelle positive resultater der referansemetoden har feilet.

2.4.2 Falskt negative resultater (false negative result)

Negativt avvikende resultat opptrer når den alternative metoden gir et negativt resultat uten konfirmering, når referansemetoden gir et positivt resultat. Dette avviket blir et falskt negativt resultat når det sanne resultatet kan bevises å være positivt. [8]

Negativt resultat med PCR-metode og konfirmert positivt resultat med referansemetode ble registrert som falskt negativt resultat. Disse er reelle falske negative resultater, fordi referansemetodens konfirmeringstrinn beviser tilstedeværelse av Salmonella.

2.4.3 Sensitivitet (sensitivity)

Andelen av totalt antall positive kulturer/kolonier som blir korrekt plassert i den presumptive undersøkelsen. [8]

¹ Salmonella-stammene i Fiskeriforsknings kultursamling er hovedsakelig isolert fra fiskemel, fiskefôr og andre fôrvarer i forbindelse med laboratoriets kommersielle analysevirksomhet. Stammene er typebestemt ved Nasjonalt Folke-helseinstitutt eller Veterinærinstituttet.

Den del av positive prøver (referansem metode) som blir korrekt plassert med PCR-metode.

(Formler benyttet til beregning av sensitivitet er gitt i vedlegg II)

2.4.4 Spesifisitet (specificity)

Andelen av totalt antall negative kulturer/kolonier som blir korrekt plassert i den presumptive undersøkelsen. [8]

Den del av negative prøver (referansem metode) som blir korrekt plassert med PCR-metode.

(Formler benyttet til beregning av spesifisitet er gitt i vedlegg II)

2.4.5 Samsvar (relative trueness)

Graden av samsvar mellom resultatene av den undersøkte metoden i forhold til resultatene av den anerkjente referansem metoden. [8]

Grad av samsvar mellom resultatene av PCR-metode og referansem metode.

(Formler benyttet til beregning av samsvar er gitt i vedlegg II)

3 RESULTATER OG DISKUSJON

3.1 I-CYCLER

Til sammen 972 prøver ble analysert for Salmonella med Malthus konduktans metode (referansem metode) og i-Cycler.

3.1.1 Analyse av Salmonella i fôrvarer/miljøprøver

1. prøveserie

Utvalgte fôrvarer (749 prøver).

Standard ekstraksjonsprosedyre. DNA-ekstrakt var fortynnet 1/1000 før PCR-analyse.

Av 749 analyserte fôvareprøver ga referansem metoden 31 positive resultater. i-Cycler ga 2 positivt avvikende, 11 falske negative og 122 ugyldige resultater (tabell 3).

I undersøkelsens innledende fase ble det registrert mulig produktinhibering i en del prøver. For å redusere denne effekten ble DNA-ekstraktene fra 1. prøveserie fortynnet 1/1000 før analyse. Senere undersøkelse av fluorescensrespons (TR) fra internkontroll i negative kontrollprøver viste imidlertid at effekten ikke skyldes produktinhibering, men at komponenter i reagensmixene var degradert.

Hovedårsak til høy frekvens av falske negative resultater i 1. prøveserie var høy fortynning av DNA-ekstraktene. Med 1/1000 fortynning av DNA-ekstrakt kreves teoretisk ca 40.000 salmonella-bakterier pr. ml i preanrikningskultur for at minst et genom skal foreligge i PCR-mix. De fleste kulturbaserte metoder, inkl. Malthus Konduktans Metode, krever til sammenligning kun 10 bakterier pr. ml, fordi 100 µl overføres til anrikningstrinnet. Preanrikningskulturer med under 40.000 salmonella-bakterier pr. ml, vil derfor kunne gi deteksjon med kulturbaserte metoder men ikke med PCR-metoden.

Når 9 av 11 ekstrakter som ga falskt negativt resultat ved 1/1000 fortynning senere ble reanalysert ved 1/100 og 1/10 fortynning, ble henholdsvis 2 og 6 ekstrakter funnet salmonella positive.

2. prøveserie

Utvalgte fôrvarer (150 prøver).

Modifisert ekstraksjonsprosedyre (jfr. Materialer og Metoder). DNA-ekstrakt var fortynnet 1/10 før PCR-analyse.

Med bakgrunn i erfaringene fra 1. prøveserie ble det gjennomført analyse av 150 nye prøver med nye reagenser, forenklet ekstraksjonsprosedyre og redusert fortynning (1/10) av DNA-ekstraktene. Av de 150 prøvene ga referanse-metoden 18 positive resultater. I-Cycler ga 3 positivt avvikende, 1 falskt negativt og 4 ugyldige resultater (tabell 4).

Det ble også gjort forsøk på å ekstrahere kun 0,1 ml av de samme 150 preanrikningskulturer og deretter analysere ufortynnet DNA-ekstrakt. Denne prosedyren skal teoretisk gi samme DNA-konsentrasjon til analyse som ovenfor, men innebærer en betydelig arbeidsbesparelse.

i-Cycler ga 5 positivt avvikende, 1 falskt negativt og 8 ugyldige resultater (tabell 5).

3.1.2 Analyse av Salmonella i renkultur/matrix

3. prøveserie

Renkulturer av salmonella (35 prøver)

Standard ekstraksjonsprosedyre. DNA-ekstrakt var fortynnet 1/1000 før PCR-analyse.

Av 35 Salmonella-renkulturer detekterte i-Cycler de samme 32 serovar som referansemetoden og i tillegg S.ruiru (tabell 6). Kulturene som var inokulert med S.miami og S.panama ble ikke detektert med noen av metodene. Etter visuell vurdering av turbiditet hadde disse kulturene ingen vekst.

4. prøveserie

Matrix tilsatt salmonella (38 prøver)

Standard ekstraksjonsprosedyre. DNA-ekstrakt var fortynnet 1/1000 før PCR-analyse.

I fiskemel tilsatt 37 individuelle salmonella serovar i lav konsentrasjon (<10 Salmonella pr. 25 gram mel) detekterte i-Cycler de samme 26 typene som referansemetoden og i tillegg S.worthington (tabell 7). 11 serovar ble ikke detektert med noen av metodene. Årsaken til dette er trolig at disse kulturene har mottatt <1 Salmonellabakterie fra inokulum, og derfor er Salmonellafri. S.berta tilsatt i fiskeolje ble detektert med begge metoder.

3.1.3 Vurdering av resultater

i-Cycler viste lav sensitivitet i 1. prøveserie p.g.a. høy frekvens av falske negative resultater (tabell 1). Det ble funnet at viktigste årsak til falske negative resultater var høy fortynning av DNA-ekstraktene (1/1000) før PCR-analyse. Med redusert ekstraktfortynning (1/10) i 2. og 3. prøveserie ble metodens sensitivitet sterkt forbedret. Det finnes muligheter for å øke metodens sensitivitet ytterligere ved redusert ekstraktfortynning eller øket preanrikningstid.

i-Cycler viste lav spesifisitet p.g.a. mange ugyldige resultater, særlig i 1. prøveserie. Det ble antatt at viktigste årsak til dette var svekket aktivitet i PCR-reagensene etter gjentatte uttak fra de samme stamløsninger. Spesifisiteten ble betydelig forbedret ved bruk av nye PCR-reagenser i 2. og 3. prøveserie.

i-Cycler kunne påvise alle de ulike tilsatte Salmonella serovar som kunne påvises med referansemetoden etter vellykket oppformering.

Tabell 1. Sensitivitet, spesifisitet og samsvar mellom referansemetode (Malthus konduktans metode) og i-Cycler brukt alene til presumptiv salmonellapåvisning eller sammen med kulturbasert anrikning/isolering/konfirmasjon av positive og ugyldige PCR-resultater.

SERIE	METODE	SENSITIVITET	SPESIFISITET	SAMSVAR
1	I-CYCLER 1)	64,5 %	82,7 %	82,0 %
2	I-CYCLER 2)	94,4 %	94,7 %	94,7 %
3	I-CYCLER 3)	94,4 %	90,2 %	90,7 %
1	I-CYCLER 1) + kulturbasert oppfølging	64,5 %	100,0 %	98,5 %
2	I-CYCLER 2) + kulturbasert oppfølging	94,4 %	100,0 %	99,3 %
3	I-CYCLER 3) + kulturbasert oppfølging	94,4 %	100,0 %	99,3 %

¹⁾ 1,0 ml ekstrahert. Ekstrakt fortynnet 1/1000 før PCR-analyse

²⁾ 1,0 ml ekstrahert. Ekstrakt fortynnet 1/10 før PCR-analyse

³⁾ 0,1 ml ekstrahert. Ekstrakt ikke fortynnet før PCR-analyse

3.2 LIGHT CYCLER

Til sammen 1043 prøver ble analysert for Salmonella med Malthus konduktans metode (referansemetode) og Light-Cycler.

3.2.1 Analyse av Salmonella i fôrvarer/miljøprøver

1. prøveserie

Utvalgte fôrvarer (749 prøver).

Standard ekstraksjonsprosedyre.

Av 749 analyserte fôrvareprøver ga referansemetoden 31 positive resultater. Light Cyclus ga 1 positivt avvikende, 6 falske negative og 71 ugyldige resultater (tabell 8).

I 1. prøveserie ga Light Cyclus høy frekvens av falske negative resultater. Det ble antatt at viktigste årsak til dette var lav salmonella-konsentrasjon i en del av preanrikningskulturene.

Med standard ekstraksjonsprosedyre kreves teoretisk ca 1600 salmonella-bakterier pr. ml i pre-anrikningskultur for at minst et genom skal foreligge i PCR-mix. De fleste kulturbaserte metoder, inkl. Malthus Konduktans Metode, krever til sammenligning kun 10 bakterier pr. ml, fordi 100 µl overføres til anrikningstrinnet. Preanrikningskulturer med under 1600 salmonella-bakterier pr. ml, vil derfor kunne gi deteksjon med kulturbaserte metoder men ikke med PCR-metoden.

2. prøveserie

Utvalgte fôrvarer (67 prøver).

Standard ekstraksjonsprosedyre. DNA-ekstraktene (anonymisert) ble nedfrosset og sendt på tørris til Biotecon Diagnostics i Tyskland for PCR-analyse.

Det ble benyttet samme ekstraksjonsprosedyre som i 1. prøveserie.

Av 67 analyserte prøver ga referansemetoden 29 positive resultater. Light Cycler ga 0 positivt avvikende, 8 falskt negative og 0 ugyldige resultater (tabell 9).

3. prøveserie

Utvalgte fôrvarer (154 prøver).

Modifisert ekstraksjonsprosedyre (jfr. Materialer og Metoder) og forlenget inkuberingstid for preanrikningskulturene (24 timer). DNA-ekstraktene (anonymisert) ble nedfrosset og sendt på tørris til Bioticon Diagnostics i Tyskland for PCR-analyse. Prøvene var tint ved mottak i Tyskland, to døgn etter pakking.

Med bakgrunn i erfaringene fra 1. og 2. prøveserie ble inkuberingstid for preanrikningskulturene økt fra 16-18 timer til 24 timer. Det ble også benyttet modifisert ekstraksjonsprosedyre der 1 ml kultur ble ekstrahert mot kun 50 µl med standardprosedyre.

Av 154 analyserte prøver ga referansemetoden 31 positive resultater. Light Cycler ga 12 positivt avvikende, 1 falskt negativ og 0 ugyldige resultater (tabell 10).

3.2.2 Analyse av Salmonella i renkultur/matrix

4. prøveserie

Renkulturer av salmonella (35 prøver)

Standard ekstraksjonsprosedyre.

Av 35 Salmonella-renkulturer detekterte Light Cycler de samme 32 serovar som referansemetoden og i tillegg S.ruiru (tabell 11). Kulturene som var inokulert med S.miami og S.panama ble ikke detektert med noen av metodene. Etter visuell vurdering av turbiditet hadde disse kulturene ingen vekst.

5. prøveserie

Matrix tilsatt salmonella (38 prøver)

Standard ekstraksjonsprosedyre.

I fiskemel tilsatt 37 individuelle salmonella serovar i lav konsentrasjon (<10 Salmonella pr. 25 gram mel) detekterte Light Cycler de samme 26 typer som referansemetoden og i tillegg S.worthington (tabell 12). 11 serovar ble ikke detektert med noen av metodene. Årsaken er trolig at disse kulturene har mottatt <1 Salmonella fra inokulum, og derfor er Salmonellafri. S.bertha tilsatt i fiskeolje ble detektert med begge metoder.

3.2.3 Vurdering av resultater

Light Cycler viste lav sensitivitet i 1. og 2. prøveserie p.g.a. høy frekvens av falske negative resultater (tabell 2). Det ble antatt at viktigste årsak til dette var lav salmonella-konsentrasjon i en del av preanrikningskulturene.

I 3. prøveserie ble det derfor benyttet en modifisert ekstraksjonsprosedyre og forlenget inkuberingstid for preanrikningskulturene. Disse endringene førte til en sterk forbedring i metodens sensitivitet.

Light-Cycler viste noe lav spesifisitet i 1. prøveserie p.g.a. mange ugyldige resultater. Viktigste årsak til dette var kontaminering av PCR-reagenser og produktinhibering. Disse problemene ble unngått i 2. og 3. prøveserie. I 3. prøveserie skyldes lav spesifisitet hovedsakelig forekomst av positivt avvikende resultater.

Tabell 2. Sensitivitet, spesifisitet og samsvar mellom referansemethode (Malthus konduktans metode) og Light-Cycler brukt alene til presumtiv salmonellapåvisning eller sammen med kulturbasert anrikning/isolering/ konfirmasjon av positive og ugyldige PCR-resultater.

SERIE	METODE	SENSITIVITET	SPESIFISITET	SAMSVAR
1	L-CYCLER ¹⁾	67,7 %	90,5 %	89,6 %
2	L-CYCLER ²⁾	72,4 %	100,0 %	88,1 %
3	L-CYCLER ³⁾	96,8 %	90,2 %	91,6 %
1	L-CYCLER ¹⁾ + kulturbasert oppfølging	80,6 %	100,0 %	99,2 %
2	L-CYCLER ²⁾ + kulturbasert oppfølging	72,4 %	100,0 %	88,1 %
3	L-CYCLER ³⁾ + kulturbasert oppfølging	96,8 %	100,0 %	99,4 %

¹⁾ Standard prosedyre

²⁾ Standard prosedyre, PCR-analyse utført i anonymiserte ekstrakter ved Bioteccon Diagnostics, Tyskland.

³⁾ Modifisert ekstraksjonsprosedyre og forlenget inkuberingstid for preanrikning. PCR-analyse utført i anonymiserte ekstrakter ved Bioteccon Diagnostics, Tyskland.

4 KONKLUSJON

PCR-metodene vurderes brukt til presumpitiv påvisning av Salmonella i preanrikningskulturer, der negative resultater vil være endelige, mens alle positive og ugyldige resultater skal følges opp med anrikning/isolering/konfirmering med kulturbasert metodikk. Med en slik kombinert metodikk vil kun falske negative PCR-resultater ha betydning for sluttresultatets sikkerhet.

I innledende undersøkelser ga begge PCR-metoder en del falske negative resultater. Hovedårsaken var lav konsentrasjonen av Salmonella-bakterier i preanrikningsmediet. Frekvens av falske negative resultater ble sterkt redusert etter modifikasjon av prøvepreanrikningen:

i-Cycler: DNA-ekstrakt fortynnes maksimum 1/10 før PCR analyse.

Light Cycler: Inkuberingstid for preanrikningskulturene økes til 24 timer.
Prøvemengden som ekstraheres økes fra 50 µl til 1000 µl.

Med modifisert prøvepreparering ga iCycler 1 falsk negativ av 18 konfirmerte positive prøver, mens LightCycler ga 1 falsk negativ av 31 konfirmerte positive prøver. Dette gir sensitivitet på hhv. 94,4 og 96,8%.

Frekvens av positivt avvikende resultater var moderat for begge metodene. Det må understrekes at positivt avvikende resultater både kan være falske positive resultater og korrekte positive resultater der referansemetode har feilet. I den foreliggende undersøkelse er PCR-resultatenes riktighet kun bestemt av samsvaret med referansemetoden. PCR-metodenes sensitivitet og spesifisitet kan derfor ikke bli høyere enn for referansemetoden.

Frekvens av ugyldige resultater ble redusert når rutinene for behandling av PCR reagenser ble forbedret med sikte på å bevare reagensenes stabilitet.

Når referansemetodens anriknings-, isolerings- og konfirmeringstrinn betraktes som den kulturbaserte oppfølging¹ i en kombinert metodikk, blir alle positivt avvikende og ugyldige PCR-resultater riktig plassert. Spesifisitet blir da 100% for begge metoder, mens samsvar blir 99,3 og 99,4 % for hhv. iCycler og LightCycler.

Begge PCR-metoder detekterte minst de samme serovar som referansemetoden i prøver med tilsatt Salmonella. Dette viser at de benyttede DNA målsekvenser og hybridiserings-prober dekker et bredt spekter av Salmonella serovar.

Med bakgrunn i arbeidet som er referert i rapporten, vurderes både iCycler og LightCycler som velegnet til Salmonella-analyse i fiskemel, fiskefôr og andre fôrvarer. For å oppnå tilfredsstillende sensitivitet og spesifisitet kreves enkle modifikasjoner av prosedyrene for prøvepreanrikning, samt oppfølging av alle positive og ugyldige resultater med tradisjonell kulturbasert analysemetodikk.

¹ Referansemetoden f.o.m. anrikningstrinnet kan betraktes som den kulturbaserte videreføring av alle positivt avvikende og ugyldige PCR analyser, fordi prøve til DNA-ekstraksjon og inokulum til anrikningsmedium ble tatt ut samtidig fra felles preanrikningskulturer.

5 REFERANSER

1. FISKERIDEPARTEMENTET. Forskrift om fiskemel, fiskeolje, m.v. 1999. 12 s.
2. FISKERIDEPARTEMENTET OG LANDBRUKSDEPARTEMENTET. Forskrift om forvarer. 2002. 255 s.
3. AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. AOAC Official Method 991.38. Salmonella in Foods. Automated Conductance Method.
4. NORDISK METODIKKOMMITTE FOR LIVSMEDEL. Salmonella. Detection in Foods. 1999. 9 s. (NMKL no. 71, 5. ed.)
5. Smith,P.J., Boardman,A. & Shutt,P.C. (1989). Detection of salmonellasin animal feed by electrical conductance. Journal of Applied Bacteriology 67, 575:588.
6. Easter,M.C. & Gibson,D.M. (1985). Rapid and automated detection of salmonella by electrical measurements. J.Hyg.Camb. 94, 245:262.
7. Smith,P.J., Bolton,F.J., Gayner,V.E. & Eccles,A. (1990). Improvements to a lysine medium for detection of salmonella by electrical conductance. Letters in Applied Microbiology 11, 84:86.
8. EUROPEAN CO-OPERATION FOR ACCREDITATION. Accreditation for Microbiological Laboratories. 2002. 26 s. (EA-04/10).

VEDLEGG I

Tabell 3. Analyse av Salmonella i ordinære prøver av fiskemel, fiskefôr og andre fôrvarer. Prøvene ble analysert med Malthus konduktans metode (referansemetode) og i-Cycler (1,0 ml ekstrahert, ekstrakt fortynnet 1/1000 før PCR-analyse). Begge metoder tok utgangspunkt i felles preanrikningskulturer. (POS.DEV.: positivt avvikende, NEG.FAL.: falskt negativ, N.VALID: ugyldig).

SAMPLE	#	REFERANSEMETODE		I-CYCLER		
		POS	NEG	POS (POS.DEV)	NEG (NEG.FAL)	N.VALID
Fiskemel	558	21	537	13 (0)	440 (8)	1) 105
Fiskefor	82	6	76	5 (1)	70 (2)	2) 7
Rekemel/hvetemel	2	0	2	0 (0)	2 (0)	0
Rapskake	10	4	6	3 (0)	7 (1)	0
Poultry pulp	6	0	6	0 (0)	6 (0)	0
Fiskeolje	1	0	1	0 (0)	0 (0)	3) 1
Fiske hydrolysat	11	0	11	0 (0)	9 (0)	4) 2
Miljøprøver	79	0	79	1 (1)	71 (0)	5) 7
SUM	749	31	718	22 (2)	6) 605 (11)	122

- 1) PCR-reaksjon hemmet (97). Falsk positiv ved x100 fortynning, ikke analysert ved x1000 fortynning (3). Andre grunner (5)
- 2) PCR-reaksjon hemmet (7)
- 3) PCR-reaksjon hemmet (1)
- 4) PCR-reaksjon hemmet (2)
- 5) PCR reaksjon hemmet (5). Falsk positiv ved x100 fortynning, ikke analysert ved x1000 fortynning (2)
- 6) Av de 11 falsk negative prøvene, ble 9 reanalysert v. x100 fortynning av ekstrakt med 2 påvisninger, og v. x10 fortynning med 6 påvisninger.

Tabell 4. Analyse av Salmonella i ordinære prøver av fiskemel, fiskefôr og andre fôrvarer. Prøvene ble analysert med Malthus konduktans metode (referansemetode) og i-Cycler (1,0 ml ekstrahert, ekstrakt fortynnet 1/10 før PCR-analyse). Begge metoder tok utgangspunkt i felles preanrikningskulturer. (POS.DEV.: positivt avvikende, NEG.FAL.: falskt negativ, N.VALID: ugyldig).

SAMPLE	#	REFERANSEMETODE		I-CYCLER		
		POS	NEG	POS (POS.DEV)	NEG (NEG.FAL)	N.VALID
Fiskemel	93	16	77	19 (3)	71 (0)	1) 3
Fiskefor	29	0	29	0 (0)	29 (0)	0
Mais gluten	1	0	1	0 (0)	1 (0)	0
Soya	1	0	1	0 (0)	1 (0)	0
Miljøprøver	26	2	24	1 (0)	24 (1)	2) 1
SUM	150	18	132	20 (3)	126 (1)	4

- 1) PCR-reaksjon hemmet (3)
- 2) PCR-reaksjon hemmet (1)

Tabell 5. Analyse av *Salmonella* i ordinære prøver av fiskemel, fiskefôr og andre fôrvarer. Prøvene ble analysert med Malthus konduktans metode (referansemetode) og i-Cycler (0,1 ml ekstrahert, ekstrakt ikke fortynnet før PCR-analyse). Begge metoder tok utgangspunkt i felles preanrikningskulturer. (POS.DEV.: positivt avvikende, NEG.FAL.: falskt negativ, N.VALID: ugyldig).

SAMPLE	#	REFERANSEMETODE		I-CYCLER		
		POS	NEG	POS (POS.DEV)	NEG (NEG.FAL)	N.VALID
Fiskemel	93	16	77	19 (4)	70 (1)	1) 4
Fiskefôr	29	0	29	0 (0)	29 (0)	0
Mais gluten	1	0	1	0 (0)	1 (0)	0
Soya	1	0	1	0 (0)	1 (0)	0
Miljøprøver	26	2	24	3 (1)	19 (0)	2) 4
SUM	150	18	132	22 (5)	120 (1)	8

- 1) PCR-reaksjon hemmet (4)
2) PCR-reaksjon hemmet (4)

Tabell 6. Renkulturer av *Salmonella* dyrket i preanrikningsmedium over natten. Prøvene ble analysert for *Salmonella* med Malthus konduktans metode (referansemetode) og i-Cycler (1,0 ml ekstrahert, ekstrakt fortynnet 1/1000 før PCR-analyse). Begge metoder tok utgangspunkt i felles preanrikningskulturer. (POS.DEV.: positivt avvikende, NEG.FAL.: falskt negativ, N.VALID: ugyldig).

SAMPLE	#	REFERANSEMETODE		I-CYCLER		
		POS	NEG	POS (POS.DEV)	NEG (NEG.FAL)	N.VALID
32 serovar i fiskemel 1)	32	32	0	32 (0)	0 (0)	0
3 serovar i fiskemel 2)	3	0	3	3) 1 (1)	2 (0)	0
SUM	35	32	3	33 (1)	2 (0)	0

- 1) S.agona, S.anatum, S.bere, S.cerro, S.cubana, S.dublin, S.duisburg, S.durban, S.edinburgh, S.enteritidis, S.gaminera, S.hadar, S.havana, S.infantis, S.johannesburg, S.kentucky, S.koumra, S.lexington, S.livingstone, S.mbandaka, S.montevideo, S.oranienburg, S.putten, S.sandiego, S.schwartzengrund, S.senftenberg, S.sp.(13,15:y:-), S.sp.(6,7:b:?), S.stanley, S.tennessee, S.typhimurium, S.westhampton.
2) S.miami, S.panama, S.ruiru.
3) I fiskemel med tilsatt S.ruiru, ble salmonella påvist med I-Cycler, men ikke med referansemetoden.

Tabell 7. Fiskemel eller -olje (matrix) tilsatt Salmonella i lav konsentrasjon (<10 Salmonella/25 gram/ matrix). Prøvene ble analysert for Salmonella med Malthus konduktans metode (referanse-metode) og i-Cycler (1,0 ml ekstrahert, ekstrakt fortynt 1/1000 før PCR-analyse). Begge metoder tok utgangspunkt i felles preanriknings-kulturer. (POS.DEV.: positivt avvikende, NEG.FAL.: falskt negativ, N.VALID: ugyldig).

SAMPLE	#	REFERANSEMETODE		I-CYCLER		
		POS	NEG	POS (POS.DEV)	NEG (NEG.FAL)	N.VALID
25 serovar i fiskemel 1)	25	25	0	25 (0)	0 (0)	0
12 serovar i fiskemel 2)	12	0	12	4) 1 (1)	11 (0)	0
1 serovar i fiskeolje 3)	1	1	0	1 (0)	0 (0)	0
SUM	38	26	12	27 (1)	11 (0)	0

1. S.agona, S.bere, S.bertha, S.cubana, S.durban, S.enteritidis, S.gaminera, S.infantis, S.kentucky, S.livingstone, S.mbandaka, S.montevideo, S.oranienburg, S.panama, S.putten, S.ruiru, S.sandiego, S.schwartzengrund, S.sp.(3,10:?:?), S.sp.(4:12:d), S.sp.(3,15:y:-), S.sp.(6,7:-:-), S.stanley, S.tennessee, S.typhimurium.
2. S.anatum, S.cerro, S.edinburgh, S.hadar, S.havana, S.johannesburg, S.koumra, S.lexington, S.miami, S.senftenberg, S.westhampton, S.worthington
3. S.bertha
4. I fiskemel med tilsatt S.worthington ble salmonella påvist med I-Cycler, men ikke med referansemetoden.

Tabell 8. Analyse av Salmonella i ordinære prøver av fiskemel, fiskefôr og andre fôrvarer. Prøvene ble analysert med Malthus konduktans metode (referansemetode) og Light Cycler (50 µl ekstrahert). Begge metoder tok utgangspunkt i felles preanrikningskulturer. (POS.DEV.: positivt avvikende, NEG.FAL.: falskt negativ, N.VALID: ugyldig).

SAMPLE	#	REFERANSEMETODE		LIGHT-CYCLER		
		POS	NEG	POS (POS.DEV)	NEG (NEG.FAL)	N.VALID
Fiskemel	558	21	537	13 (0)	499 (6)	1) 43
Fiskefôr	82	6	76	5 (1)	73 (0)	2) 3
Rekemel/hvetemel	2	0	2	0 (0)	2 (0)	0
Raps kake	10	4	6	3 (0)	1 (0)	3) 9
Poultry pulp	6	0	6	0 (0)	6 (0)	0
Fiskeolje	1	0	1	0 (0)	1 (0)	0
Fiske hydrolysat	11	0	11	0 (0)	11 (0)	0
Miljøprøver	79	0	79	1 (1)	63 (0)	4) 16
SUM	749	31	718	22 (2)	656 (6)	71

- 1) Kontaminert under DNA-ekstraksjon (21). PCR-reaksjon hemmet (18). Andre grunner (4)
- 2) PCR-reaksjon hemmet (2). Andre grunner (1)
- 3) PCR-reaksjon hemmet (9)
- 4) Kontaminert under DNA-ekstraksjon (6). PCR-reaksjon hemmet (10)

Tabell 9. Analyse av Salmonella i ordinære prøver av fiskemel og andre fôrvarer. Prøvene ble analysert med Malthus konduktans metode (referansemetode) og Light Cyclor (50 µl ekstrahert, PCR-analyse utført ved Bioticon Diagnostics, Potsdam, Tyskland). Begge metoder tok utgangspunkt i felles preanrikningskulturer. (POS.DEV.: positivt avvikende, NEG.FAL.: falskt negativ, N.VALID: ugyldig).

SAMPLE	#	REFERANSEMETODE		LIGHT-CYCLER		
		POS	NEG	POS (POS.DEV)	NEG (NEG.FAL)	N.VALID
Fiskemel	50	27	23	19 (0)	31 (8)	0
Miljøprøver	17	2	15	2 (0)	15 (0)	0
SUM	67	29	38	21 (0)	46 (8)	0

Tabell 10. Analyse av Salmonella i ordinære prøver av fiskemel, fiskefôr og andre fôrvarer. Prøvene ble analysert med Malthus konduktans metode (referansemetode) og Light Cyclor (24 timer preanrikningstid, 1 ml ekstrahert, PCR-analyse utført ved Bioticon Diagnostics, Potsdam, Tyskland). Begge metoder tok utgangspunkt i felles preanrikningskulturer. (POS.DEV.: positivt avvikende, NEG.FAL.: falskt negativ, N.VALID: ugyldig).

SAMPLE	#	REFERANSEMETODE		LIGHT-CYCLER		
		POS	NEG	POS (POS.DEV)	NEG (NEG.FAL)	N.VALID
Fiskemel	62	11	51	17 (6)	45 (0)	0
Fiskefôr	75	20	55	24 (5)	51 (1)	0
Mais gluten	8	0	8	1 (1)	7 (0)	0
Miljøprøver	9	0	9	0 (0)	9 (0)	0
SUM	154	31	123	42 (12)	112 (1)	0

Tabell 11. Renkulturer av *Salmonella* dyrket i preanrikningsmedium over natten. Prøvene ble analysert for *Salmonella* med Malthus konduktans metode (referansemetode) og Light Cyclers (50 µl ekstrahert). Begge metoder tok utgangspunkt i felles preanrikningskulturer. (POS.DEV.: positivt avvikende, NEG.FAL.: falskt negativ, N.VALID: ugyldig).

SAMPLE	#	REFERANSEMETODE		LIGHT-CYCLER		
		POS	NEG	POS (POS.DEV)	NEG (NEG.FAL)	N.VALID
32 serovar i fiskemel 1)	32	32	0	32 (0)	0 (0)	0
3 serovar i fiskemel 2)	3	0	3	3) 1 (1)	2 (0)	0
SUM	35	32	3	33 (1)	2 (0)	0

- 1) *S. agona*, *S. anatum*, *S. bere*, *S. cerro*, *S. cubana*, *S. dublin*, *S. duisburg*, *S. durban*, *S. edinburgh*, *S. enteritidis*, *S. gaminera*, *S. hadar*, *S. havana*, *S. infantis*, *S. johannesburg*, *S. kentucky*, *S. koumra*, *S. lexington*, *S. livingstone*, *S. mbandaka*, *S. montevideo*, *S. oranienburg*, *S. putten*, *S. sandiego*, *S. schwartzengrund*, *S. senftenberg*, *S. sp.(13,15:y:-)*, *S. sp.(6,7:b:?)*, *S. stanley*, *S. tennessee*, *S. typhimurium*, *S. westhampton*.
- 2) *S. miami*, *S. panama*, *S. ruiru*.
- 3) I fiskemel med tilsatt *S. ruiru*, ble salmonella påvist med Light-Cyclers, men ikke med referansemetoden.

Tabell 12. Fiskemel eller -olje (matrix) tilsatt *Salmonella* i lav konsentrasjon (<10 *Salmonella*/25 gram/ matrix). Prøvene ble analysert for *Salmonella* med Malthus konduktans metode (referansemetode) og Light Cyclers (50 µl ekstrahert). Begge metoder tok utgangspunkt i felles preanrikningskulturer. (POS.DEV.: positivt avvikende, NEG.FAL.: falskt negativ, N.VALID: ugyldig).

SAMPLE	#	REFERANSEMETODE		LIGHT-CYCLER		
		POS	NEG	POS (POS.DEV)	NEG (NEG.FAL)	N.VALID
25 serovar i fiskemel 1)	25	25	0	25 (0)	0 (0)	0
12 serovar i fiskemel 2)	12	0	12	4) 1 (1)	11 (0)	0
1 serovar i fiskeolje 3)	1	1	0	1 (0)	0 (0)	0
SUM	38	26	12	27 (1)	11 (0)	0

- 1) *S. agona*, *S. bere*, *S. berta*, *S. cubana*, *S. durban*, *S. enteritidis*, *S. gaminera*, *S. infantis*, *S. kentucky*, *S. livingstone*, *S. mbandaka*, *S. montevideo*, *S. oranienburg*, *S. panama*, *S. putten*, *S. ruiru*, *S. sandiego*, *S. schwartzengrund*, *S. sp.(3,10:?:?)*, *S. sp.(4:12:d)*, *S. sp.(3,15:y:-)*, *S. sp.(6,7:-:-)*, *S. stanley*, *S. tennessee*, *S. typhimurium*.
- 2) *S. anatum*, *S. cerro*, *S. edinburgh*, *S. hadar*, *S. havana*, *S. johannesburg*, *S. koumra*, *S. lexington*, *S. miami*, *S. senftenberg*, *S. westhampton*, *S. worthington*
- 3) *S. berta*
- 4) I fiskemel med tilsatt *S. worthington* ble salmonella påvist med Light-Cyclers, men ikke med referansemetoden.

VEDLEGG II

Formler for beregning av sensitivitet, spesifisitet og samsvar (jfr. definisjoner side 7)

A _{POS}	positive resultater med alternativ(PCR) metode
A _{NEG}	negative resultater med alternativ(PCR) metode
A _{POS.DEV}	positivt avvikende resultater med alternativ(PCR) metode
A _{NEG.FAL}	falskt negative resultater med alternativ(PCR) metode
A _{N.VALID}	ugyldige resultater med alternativ(PCR) metode
A _{N.VALID+}	ugyldige resultater med alternativ(PCR) metode som blir positive etter konfirmering
A _{N.VALID-}	ugyldige resultater med alternativ(PCR) metode som blir negative etter konfirmering
#	Antall prøver analysert
R _{POS}	positive resultater med referansemetode (Malthus)
R _{NEG}	negative resultater med referansemetode (Malthus)

SENSITIVITET:

PCR brukt alene til presumtiv påvisning:

$$\frac{\mathbf{A}_{\text{POS}} - \mathbf{A}_{\text{POS.DEV}}}{\mathbf{R}_{\text{POS}}}$$

PCR brukt i kombinasjon med kulturbasert anrikning/isolering/konfirmering:

$$\frac{\mathbf{A}_{\text{POS}} - \mathbf{A}_{\text{POS.DEV}} + \mathbf{A}_{\text{N.VALID+}}}{\mathbf{R}_{\text{POS}}}$$

SPESIFISITET:

PCR brukt alene til presumtiv påvisning:

$$\frac{\mathbf{A}_{\text{NEG}} - \mathbf{A}_{\text{NEG.FAL}}}{\mathbf{R}_{\text{NEG}}}$$

PCR brukt i kombinasjon med kulturbasert anrikning/isolering/konfirmering:

$$\frac{\mathbf{A}_{\text{NEG}} - \mathbf{A}_{\text{NEG.FAL}} + \mathbf{A}_{\text{N.VALID-}} + \mathbf{A}_{\text{POS.DEV}}}{\mathbf{R}_{\text{NEG}}}$$

SAMSVAR:

PCR brukt alene til presumtiv påvisning:

$$\frac{\mathbf{A}_{\text{POS}} - \mathbf{A}_{\text{POS.DEV}} + \mathbf{A}_{\text{NEG}} - \mathbf{A}_{\text{NEG.FAL}}}{\mathbf{\#}}$$

PCR brukt i kombinasjon med kulturbasert anrikning/isolering/konfirmering:

$$\frac{\mathbf{A}_{\text{POS}} + \mathbf{A}_{\text{NEG}} - \mathbf{A}_{\text{NEG.FAL}} + \mathbf{A}_{\text{N.VALID}}}{\mathbf{\#}}$$



Fiskeriforskning

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9-13

Postboks 6122

N-9291 Tromsø

Telefon: 77 62 90 00

Telefaks: 77 62 91 00

E-post: post@fiskeriforskning.no

Avdelingskontor Bergen:

Kjerreidviken 16

N-5141 Fyllingsdalen

Telefon: 55 50 12 00

Telefaks: 55 50 12 99

E-post: office@fiskeriforskning.no

Internett: www.fiskeriforskning.no

ISBN 82-7251-526-1

ISSN 0806-6221