

KUNNSKAP OM FISKEHELSE

I denne spalten vil Veterinærinstituttet i hvert nummer bidra med oppdatert kunnskap om fiskehelse. Ansvarlig for spalten er fiskehelseansvarlig Anne-Gerd Gjevre anne-gerd.gjevre@vetinst.no



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute

Av plasshensyn har vi valgt å utelate kildehenvisninger. Ta kontakt med spalteansvarlig dersom du ønsker opplysninger om dette.

Diagnostiske tester Hva sier de ?

Smittsomme sykdommer er av de største tapsbringende faktorene i norsk så vel som internasjonal akvakultur. Behovet for å kunne påvise sykdom på et tidlig stadium er derfor av stor betydning for å kontrollere et utbrudd, iverksette tiltak, begrense tap og videre spredning. Utviklingen av molekylærgenetiske metoder (PCR-metoder) hvor små mengder arvestoff (RNA/DNA –biter) fra aktuelle smittestoff kan påvises i organprøver, vann og andre miljøprøver har muliggjort tidlig påvisning. Dette har fått stor betydning i overvåkingen av de mest sentrale infeksjonssykdommene. Men vil alltid et positivt eller negativt svar eller resultat fra laboratoriet være «sant»?

Edgar Brun, Hilde Sindre, Arthur Mårtensson, Saraya Tavornpanich
Veterinærinstituttet

Påvisning av smittestoff som beslutningsgrunnlag har fått et stort anvendelsesområde. PCR-metodene som brukes i dag til dette formålet, er effektive både kostnadmessig og laboratorieteknisk og de kan lett automatiseres. Dette har bidratt til stort fokus på hvordan en kan bruke disse metodene til å påvise smittestoff på et tidlig stadium, bruke dem i storescreening-program og generelt øke oversikten over potensiell smittestatus i en populasjon. Ett av de største programmene i den norske akvakulturnæringens historie er gitt i den nye PD-forskriften, hvor alle aktive sjølokalteter hvor PD ikke allerede er påvist, skal prøvetas månedlig for bl.a. å hindre videre utbredelse av de enkelte subtypene. Tanken er god, men hvor enkelt er det å tolke resultatene som framkommer gjennom slike uttak? I denne artikkelen ønsker vi derfor å belyse noen begreper knyttet til diagnostiske tester, begreper som vi anser er viktige for bedre å forstå resultatene og den usikkerheten

som kan være knyttet til dem både på enkeltfisknivå og populasjonsnivå.

PCR-analyser

Tilliten til at en PCR-analyse gir et sant bilde av en infeksjonsstatus er relativ stor. Negative PCR-resultater tas som indikasjon på at en populasjon er fri for aktuelt agens, og at en med «god samvittighet» bl.a. kan flytte levende fisk. Store screeningsprogram basert på PCR-analyser alene, gjennomføres for å framskaffe beslutningskunnskap om smitteforhold i en populasjon.

En PCR-analyse er en laboratoriemetode som er styrt inn mot å detektere genmateriale fra det bestemte smittestoffet en leter etter i et gitt prøvemateriale.

Påvisning av genmateriale tilsier at smittestoffet er til stede, men forteller oss ikke om smittestoffet disse genene

stammer fra, er dødt eller levende og kan smitte andre. Resultatet av en PCR-analyse oppgis ofte som en Ct-verdi, som gir en indikasjon på mengde smittestoff det er i prøven. Høye Ct-verdier indikerer lite smittestoff, mens lave Ct-verdier tyder på større mengder smittestoff. Ct-verdier over et visst nivå, indikerer at prøven er negativ (ikke påvist smittestoff). Ct-verdiene vil variere med hvordan PCR-metoden er satt opp på det enkelte laboratorium, noe som bidrar til at konkrete Ct-verdier fra ulike laboratorier, ikke kan sammenlignes fullt ut. De gir i stedet en indikasjon på om det er «mye» eller «lite» smittestoff i prøven.

Hovedfunksjonen med de PCR-analyser som gjøres per i dag er i all hovedsak knyttet til påvisning av smittetoff. For virus som har arvestoff i form av DNA, som for eksempel Salmon gill poxvirus (SGPV), er det også mulig å beregne antall viruspartikler i en prøve. For RNA-virus som Salmonid alphavirus (SAV), kan man utføre semikvantitative analyser for å gi et mer nøyaktig og sammenlignbart mål for virusmengder. Kvantitative analyser er mer arbeids- og kostnadskrevede

og utføres ikke i rutinediagnostikk og screening for fiskevirus i Norge.

Siden vanlig diagnostiske PCR-analyser ikke utføres kvantitativt, og det er variasjoner i en rekke parametre som påvirker Ct-verdiene på de enkelte laboratorier, gir dette begrensninger i hva en Ct-verdi forteller oss og dermed også hva den kan brukes til utover å fortelle oss hvorvidt et spesifikt virus kan påvises i prøven.

Sensitivitet og spesifisitet

En laboratoriemetode som alltid finner det den er satt opp til å påvise i et positivt prøvemateriale, sier vi har en følsomhet eller sensitivitet (Se) som er lik 1 eller 100 %. Alle prøvene med det smittestoffet testen er rettet mot, vil bli funnet som positive. Se uttrykker sannsynligheten for at testen vil påvise smittestoffet. Sannsynlighet oppgis ofte som prosent og kan uttrykkes fra 0-1 eller 0-100%. PCR har evne til å detektere svært lave forekomster av genetisk materiale, og kan

lett oppfattes å ha en Se som er tilnærmet 1.

Evnen en test har til å gi et sikkert negativt svar når prøvematerialet faktisk ikke inneholder det smittestoffet testen er rettet mot, kalles spesifisitet (Sp). Dersom testen alltid gir et sant svar («ikke påvist», er negativ) når prøven ikke inneholder aktuelt smittestoff, sier vi at $Sp = 1$ (eller 100%).

En metode med $Se = Sp = 1$ sier vi er perfekt. PCR-metoden kan i seg selv generere reaksjoner som gjør vanskelig å avgjøre om det faktisk er små mengder genmateriale i prøven (høy Ct-verdi) eller ikke. Derfor er det ofte lagt en øvre grense for Ct-verdien som tolkes slik at over denne verdien er resultatet å anse som negativt. Dette betyr at i grenseområdet kan en feil-lese et resultat som positivt eller en kan feiltolke en prøve som negativ når den faktisk kan inneholde svært små mengder genetisk materiale fra smittestoffet. PCR-metoden er altså ikke «perfekt».

Diagnostisk sensitivitet og spesifisitet

Det er stor og berettiget diskusjon om hvilke organ som skal prøvetas ved ulike undersøkelser; f.eks. nyre og evt. for- eller midtnyre, eller hjertespiess og hjertevegg. På større fisk er hjerte et stort organ i forhold til prøven som tas ut, og det er ulik grad av celletyper som blir med i en prøve. Videre er sammenslåing av prøver aktuelt, og en kan stille spørsmål ved om evnen til å påvise et mulig smittestoff endres hvis flere organbiter slås sammen til én prøve (samleprøve/pooling) ved analysing, - er det forskjell om flere organbiter fra samme organtype slås sammen enn om organbiter fra ulike organ blir slått sammen. Andre spørsmål kan være knyttet til hvor i infeksjonsfasen fisken er, er det syk eller frisk fisk vi undersøker, kan fisken være i en ikke-aktiv «bærefase», alder på fisken eller andre fysiologiske tilstander som kan virke inn på samspillet mellom individ og smittestoff.

Dette indikerer en kompleksitet som ikke nødvendigvis er like stor i praksis som i teori. Men før en metode tas i bruk, bør den vurderes i forhold til et referansemateriale med kjent status. Referanseprøvene skal fange opp de spørsmålene som stilles, og derfor være fra ulike organ, tidspunkt i infeksjonsfasen, syk versus frisk fisk, ulike aldersgrupper og eventuell effekt av at flere prøver blir slått sammen til én prøve i analysen (samleprøve).

Diagnostisk Se blir da andelen av kjente positive referanseprøver som tester positivt i den metoden en ønsker å benytte. Tilsvarende er diagnostisk Sp andelen av kjente negative referanseprøver som tester negativt. En vil ved en slik validering få nyttig informasjon om ulike metoders egenskaper under ulike forhold, noe som styre valget av metode i ulike situasjoner.

Prevalens

Prevalens kan oppfattes som forekomst (andel, prosent) av syke eller infiserte fisk som finnes i en populasjon på det tidspunktet prøveuttaket ble gjort. Siden en ikke kan undersøke hele populasjonen, estimerer man en prevalens ut fra det prøveantallet som blir analysert. For

at et uttak av fisk skal kunne benyttes for å uttrykke prevalens, må fisken som undersøkes være representativ for den aktuelle populasjonen. Velger vi ut bare stor, tilsynelatende frisk fisk til undersøkelse, vil prevalens si noe om denne subpopulasjonen, og ikke noe om en samlet populasjon som evt. er mer heterogent sammensatt med ulike størrelser, svimere, skrapfisk osv. En bør generelt være litt forsiktig med å oppgi prevalens for en populasjon da prøveuttaket ikke nødvendigvis gir grunnlag for å estimere en slik verdi. Estimert for prevalens vil videre ha en usikkerhet som kan være betydelig dersom antall prøver som blir benyttet til å estimere prevalens, er for lavt.

Vi kan videre dele prevalens i to begreper; sann og tilsynelatende prevalens. Den tilsynelatende prevalens er basert på det faktiske resultatet vi får ut av laboratorietesten som er brukt, og er det en vanligvis omtaler som prevalens i dagligtale. Siden en metode sjelden har Se og Sp på 100% (er «perfekte») vil det være noen fisk som blir diagnostisert feil (falske positive og falske negative). For å finne en sann prevalens (Ps) må vi derfor korrigere den tilsynelatende prevalens (Pt) i forhold til testens Se og Sp. Dette skjer ved beregning etter formelen $P_s = (P_t + (S_p - 1)) / (S_e + S_p - 1)$. Dess «dårligere» en test er mhp. Se og Sp, dess større blir avviket mellom tilsynelatende og sann prevalens.

Prediktiv verdi

Spesielt i forhold til større prøveserier er det viktig å reflektere over begrepet prediktiv verdi.

En positiv prediktiv verdi (PPV) er sannsynligheten for at en fisk faktisk er smittet når resultatet fra laboratoriet sier at smittestoffet er påvist. Negativ prediktiv verdi (NPV) blir da tilsvarende at fisken faktisk ikke er smittet når laboratorieresultatet er at smittestoff ikke er påvist.

Til forskjell fra Se og Sp, er beregning av prediktiv verdi ikke bare knyttet til selve egenskapene ved metoden, men er sterkt avhengig av forekomsten av smittestoffet i den populasjonen som blir undersøkt.

Dvs. hvilken forventning har vi til at fisken fra en gitt populasjon vil være positiv eller negativ.

Sammenhengen mellom prediktiv verdi og prevalens er gitt i **Figur 1**. Ved lav prevalens er NPV høy, noe som sier at et negativt prøvesvar fra laboratoriet med høy sannsynlighet er riktig. Hvis det er mange infiserte fisk i populasjonen vil et positivt laboratoreresvar med stor sannsynlighet være riktig.

Figuren viser videre betydningen av å velge tester med Sp og Se som er tilpasset den forventede forekomsten av positive/negative individer i populasjonen – dvs. tilpasset den antatte prevalens i populasjonen.

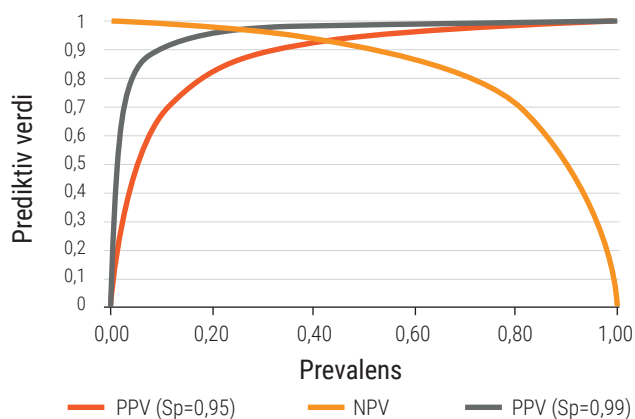
Screening – program som settes opp i tilfeller hvor en forventer at det er lav forekomst (lav prevalens) av et aktuelt smittestoff bør derfor bli analysert med en metode som har høy Sp, slik at de fiskene som blir testet positive har høy sannsynlighet for faktisk å være positive. Dermed slipper en å få et stort antall falske positive grupper som krever tiltak på feil grunnlag. **Figur 1** viser at ved en prevalens på ca 10% vil sannsynligheten for at en fisk som er testet positiv og faktisk er infisert, være > 90% når den benyttede testen har en $S_p = 0,99$. Dersom testen har en $S_p = 0,95$, vil sannsynligheten for at fisken faktisk er positiv bare være ca 65% ved samme prevalens.

Prediktive verdier kan beregnes etter følgende formler:

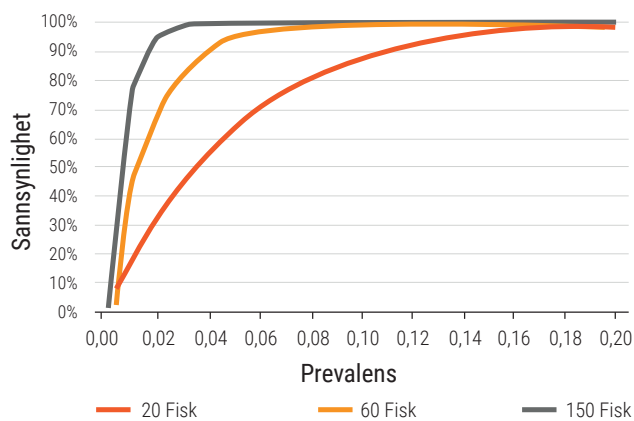
$$\begin{aligned} \text{Positiv prediktiv verdi} &= \frac{S_e \cdot \text{prevalens}}{S_e \cdot \text{prevalens} + (1 - S_p) \cdot (1 - \text{prevalens})} \\ \text{Negativ prediktiv verdi} &= \frac{S_p \cdot (1 - \text{prevalens})}{(1 - S_e) \cdot \text{prevalens} + S_p \cdot (1 - \text{prevalens})} \end{aligned}$$

Antall fisk som blir undersøkt (utvalgsstørrelse)

Antall fisk en undersøker fra en gitt populasjon er avgjørende for å kunne si noe sikkert om populasjonen er smittet. I **Figur 2** ser vi at dersom vi undersøker 20 fisk med en perfekt test, må vi ha en prevalens på minst 10% (eller 0,1) for at vi i denne undersøkelsen med 90% sannsynlighet skal kunne finne én fisk



Figur 1. Sammenheng mellom prevalens og positiv prediktiv verdi (PPV) og negativ prediktiv verdi (NPV). Med økende prevalens vil sannsynligheten øke mot 1 (100%) for at et positivt prøveresultat faktisk er sant (økende PPV). Høy Sp er nødvendig for å sikre høy sannsynlighet for at et positivt prøveresultat fra en fiskegruppe med lav prevalens faktisk er sant, at prøven er fra en infisert fisk. $Se=0,90$ i begge tilfellene.



Figur 2. Sammenheng mellom antall prøver til laboratorieanalyse og sannsynlighet for å påvise minst en smittet fisk ved ulike prevalens når testen som benyttes er perfekt ($Se=Sp = 1$).

som har smittestoffet. Dvs. det er 10% sannsynlighet for at alle fiskene vil være negative til tross for en prevalens på 10%. Er prevalens lav (for eksempel 3-4%) som vil være tilfelle i en tidlig infeksjonsfase, vil sannsynligheten for å finne minst en positiv fisk bare være 50-60%. Et utvalg på 150 fisk vil derimot med 99 % sikkerhet inneholde minst én smittet fisk ved en prevalens på 3-4% i denne beregningen.

For å kompensere for denne lave sannsynligheten ved små utvalg, er det vanlig å ta ut f. eks. svimere som vi antar har høyere sannsynlighet for å være smittet. Ved å gjøre dette sier vi altså at undergruppen «svimere» har høyere prevalens enn fiskegruppa som helhet, og derved øker vi sannsynligheten for å finne minst en positiv fisk i det utvalget av fisk som blir analysert. Dette kan kalles et målrettet uttak (risikobasert uttak) som har til hensikt å detektere infiserte fisk for å si om gruppa som helhet er infisert eller ikke, og resultatet kan ikke benyttes til å si noe om prevalens i gruppa som helhet.

Frihet for smitte

For å kunne si sikkert at en fiskegruppe er fri for et spesielt smittestoff, må en analysere all fisk i fiskegruppen med et perfekt testopplegg og få et negativt resultat på

samtlig fisk. Et slikt opplegg krever at laboratorietesten har 100 % sensitivitet og spesifisitet og organprøvene som blir analysert må med 100 % sikkerhet inneholde det aktuelle smittestoffet dersom det er til stede i populasjonen. Det sier seg selv at dette kan være vanskelig å oppfylle.

Frihet for et spesielt smittestoff blir derfor av praktiske grunner knyttet til en sannsynlighet for at smittestoffet ikke er til stede. Fra det som er sagt tidligere, vil dette være avhengig av egenskaper ved laboratorietesten (Se og Sp), antatt antall infiserte fisk i gruppa dersom smittestoffet skulle være til stede, antall fisk som blir analysert og totalt antall fisk i den aktuelle gruppa.

For å uttrykke frihet må en altså ha en rimelig god kunnskap om populasjonen, om smittestoffet som gruppa er «fri» for, egenskaper ved testen som er benyttet og ikke minst, smittepåvirkning fra omgivelsene. Beslutninger basert på betingelsen av «frihet», innebærer derfor alltid en viss risiko, og er grunnlaget for utsagnet om at det ikke finnes «null» risiko. Sannsynligheten for «frihet» økes gjennom gjentatte uttak med negative analyseresultat og fravær av introduksjon (smittepåvirkning) fra omgivelsene •