

Evaluering af substratkontrol på de akkrediterede miljølaboratorier

Vibeke From Jeppesen
Eurofins Danmark A/S

Inger Guldbæk
Eurofins Danmark A/S

Linda Bagge
Miljøstyrelsen

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Indhold

FORORD	5
SAMMENFATNING OG KONKLUSIONER	7
SUMMARY AND CONCLUSIONS	9
1 INDLEDNING	10
2 RESULTATER	11
2.1 FORTYNDINGSVÆSKER	11
2.1.1 Saltvandspeptonopløsning:	11
2.1.2 Phosphatbuffer pH 7,0:	11
2.1.3 Phosphatbuffer pH 7,2:	12
2.2 FLYDENDE SUBSTRATER – NON-SELEKTIVE BOUILLONER	13
2.2.1 Peptonholdig phosphatbuffer:	13
2.3 FLYDENDE SUBSTRATER – SELEKTIVE/INDIKATIVE BOUILLONER	13
2.3.1 Alkalisk peptonvand med polymixin B/colistin:	13
2.3.2 Rappaport-Vassiliadis bouillon (R10)	14
2.3.3 MacConkey enkelt og dobbeltstyrke:	15
2.3.4 Tryptonvand:	16
2.3.5 Laktose trypton lauryl sulfat bouillon:	17
2.4 FASTE SUBSTRATER – NON-SELEKTIVE	18
2.4.1 Trypton gærekstraktagar:	18
2.4.2 Blodagar:	19
2.5 FASTE SUBSTRATER – SELEKTIVE/INDIKATIVE	20
2.5.1 Membran laurylsulfat agar:	20
2.5.2 Slanetz og Bartley agar:	21
2.5.3 Galde esculin agar:	22
2.5.4 Cellobiose colistin agar:	23
2.5.5 Bufferet charcoal gærekstrakt agar med selektiv supplement (GVPC):	23
2.5.6 Bufferet charcoal gærekstrakt agar (BCYE):	24
2.5.7 Brilliantgrønt-laktose-saccharose-phenolrødt agar (BS agar):	24
2.5.8 Phenolrødt-mannitol agar:	25
2.5.9 Cetrimid nalidixinsyre-agar (CN agar):	25
2.5.10 Jernsulfid agar:	26
2.5.11 R2A agar:	27
3 DISKUSSION	29
3.1 FORTYNDINGSVÆSKER	30
3.2 FLYDENDE SUBSTRATER - NON-SELEKTIVE BOUILLONER	30
3.3 FLYDENDE SUBSTRATER - SELEKTIVE/INDIKATIVE BOUILLONER	31
3.4 FASTE SUBSTRATER - NON-SELEKTIVE FASTE SUBSTRATER	31
3.5 FASTE SUBSTRATER - SELEKTIVE OG/ELLER INDIKATIVE FASTE SUBSTRATER	32
3.6 KONTROLSTAMMER	32
3.7 HYPPIGHED AF SUBSTRATKONTROL	34
4 ANBEFALINGER	35
4.1 FORTYNDINGSVÆSKER	35

4.2	FLYDENDE SUBSTRATER – NON-SELEKTIVE	35
4.3	FLYDENDE SUBSTRATER – SELEKTIVE OG/ELLER INDIKATIVE	35
4.4	FASTE SUBSTRATER – NON-SELEKTIVE FASTE SUBSTRATER	35
4.5	FASTE SUBSTRATER – SELEKTIVE OG/ELLER INDIKATIVE FASTE SUBSTRATER	35
5	LITTERATUR	37

Forord

Miljøstyrelsen besluttede i december 2002 at indsamle og evaluere oplysninger om de akkrediterede miljølaboratoriers udførelse af substratkontrol. Baggrunden var dels et par sager med uoverensstemmende resultater på grund af problemer med substraterne, dels den forestående revision af Miljøstyrelsens bekendtgørelse om kvalitetskrav til miljømålinger udført af akkrediterede laboratorier, certificerede personer mv. (nr. 637 af 30. juni 1997).

Formålet var at fastsætte minimumskrav for udførelse af substratkontrol for at sikre en vis ensartethed mellem laboratorierne.

Spørgeskemaer blev udsendt til laboratorierne, og de indkomne svar er evalueret i denne rapport. Rapporten er opbygget med en systematisk gennemgang af substratgrupper og de enkelte substrater. De ni laboratorier, der har besvaret spørgeskemaet, er anonymiserede i opgørelsen.

Projektet er udarbejdet af Miljøstyrelsens mikrobiologiske referencelaboratorium.

Vibeke From Jeppesen, Eurofins Danmark
Inger Guldbæk, Eurofins Danmark.

Sammenfatning og konklusioner

Formålet med projektet har været at fastsætte minimumskrav for udførelse af substratkontrol for at sikre en vis ensartethed mellem de mikrobiologiske miljølaboratorier.

Spørgeskemaer blev udsendt til laboratorierne og de indkomne svar danner basis for evaluering af niveauet og omfanget af substratkontrol. I alt ni laboratorier har deltaget i undersøgelsen, svarene er anonymiserede i denne rapport. Rapporten er opbygget med en systematisk gennemgang af substratgrupper og de enkelte substrater og afsluttes med anbefalinger om hyppighed og type af substratkontrol.

Det anbefales at kontrollere substrater batch vis når laboratoriet selv afvejer ingredienserne og for så vidt angår færdigfremstillede tørsubstrater anbefales kontrolfrekvensen at være per leverandørbatch.

Kontrol af fortyndingsvæsker anbefales at omfatte sammensætning, volumen og sterilitet. Non-selektive substrater anbefales desuden kontrolleret ved kvalitative evt. semikvantitative metoder, mens selektive substrater bør kontrolleres ved kvantitative metoder.

Ved kontrol efter kvalitative og kvantitative metoder anbefales brug af relevante positive og negative kontrolstammer i relevante niveauer.

Summary and conclusions

The aim of this project was to set minimum demands for quality control of microbiological media in order to secure uniformity between the laboratories.

Questionnaires were sent to the laboratories and the answers were evaluated with respect to extent and level of quality control of media. Nine laboratories participated in the study. This report systematically evaluates both types of media as well as the specific medias and recommendations are given concerning frequency and type of quality control method.

It is recommended to control media batch wise when the laboratory it self prepare the media from basic ingredients. If commercial manufactured media are used it is recommended to control each supplied batch of media.

Quality control of dilution fluids is recommended to include composition, volume, pH, and sterility. Non-selective media are also recommended checked by qualitative or semi-quantitative methods, while selective media should be checked by quantitative methods.

When checking by qualitative and quantitative methods it is recommended to use relevant positive and negative test strains in appropriate concentrations.

1 Indledning

Forudsætningen for tilfredsstillende kvalitet af mikrobiologiske analyser er, at der anvendes korrekte og ensartede dyrkningsmedier, som giver reproducerbare resultater. Kvalitetssikring af substratproduktionen er derfor særdeles vigtig. Nationalt og internationalt arbejde med standardisering af metoder med det formål at frembringe sammenlignelige og reproducerbare resultater giver ikke meget mening, såfremt analysegrundlaget ikke er pålideligt og reproducerbart. Kvaliteten af substraterne kan også bidrage til usikkerhedsbudgetterne, og kvalitetssikring af substrater er et krav i analyselaboratoriernes akkrediteringsgrundlag: DS EN 17025, punkt 5.4: ”Laboratoriet skal have instruktioner for anvendelse og betjening af alt relevant udstyr og for håndtering og forberedelse af emner til prøvning og/eller kalibrering eller til begge dele, hvor mangel på sådanne instruktioner vil kunne forringe resultaterne af prøvninger og/eller kalibreringer.”

2 Resultater

2.1 Fortyndingsvæsker

2.1.1 Saltvandspeptonopløsning:

Der er i alt 9 besvarelser, hvoraf det fremgår at 1 laboratorium foretager ”opformering”, 7 laboratorier foretager volumenkontrol og 3 laboratorier foretager kontrol af pH. Kontrollfrekvensen varierer fra hvert leverandørbatch til hvert fremstillet batch, daglig eller månedlig. 2 ud af 9 laboratorier oplyser, at de medtager negativ kontrol ved hver analyse.

Tabel 1 Saltvandspeptonopløsning, DS 6222 Bestemmelse af aerobt kimtal 22°C og 37°C.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Positive	Negative	Hyppighed	Positive	Negative
1	Opformering, fortynding ± 1 til $\div 12$	-	E. coli ukendt mængde	-	Hvert nyt leverandør batch	-	Ved hver produktion kontrol på BA
2							
3	Volumenkontrol			Inkubation med upodet rør	Hvert nyt fremstillet batch		1 ml udsås i agar.
4	pH + volumenkontrol				pH ved fremstilling. Volumen 1 gang årlig		
5	pH + volumenkontrol			Ja	Hvert nyt fremstillet batch		Ja
6	pH + volumenkontrol				Hvert nyt fremstillet batch		
7	Volumenkontrol						
8	Volumenkontrol				1 / måned		
9	Volumenkontrol + sterilkontrol	WPCA			Daglig		

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".
Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.1.2 Phosphatbuffer pH 7,0:

Der er i alt 7 besvarelser. 3 laboratorier foretager kontrol af volumen før ibrugtagning af mediet. Kontrollfrekvensen er enten per leverandør batch, per fremstillet batch eller månedlig. Sterilkontrol udføres som negativ kontrol/blindprøve af 3 laboratorier ved hver analyse.

Tabel 2 Phosphatbuffer pH 7,0 DS 268 Bestemmelse af *Pseudomonas aeruginosa*.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
1	Opformering, fortynding ÷1 til ÷12	-	Ps. aeruginosa	-	Hvert nyt leverandør batch	-	Ved hver produktion kontrol på BA
2							
3							
4	Volumenkontrol						+
5	Ref. ampul			Ja	Hvert nyt fremstillet batch		Ja
6	Sterilkontrol						Steril-kontrol
7	Volumenkontrol						
8	Volumenkontrol+sterilkontrol				1 /måned		
9	Sterilkontrol	CN agar	Ps. aeruginosa		Hver analysedag	Ps. aeruginosa	

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

"+": laboratoriet har sat et plus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "ja".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.1.3 Phosphatbuffer pH 7,2:

I alt 6 besvarelser, hvoraf det fremgår at 3 laboratorier foretager kontrol af volumen før ibrugtagning af substratet. Kontrolfrekvensen er enten per leverandørbatch, per fremstillet batch eller periodisk. Sterilkontrol udføres af 1 laboratorium som negativ kontrol ved hver analyse.

Tabel 3 Phosphatbuffer pH 7,2 DS 2256 Bestemmelse af *Clostridium perfringens* og DS 266 Bestemmelse af *Salmonella*.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
1	Opformering, fortynding ÷1- ÷12	-	Cl. perfringens	-	Hvert nyt leverandør batch	Cl. perfringens ukendt mængde.	Ved hver produktion kontrol på BA
2							
3							
4	Volumenkontrol				1/år		
5	Ref. ampul			Ja	Hvert nyt fremstillet batch	S. adabraka + Cl. perfringens	Ja
6	-	-	-	-	-	-	-
7	Volumenkontrol						
8	Volumenkontrol+sterilkontrol + ref. ampul				1 /måned		
9	Sterilkontrol + ref. ampul		Cl. perfringens		Per fremstillet/indkøbt batch	Cl. perfringens	

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".
Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.2 Flydende substrater – non-selektive bouillon

2.2.1 Peptonholdig fosfatbuffer:

I alt 3 besvarelser. De 3 laboratorier foretager alle kontrol af substratets funktion før ibrugtagning af substratet. Kontrolfrekvensen er enten per leverandør batch eller per fremstillet batch. Positiv kontrol medtages ved hver analyse af alle laboratorierne, og 2 laboratorier medtager desuden negativ kontrol ved hver analyse.

Tabel 4 Peptonholdig fosfatbuffer, DS 266 Bestemmelse af Salmonella.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
1							
2							
3							
4						Salmonella	Upodet substrat
5	Fortynding ved ekstension	TSB/TS A	Ja	Ja	Hvert nyt fremstillet batch	S. adabraka	Ja
6	Ukendt podemængde, påvist/ikke påvist	-	S. adabraka	E. coli		S. adabraka ukendt podemængde	
7							
8	+/- Vækst på BLSF og XLD		S. adabraka		Start og slut af hvert nyt leverandør batch	S. adabraka	E. coli ukendt podemængde
9							

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

"+": laboratoriet har sat et plus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "ja".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.3 Flydende substrater – selektive/indikative bouillon

2.3.1 Alkalisk peptonvand med polymixin B/colistin:

I alt 4 besvarelser. 3 laboratorier foretager kontrol af substratets funktion før ibrugtagning af substratet. Kontrolfrekvensen er enten per leverandør batch eller per fremstillet batch. Positiv kontrol medtages ved hver analyse af 3 af laboratorierne, og 1 laboratorium medtager desuden negativ kontrol ved hver analyse.

Tabel 5 Alkalisk peptonvand med polymixin B/colistin, DS 3030 Bestemmelse af Vibrio vulnificus.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Positive	Negative	Hyppighed	Positive	Negative
1							

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Positive	Negative	Hyppighed	Positive	Negative
2							
3							
4							
5			Ja	Ja	Hvert nyt fremstillet batch	Vibrio vulnificus	Ja
6*	Ukendt podemængde, påvist/ikke påvist					Vibrio vulnificus ukendt podemængde	
7	Positiv kontrol		Vibrio vulnificus	E. coli	Start og slut af hvert nyt leverandør batch	Vibrio vulnificus	
8							
9*	Sterilkontrol	Alkalisk peptonv and cellulose col.			Hvert nyt fremstillet batch		

*) analysen udføres ikke akkrediteret

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

"+": laboratoriet har sat et plus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "ja".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.3.2 Rapport-Vassiliadis bouillon (R10)

I alt 3 besvarelser. Alle 3 laboratorier foretager kontrol af substratets funktion før ibrugtagning af substratet. Kontrolfrekvensen er enten per leverandør batch eller per fremstillet batch. Positiv kontrol medtages ved hver analyse af alle 3 laboratorier, og 2 laboratorier medtager også negativ kontrol ved hver analyse.

Tabel 6 Rapport-Vassiliadis bouillon (R10), DS 266 Bestemmelse af Salmonella.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
1							
2							
3							
4							
5	Fortynding ved ekstension	TSB	+	+	Hvert nyt fremstillet batch	S. adabraka	+
6	Ukendt podemængde, påvist/ikke påvist		S. adabraka	E. coli	Hvert nyt leverandør batch	S. adabraka ukendt podemængde	E. coli ukendt podemængde
7							
8	+/- Vækst		S. adabraka	E. coli	Start og slut af hvert nyt leverandør batch	S. adabraka	
9							

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

"+": laboratoriet har sat et plus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "ja".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.3.3 MacConkey enkelt og dobbeltstyrke:

I alt 9 besvarelser. 8 laboratorier foretager funktionskontrol af substratet før ibrugtagning af substratet. Kontrolfrekvensen er enten per leverandør batch eller per fremstillet batch. 4 laboratorier medtager positiv kontrol ved hver analyse og 4 laboratorier medtager desuden negativ kontrol/blindprøve ved hver analyse.

Tabel 7 MacConkey bouillon, enkelt og dobbeltstyrke, DS 2255 Bestemmelse af coliforme bakterier og termotolerante coliforme bakterier.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. Substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
1	Opformering, fortynding $\div 1-12$	-	E. coli	-	Hvert nyt leverandør batch	-	Upodet MacConkey rør
2	Ampuller				Hvert nyt fremstillet batch		Blindprøve
3	pH, sterilkontrol	-	-	-	-	E. coli, ukendt mængde	50ml steril vand til 50 ml MacConkey
4	NMKL procedure nr. 10 pkt. 4.7.2	Gammelt substrat batch	E. coli ukendt podemængde		Hvert nyt leverandør batch	E. coli, ukendt mængde	Upodet substrat + S. aureus ukendt mængde
5	Ref. ampul		Ja	Ja	Hvert nyt fremstillet batch	E. coli	Ja
6	Ukendt podemængde påvist/ikke påvist	-	E. coli	S. aureus, Ps. aeruginosa	Hvert nyt leverandør batch		
7	+/- typisk vækst	TSB	E. coli		Start og slut af hvert nyt leverandør batch		
8	+/- typisk vækst	TSB	E. coli	A. hydrophila	Start og slut af hvert nyt leverandør batch		
9	Sterilkontrol, vækstkontrol	MacConkey	E. coli		Hver dag	E. coli ukendt mængde	

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

"+": laboratoriet har sat et plus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "ja".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.3.4 Tryptonvand:

I alt 7 besvarelser. 4 laboratorier udfører funktionskontrol af substratet forud for analyse enten per leverandørbatch eller per fremstillet batch. 5 laboratorier medtager positiv kontrol ved hver analyse og 4 medtager også negativ kontrol/blindprøve ved hver analyse.

Tabel 8 Tryptonvand, DS 2255 Bestemmelse af coliforme bakterier og termotolerante coliforme bakterier.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Positive	Negative	Hyppighed	Positive	Negative
1	Opformering, fortynding $\div 1-12$	-	E. coli	-	Hvert nyt leverandør batch	-	Upodet substrat
2							
3	pH, sterilkontrol				Hvert nyt fremstillet batch	E. coli, ukendt mængde	50 ml steril vand tilsættes

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Positive	Negative	Hyppighed	Positive	Negative
							til 50ml McConkey
4						E. coli, ukendt mængde	Upodet substrat + S. aureus ukendt mængde
5			+	+	Hvert nyt fremstillet batch	E. coli	+
6							
7	+/- Typisk vækst, +/- indol					E. coli	
8	+/- Typisk vækst, +/- indol		E. coli		Start og slut af hvert nyt leverandør batch		
9	Sterilkontrol, vækstkontrol	Tryptonvand	E. coli		Hver dag	E. coli ukendt mængde	

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

"+": laboratoriet har sat et plus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "ja".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.3.5 Laktose trypton lauryl sulfat bouillon:

I alt 6 besvarelser. Alle udfører funktionskontrol af substratet før ibrugtagning af substratet enten per fremstillet batch eller per leverandørbatch. 4 laboratorier medtager positiv kontrol ved hver analyse og 2 medtager desuden negativ kontrol/blindprøve ved hver analyse.

Tabel 9 Laktose trypton laurylsulfat bouillon, Mod ISO/DIS 9308-1
Bestemmelse af coliforme bakterier og E. coli.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
1	Opformering, fortynding $\pm 1-12$	-	E. coli	Ps. aeruginosa	Hvert nyt leverandør batch	E. coli ukendt mængde	Upodet substrat
2							
3							
4	Sterilkontrol				Hvert nyt fremstillet batch		
5			+	+	Hvert nyt fremstillet batch	E. coli	+
6	Ukendt podemængde påvist/ikke påvist	TSA	E. coli	S. aureus, E. faecalis	Hvert nyt leverandør batch	-	-
7	+/- Typisk vækst, +/- gas/indol					E. coli	
8	+/- Typisk vækst, +/- luft/indol		E. coli		Start og slut af hver nyt leverandør batch		

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
9	Sterilkontrol, vækstkontrol	Laktose trypton lauryl sulfat bouillon, tryptonvand	E. coli		Hver dag	E. coli ukendt mængde	

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

"+": laboratoriet har sat et plus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "ja".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.4 Faste substrater – non-selektive

2.4.1 Trypton gærekstraktagar:

I alt 9 besvarelser. Alle foretager funktionskontrol af substratet før ibrugtagning af substratet. 6 laboratorier udfører kvantitativ substratkontrol. Kontrolfrekvensen er enten per leverandørbatch, per fremstillet batch eller daglig. 6 laboratorier medtager negativ kontrol/blindprøve ved hver analyse.

Tabel 10 Trypton gærekstraktagar, DS 6622 Bestemmelse af aerobt kimal 22°C og 37°C.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. Substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
1	Økometrisk kontrol	-	S. aureus, ukendt mængde	-	Hvert nyt leverandør batch	-	Upodet plade
2	Ampul				Hvert nyt leverandør batch		Blindprøve
3	pH, sterilkontrol				Hvert nyt fremstillet batch		"Før" og "efter" kontrol på hver flaske
4	Mod. Miles-Misra, NMKL procedure nr. 10 pkt 4.7.1.4	Gammel substrat batch			Hvert nyt leverandør batch	E. coli	Upodet substrat
5	Ref. ampul		Ja	Ja	Hvert nyt fremstillet batch		Ja
6	Mod. Miles-Misra	TSA	E. coli	-	Hvert nyt leverandør batch		Steril kontrol
7	Miles-Misra	TSA	E. coli		Start og slut af hvert nyt leverandør batch		
8	Økometrisk kontrol		Ps. fluorescences		Start og slut af hvert nyt leverandør batch		
9*	Sterilkontrol, vækstkontrol	WPCA	Ps. aeruginosa, B. cereus		Hver dag	Ps. aeruginosa, B. cereus, ukendt mængde	

*) analysen udføres ikke akkrediteret

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

"+": laboratoriet har sat et plus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "ja".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.4.2 Blodagar:

I alt 8 besvarelser. Alle foretager funktionskontrol af substratet før ibrugtagning af substratet. Kontrolfrekvensen er enten per leverandør batch eller per fremstillet batch. 3 laboratorier medtager positiv kontrol ved hver analyse og 5 laboratorier medtager negativ kontrol/blindprøve ved hver analyse.

Tabel 11 Blodagar, DS 2217 Bestemmelse af kimtal 37°C (MF), DS 3029 Bestemmelse af Legionella.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Positive	Negative	Hyppighed	Positive	Negative
1	Økometrisk kontrol	-	S. aureus	-	Hver nyt leverandør batch	-	Steril kontrol (agar og upodet fortyndin gsvand)
2							
3	pH, sterilkontrol	-	-	-	Hvert nyt fremstillet batch	-	Steril kontrol (agar og 100 ml steril vand)
4	Sterilkontrol				Hvert nyt fremstillet batch	E. coli	Upodet substrat
5	Ref. ampul		Ja	Ja	Hvert nyt fremstillet batch		Ja
6	Mod. Miles-Misra	TSA	S. aureus		Hvert nyt leverandør batch		Steril kontrol
7	Miles-Misra	TSA	S. aureus, B. cereus	E. faecalis			
8	Økometrisk kontrol		B. subtilis, E. coli		Start og slut af hvert nyt leverandør batch	L. pneumophila	
9*	Sterilkontrol, vækstkontrol	Blodagar	B. cereus		Hver dag	B. cereus, L. pneumophila	

*) analysen udføres ikke akkrediteret

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

"+": laboratoriet har sat et plus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "ja".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.5 Faste substrater – selektive/indikative

2.5.1 Membran laurylsulfat agar:

I alt 8 besvarelser. Alle laboratorierne foretager funktionskontrol af substratet før ibrugtagning af substratet. Kontrolfrekvensen er enten per leverandørbatch eller per fremstillet batch. 5 laboratorier medtager positiv kontrol ved hver analyse og 4 medtager negativ kontrol/blindprøve ved hver analyse.

Tabel 12 Membran lauryl sulfat agar, Mod. ISO/DIS 9308-1 Bestemmelse af coliforme bakterier og E. coli.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
1	Økometrisk kontrol	-	E. coli	Ps. aeruginosa	Hver nyt leverandør batch	E. coli ukendt mængde	Upodet plade
2							
3	pH,	TSA	E. coli,		Hvert nyt	E. coli,	Steril

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
	sterilkontrol		min. 70% genfindning, podeniveau 10-100		leverandør batch	ukendt mængde	plade
4	NMKL procedure nr. 10 pkt. 4.7.1.4	Gammelt substrat batch	E. coli		Hvert nyt leverandør batch	E. coli	Substrat med upodet fortynding svand som er MF
5	Ref. ampul		Ja	Ja	Hvert nyt fremstillet batch		Ja
6	Mod. Miles-Misra	TSA	E. coli	B. subtilis			
7	+/- typisk vækst	TSA	E. coli		Start og slut af hvert nyt leverandør batch	E. coli	
8	Økometrisk kontrol		E. coli, L. freundii	L. plant.	Start og slut af hvert nyt leverandør batch		
9	Sterilkontrol, vækstkontrol	Membran Lauryl sulfat agar	E. coli		Hver dag	E. coli ukendt mængde	

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

"+": laboratoriet har sat et plus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "ja".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.5.2 Slanetz og Bartley agar:

I alt 8 besvarelser. Alle foretager funktionskontrol af substratet før ibrugtagning af substratet. 5 laboratorier foretager kvantitativ substratkontrol. Kontrolfrekvensen er enten per leverandør batch eller per fremstillet batch. 5 laboratorier medtager positiv kontrol ved hver analyse og 5 medtager negativ kontrol/blindprøve ved hver analyse.

Tabel 13 Slanetz og Bartley agar, Mod. ISO 7899-2 Bestemmelse af enterokokker (MF), DS 2401 Bestemmelse af enterokokker.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. Substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
1	Økometrisk kontrol	-	E. faecalis	-	Hvert nyt leverandør batch	E. faecium	Upodet plade
2							
3	pH, sterilkontrol	TSA (hvert nyt leverandør batch)	E. faecalis, min. 70% genfindning, podeniveau 10-100	-	Hvert nyt fremstillet batch	E. faecalis, ukendt mængde	100 ml steril vand filtreres
4	Mod. Miles-Misra NMKL procedure nr. 10 pkt. 4.7.1.4	Gammelt substrat batch	E. faecalis	E. coli	Hvert nyt leverandør batch	E. faecalis	Substrat med upodet fortynding svand (100 ml). Substrat podet med E. coli. ved

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. Substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
							overfladeudsæd: upodet plade.
5	Ref. ampul		Ja	Ja	Hvert nyt fremstillet batch	Enterococcus	Ja
6	Mod. Miles-Misra	TSA	E. faecalis, E. durans	E. coli	Hvert nyt leverandør batch	-	-
7	Miles-Misra	TSA	E. faecalis	E. coli	Start og slut af hvert nyt leverandør batch		
8	Økometrisk kontrol		E. faecalis	L. plant.	Start og slut af hvert nyt leverandør batch		
9*	Sterilkontrol	Slanetz og Bartley agar	Enterococcus		Hver dag	Enterococcus ukendt mængde	

*) analyse efter DS 2401 udføres ikke akkrediteret

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

"+": laboratoriet har sat et plus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "ja".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.5.3 Galde esculin agar:

I alt 8 besvarelser. 4 foretager kvantitativ substratkontrol og 3 foretager kvalitativ substratkontrol før ibrugtagning af substratet. Kontrolfrekvensen er enten per leverandørbatch eller per fremstillet batch. 5 laboratorier medtager positiv kontrol ved hver analyse og 4 medtager negativ kontrol/blindprøve ved hver analyse.

Tabel 14 Galde esculin agar, Mod. ISO 7899-2 Bestemmelse af enterokokker.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. Substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
1	Økometrisk kontrol	-	E. faecalis	-	Hvert nyt leverandør batch	E. faecalis	Upodet plade
2							
3	pH, sterilkontrol	TSA (hvert nyt leverandør batch)	E. faecalis, min. 70% genfinding, podeniveau 10-100	-	Hvert nyt fremstillet batch	E. faecalis, ukendt mængde	100 ml steril vand filtreres
4	Mod. Miles-Misra NMKL procedure nr. 10 pkt. 4.7.1.4	Gammelt substrat batch	E. faecalis	E. coli	Hvert nyt leverandør batch	E. faecalis	Upodet substrat
5	Ref. ampul		Ja	Ja	Hvert nyt fremstillet batch	Enterococcus	Ja
6	Ukendt podemængde påvist/ikke påvist		E. faecalis, E. durans	E. coli	Hvert nyt leverandør batch		
7	± typisk vækst	TSA	E. faecalis	E. coli	Start og slut af		

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. Substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
					hvert nyt leverandør batch		
8	Økometrisk kontrol		E. faecalis	L. plant.	Start og slut af hvert nyt leverandør batch		
9	Sterilkontrol	Galde esculin agar	Enterococcus		Hver dag	Enterococcus ukendt mængde	

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

"+": laboratoriet har sat et plus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "ja".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.5.4 Cellobiose colistin agar:

I alt 3 besvarelser. 2 laboratorier foretager kontrol af substratet før ibrugtagning af substratet. Kontrolfrekvensen er enten per leverandør batch eller per fremstillet batch. 1 laboratorium medtager såvel positiv som negativ kontrol ved hver analyse.

Tabel 15 Cellobiose colistin agar, DS 3030 Bestemmelse af *Vibrio vulnificus*.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
1							
2							
3							
4							
5			Ja	Ja	Hvert nyt fremstillet batch	<i>Vibrio vulnificus</i>	Ja
6							
7	Positiv kontrol		<i>Vibrio vulnificus</i>	E. coli	Start og slut af hvert nyt leverandør batch		
8							
9*	Sterilkontrol	Alkalisk peptonvand, cellobiose, colistin			Hver dag		

*) analysen udføres ikke akkrediteret

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

"+": laboratoriet har sat et plus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "ja".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.5.5 Bufferet charcoal gærekstrakt agar med selektiv supplement (GVPC):

I alt 3 besvarelser. 2 laboratorier foretager kontrol af substratet før ibrugtagning. Kontrolfrekvensen er per leverandør batch.

Tabel 16 GVPC, DS 3029 Bestemmelse af Legionella.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
1							
2							
3							
4							
5						L. pneumophila	Ja
6	Mod. Miles-Misra	Gammel batch	L. pneumophila	-	Hvert leverandør batch	L. pneumophila ukendt podemængde	-
7							
8	± Typisk vækst		L. pneumophila		Start og slut af hvert nyt leverandør batch	L. pneumophila	
9*	Sterilkontrol	BCYE	L. pneumophila		Hver dag	L. pneumophila	

*) analysen udføres ikke akkrediteret

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.5.6 Bufferet charcoal gærekstrakt agar (BCYE):

I alt 4 besvarelser. 2 laboratorier foretager kontrol af substratet før ibrugtagning af substratet. Kontrolfrekvensen er per leverandør batch eller daglig.

Tabel 17 BCYE, DS 3029 Bestemmelse af Legionella.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
1							
2							
3							
4							
5							Ja
6			L. pneumophila				
7							
8	± Typisk vækst		L. pneumophila		Start og slut af hvert nyt leverandør batch	L. pneumophila	
9	Sterilkontrol	BCYE	L. pneumophila		Hver dag	L. pneumophila	

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.5.7 Brilliantgrønt-laktose-saccharose-phenolrødt agar (BS agar):

I alt 2 besvarelser. Begge foretager funktionskontrol af substratet før ibrugtagning af substratet. Kontrolfrekvensen er enten per leverandør batch

eller per fremstillet batch. Begge laboratorier medtager positiv og negativ kontrol ved hver analyse.

Tabel 18 BS agar, DS 266 Bestemmelse af Salmonella.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
1							
2							
3							
4							
5	Økometrisk kontrol	TSB/TSBA	Ja	Ja	Hvert nyt fremstillet batch	S. adabraka	Ja
6	Ukendt podemængde påvist/ikke påvist		S. adabraka	E. coli	Hvert nyt leverandør batch	S. adabraka ukendt podemængde	E. coli ukendt podemængde
7							
8							
9							

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

"+": laboratoriet har sat et plus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "ja".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.5.8 Phenolrødt-mannitol agar:

I alt 3 besvarelser. Alle foretager funktionskontrol af substratet før ibrugtagning af substratet. Kontrolfrekvensen er enten per leverandør batch eller per fremstillet batch. 3 laboratorier medtager positiv og 2 medtager negativ kontrol ved hver analyse.

Tabel 19 Phenolrødt mannitol agar, DS 266 Bestemmelse af Salmonella.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
1							
2							
3							
4							
5	Økometrisk kontrol	TSA	Ja	Ja	Hvert nyt fremstillet batch	S. adabraka	Ja
6	Ukendt podemængde påvist/ikke påvist		S. adabraka	E. coli	Hvert nyt leverandør batch	S. adabraka ukendt podemængde	E. coli ukendt podemængde
7							
8	Økometri		S. adabraka	L. plant.	Start og slut af hver nyt leverandør batch	S. adabraka	
9							

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

"+": laboratoriet har sat et plus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "ja".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.5.9 Ceftrimid nalidixinsyre-agar (CN agar):

I alt 8 besvarelser. Alle foretager kontrol af substratet før ibrugtagning og 4 laboratorier foretager kvantitativ substratkontrol. Kontrolfrekvensen er enten

per leverandørbatch eller per fremstillet batch. 4 laboratorier medtager positiv og 4 medtager negativ kontrol/blindprøve ved hver analyse.

Tabel 20 CN agar, DS 268 Bestemmelse af *Pseudomonas aeruginosa*.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. Substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
1	Økometrisk kontrol	-	Ps. aeruginosa	-	Hvert nyt leverandør batch	-	Steril kontrol (agar og upodet fortyndingsvand)
2							
3	pH, sterilkontrol	TSA (hvert nyt leverandør batch)	Ps. aeruginosa, min. 70% genfindning, podeniveau 10-100	-	Hvert nyt fremstillet batch	Ps. aeruginosa, ukendt mængde	100 ml steril vand filtreres
4	Mod. Miles-Misra NMKL procedure nr. 10 pkt. 4.7.1.4	Gammel substrat batch	Ps. aeruginosa, ukendt podemængde	E. coli	Hvert nyt leverandør batch	Ps. aeruginosa	Upodet substrat
5	Ref. ampul		ja	ja	Hvert nyt fremstillet batch	Ps. aeruginosa	ja
6	Mod. Miles-Misra	TSA	Ps. aeruginosa	E. coli	Hvert nyt leverandør batch	-	-
7	+/- typisk vækst	TSA	Ps. aeruginosa	E. coli	Start og slut af hvert nyt leverandør batch		
8	Økometrisk kontrol		Ps. aeruginosa	E. coli	Start og slut af hvert nyt leverandør batch		
9	Steril kontrol	CN agar	Ps. aeruginosa		Hver dag	Ps. aeruginosa	

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

"+": laboratoriet har sat et plus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "ja".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.5.10 Jernsulfid agar:

I alt 7 besvarelser. 6 laboratorier foretager kontrol før ibrugtagning af substratet. Kontrolfrekvensen er enten per leverandør batch eller per fremstillet batch. 4 laboratorier medtager positiv og 3 negativ kontrol/blindprøve ved hver analyse.

Tabel 21 Jernsulfid agar, DS 2256 Bestemmelse af *Clostridium perfringens*.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.

1	Økometrisk kontrol	-	Cl. perfringens	-	Hvert nyt leverandør batch	Cl. perfringens, ukendt podemængde	Sterilkontrol (agar med upodet fortyndingsvand)
2							
3							
4						Cl. perfringens ukendt podemængde	Upodet substrat
5	Ref. ampul		+	+	Hvert nyt fremstillet batch		+
6	Mod. Miles-Misra	Gammelt batch	Cl. perfringens	E. coli	Hvert nyt leverandør batch	-	-
7	+/- Typisk vækst, ref. ampul				Start og slut af hvert nyt leverandør batch		
8	+/- Typisk vækst, ref. ampul		Cl. perfringens		Start og slut af hvert nyt leverandør batch	Cl. perfringens	
9	Steril kontrol	JSA	+		Hver dag	Cl. perfringens	

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

"+": laboratoriet har sat et plus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "ja".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

2.5.11 R2A agar:

I alt 6 besvarelser, hvoraf det fremgår, at alle foretager kontrol før ibrugtagning af substratet. Kontrolfrekvensen er enten per leverandør batch eller per fremstillet batch. 1 laboratorium medtager positiv og 2 laboratorier medtager negativ kontrol/blindprøve ved hver analyse.

Tabel 22 R2A agar, DS 2402 Bestemmelse kimtal 37°C, 44°C, 55°C, 65°C.

Lab. nr.	Substratkontrol forud for anvendelse					Ved hver analyse	
	Kontrolmetode	Ref. substrat	Pos.	Neg.	Hyppighed	Pos.	Neg.
1							
2							
3							
4	Mod. Miles-Misra NMKL procedure nr. 10 pkt. 4.7.1.4	Gammelt substrat batch			Hvert nyt leverandør batch		Upodet substrat
5	Ref. ampul		+	+	Hvert nyt fremstillet batch		+
6*	Mod. Miles-Misra	TSA	B. stearothermophilus		Hvert nyt leverandør batch		Sterilkontrol
7	Miles-Misra	TSA	E. coli				
8	Økometrisk		B. cereus E. coli		Start og slut af hvert nyt leverandør batch		
9	Steril kontrol	R2A	B. cereus		Hver dag	B. cereus	

*) analysen udføres ikke akkrediteret

"-": laboratoriet har sat et minus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "nej".

"+": laboratoriet har sat et plus i feltet i spørgeskemaet, dette tolkes som et "ja".

Tom felt: laboratoriet har ikke besvaret spørgsmålet.

3 Diskussion

Det er vigtigt at mikrobiologiske dyrkningsmedier, herunder fortyndingsvæsker, er underkastet en kvalitetskontrol før de tages i anvendelse, idet nøjagtigheden af analyseresultater i høj grad afhænger af de anvendte medier.

Der er mange måder at kontrollere substrater på. Det kan f.eks. være fysisk kontrol (dvs. farve, gelstyrke, homogenitet, overflade og lignende), pH-kontrol, sterilkontrol, volumenkontrol samt kontrol af om de ønskede mikroorganismer kan vokse i tilstrækkelig antal på det pågældende medium og for de selektive medier også om vækst af de ikke-ønskede mikroorganismer hæmmes i tilstrækkeligt omfang. Såfremt substratet er indikativ, bør det også undersøges om de korrekte typiske reaktioner opnås med målorganismerne.

Det fremgår af resultatet fra spørgeskemaerne, at alle de deltagende laboratorier, på nær et enkelt laboratorium, udfører kontrol af substrater. Funktionskontrolmetoderne varierer fra kvalitative til kvantitative eller semi-kvantitative metoder afhængig af laboratorium og/eller substrattype.

Sterilitet kan eftervises ved dokumentation af autoklaveringen; tid, temperatur og fyldningsgrad af autoklave. Dette forudsætter, at den anvendte kombination af parametrene tid, temperatur og fyldningsgrad en gang for alle er dokumenteret at resultere i sterile substrater. Sterilkontrol i form af mikrobiologiske analyser er egnede som verifikation af autoklaving, men er ikke brugbar som produktionsstyring.

Udover de nævnte funktionskontroller af de fremstillede substrater bør der foretages kontrol af pH og sterilitet af hvert batch. Sterilitetskontrollen kan som ovenfor nævnt bestå af kontrol af tid og temperatur for hvert batch. Faktuelle tid-temperatur forhold for varmebehandlingen af hver batch bør være dokumenterede.

I mange tilfælde medtages negativ kontrol ved hver analyse. Resultatet af spørgeskemaerne viser at nogle laboratorier opfatter negativ kontrol (ved hver analyse) som et ikke inokuleret substrat (en blindplade/-rør), andre laboratorier opfatter negativ kontrol som substrat podet med en negativ kontrolstamme og andre opfatter negativ kontrol som en analyse gennemført med fortyndingsvæske i stedet for prøven. Sidstnævnte anbefales, idet man herved får dokumentation for korrekt aseptisk analyseforløb. På tilsvarende vis vil man ved medtagelse af en positiv kontrolstamme i lavt niveau kunne opnå dokumentation for korrekt analyseforløb for så vidt angår overholdelse af tid og temperatur.

Såfremt der er vækst på den negative kontrol ved analysen, må resultatet forkastes. Årsagen til vækst kan enten være forurening under analyseforløbet eller et ikke sterilt udgangspunkt. Sidstnævnte vil ikke kunne afvises såfremt der ikke er dokumentation for sterilitet af partiet i forbindelse med fremstilling. Miljøanalyser skal gennemføres indenfor 24 timer efter prøveudtagning, hvorfor det ikke er muligt at lave analysen om på

aflæsningstidspunktet, og det gælder derfor om at udelukke flest mulige fejlkilder før analysen i værksættes.

Hvis man ved hver analyse kun medtager positiv kontrolstamme og udelader sterilkontrollen (den upodede prøve) risikerer man ”falsk positive resultater”, fordi kontrollen af og dokumentationen for aseptiske arbejdsgange under analyseforløbet mangler. I ganske mange tilfælde kan man ikke på den positive kontrolplade skelne mellem tilsatte bakterier og bakterier hidrørende fra evt. forureninger. Hvis der er vækst på ”steril kontrollen”, bør analyseresultatet forkastes.

3.1 Fortyndingsvæsker

Opgørelsen i afsnit 2.1 viser, at langt den overvejende del af laboratorierne kontrollerer volumen af fortyndingsvæskerne. Korrekt sammensætning dokumenteres af nogle af laboratorierne ved kontrol af fortyndingsvæskens pH. Sterilkontrol forud for anvendelse af mediet udføres systematisk af laboratorium nr. 8 og 9.

Fortyndingsvæskerne indeholder salte, så mikroorganismer ikke udsættes for osmotisk chok ved overførsel fra prøven til fortyndingsvæsken. Desuden er fortyndingsvæsker fattige på næringsstoffer, da mikroorganismen ikke skal vokse i fortyndingsmedierne, men blot kunne overleve. For at undgå vækst af mikroorganismen i fortyndingsvæskerne, er det nødvendigt at begrænse opholdstiden i fortyndingsvæsken. Tidsintervallet fra prøven overføres til fortyndingsvæsken og indtil substrat påhældes bliver dermed en kritisk faktor. DS 2250:1983 ”Vandundersøgelse. Prøvetagning, transport og opbevaring af prøver til mikrobiologisk undersøgelse” giver ingen vejledning herom, men i EN ISO 6222 beskrives at der max må være 15 minutter mellem tilsætning af prøven (eller fortynding heraf) og agaren. NMKL nr. 91:2002 pkt. 7.5 beskriver, at der max må hengå 45 minutter fra fremstilling af 10^{-1} fortyndingen til sammenblanding med substrat.

For at sikre nøjagtige resultater af analyserne, er det vigtigt, at der anvendes korrekt volumen af fortyndingsvæsker og at fortyndingsvæskerne er sterile.

3.2 Flydende substrater - Non-selektive bouilloner

Formålet med anvendelse af mediet bør danne udgangspunkt for typen af kvalitetskontrol, der er forskel på den nødvendige præcision ved bestemmelse af kimtal som antal kolonidannende enheder og undersøgelse for patogene mikroorganismer såsom salmonella. I sidstnævnte tilfælde er man interesseret i at kunne detektere meget lavgradige forureninger, uanset bakteriecellerne kan være, og ofte er, stressede eller beskadigede. Ofte leder man efter ”bakterien”.

Udover at dokumentere sammensætning (fx målt ved pH) og sterilitet bør funktionaliteten af mediet dokumenteres før ibrugtagning af batch. Da man ikke kan tælle kolonidannende enheder på samme måde i bouilloner som på faste substrater, må man i hvert enkelt tilfælde overveje hvorvidt kvalitativ eller semikvantitativ kontrol af funktionaliteten er nødvendig. For så vidt angår fosfatbuffer med pepton anbefales semi-kvantitativ kontrol, idet evnen til opfriskning af stressede og eller beskadigede celler er væsentlig. Spørgeskema undersøgelserne viser at 3 ud af 4 laboratorier foretager funktionskontrol af flydende non-selektive substrater før ibrugtagning af disse.

Eksempler på semi-kvantitativ kontrol er podning af flydende medier med mikroorganismer og efter inkubering at aflæse den uklarhed som vækst af mikroorganismene har givet anledning til. Wickerhams kort kan anvendes som måleskala, kombineret med mikroskopi til bekræftelse af vækst af renkultur af den tilsatte organisme. En anden semi-kvantitativ kontrolmetode er fortyndingsmetoden, hvorved der fremstilles en fortyndingsrække af den opformerede kontrolstamme. Fra hver fortynding inokuleres 5 rør af det medium, der skal kontrolleres. Efter inkubation aflæses rørene for vækst og MPN værdien bestemmes. Produktivitetsforholdet bestemmes som forholdet mellem MPN værdien for det medium der skal kontrolleres og MPN værdien for reference mediet.

3.3 Flydende substrater - Selektive/indikative bouillon

Ud over ovennævnte dokumentation af funktionaliteten; selve væksten af de ønskede mikroorganismerne og hæmning af de "ikke-ønskede" mikroorganismer bør de indikative parametre også dokumenteres. Det anbefales at udføre batch kontrollen (dvs. forud for anvendelse af substratet) med såvel en positiv kontrolstamme som en negativ kontrolstamme. Under selve analysen er det tilstrækkelig at medtage en positiv kontrolstamme og en sterilkontrol i form af en ikke-podet prøve til dokumentation af korrekt analyseforløb. Selektive og/eller indikative bouillon kan kontrolleres med ovennævnte semi-kvantitative metode, i kombination med registrering af at de indikative parametre virker.

Det fremgår af resultaterne af spørgeskema undersøgelserne at over 80% af laboratorierne foretager kontrol af de flydende substraters funktion før ibrugtagning.

3.4 Faste substrater - Non-selektive faste substrater

Kontrol af non-selektive substrater foretages ved kvantitativ eller semi-kvantitativ kontrol af funktionaliteten, såkaldt Growth Promotion Test (GPT), enten med modificeret Miles Misra metode eller ved økometrisk metode (semi-kvantitativ). Ved Miles Misra metoden undersøges væksten af den for mediet relevante mikroorganisme overfor væksten af samme mikroorganisme på non-selektiv referencesubstrat eller overfor foregående batch af samme medium. Produktivitetsforholdet (Productivity Ratio, PR-værdi) beregnes som forholdet mellem kolonitallet på det undersøgte medium og kolonitallet på referencemediet. For ikke-selektive medier anbefales i flg. NMKL proceduren en PR værdi på minimum 0,7.

Ved den økometriske metode bestemmes det absolutte vækstindeks (**A**bsolute **G**rowth **I**ndex, AGI). En overnatskultur af kontrolorganismen udstryges i et bestemt mønster på overfladen af det medium der skal testes. Efter inkubation aflæses hvilke streger (i udstrygningsmønsteret), der giver anledning til vækst, dette omsættes til en talværdi på en skala fra 0 til 5. Ikke selektive medier bør have AGI over 3.

Ved kontrol af non-selektive faste substrater er det tilstrækkeligt at medtage positive kontrolstammer.

Spørgeskema undersøgelserne viser at over 70% af laboratorierne foretager kontrol af substraterne forud for anvendelse enten ved modificeret Miles Misra metoden, ved økometrisk kontrol eller ved vækst kontrol.

3.5 Faste substrater - Selektive og/eller indikative faste substrater

For denne gruppe anbefales det at foretage kvantitativ funktionskontrol af substratet forud for anvendelse. Heri bør indgå såvel en positiv kontrolstamme i lavt niveau som en negativ kontrolstamme i højt niveau, således at både vækst af "målorganismen" og den logaritmiske hæmning af følgefloraen kan dokumenteres. Ligeledes bør der være dokumentation for korrekte indikative reaktioner.

For selektive medier anbefales en log-5 forskel på produktivetsforholdet (PR værdien) for negative og positive kontrolstammer. NMKL procedure nr. 10 anbefaler PR værdier på minimum 0,5 for positive kontrolstammer på selektive medier og PR på max 0,00001 for negative kontrolstammer, ved substratkontrol efter Miles Misra metoden. Anvendes den økometriske metode til selektive medier anbefales absolut vækstindeks for positive kontrolstammer over 2,5 og AGI under 2,0 for negative kontrolstammer.

Under selve analysen vil det være tilstrækkelig at medtage en positiv kontrolstamme og en sterilkontrol (en ikke podet prøve) til dokumentation af korrekt analyseforløb.

3.6 Kontrolstammer

Valget af hvilken type kontrolstamme, der skal anvendes, afhænger af dyrkningsmediet. For selektive og/eller indikative medier anvendes de for mediet relevante positive kontrolstammer (jvf. nedenstående tabel). I nogle tilfælde kan det være relevant at supplere med biokemisk atypiske kontrolstammer. Sidstnævnte kunne fx være tilfældet hvis der i et medium er indbygget flere selektive/indikative principper. For non-selektive medier vælges mikroorganismer, som kan vokse på mediet, og som findes i den matrix man anvender analysen til. Således er det relevant, jvf. tabel 10, at anvende *E. coli* og *Pseudomonas fluorescens* som positiv kontrol til Trypton gærestrakt agar og mindre relevant at anvende en *S. aureus* stamme, idet førstnævnte er naturligt forekommende i vand, det er *S. aureus* ikke.

Nedenstående tabel er et eksempel på hvilke mikroorganismer det kunne være relevante at anvende til kontrol af de forskellige dyrkningsmedier, men der vil let kunne argumenteres for brug af andre og flere lige så relevante mikroorganismer, jvf. ovenstående om selektive og indikative dyrkningsmedier.

Tabel 23 Eksempler på relevante kontrolstammer.

Dyrknings medium	Metode	Mål organisme	Positiv kontrol	Negativ kontrol	Bemærkninger
Peptonholdig phosphatbuffer	DS 266	Salmonella	Salmonella adabraka	-	Non-selektiv
Alkalisk peptonvand med polymixin	DS 3030	Vibrio	Vibrio vulnificus	<i>E. coli</i>	

Dyrknings medium	Metode	Mål organisme	Positiv kontrol	Negativ kontrol	Bemærkninger
B/colistin					
Rappaport-Vassiliadis bouillon	DS 266	Salmonella	S. adabraka	E. coli	
MacConkey bouillon	DS 2255	Coliforme bakterier og E. coli	E. coli	S. aureus	
Tryptonvand	DS 2255	Coliforme bakterier og E. coli	E. coli	Enterobacter aerogenes	
Laktose trypton laurylsulfat bouillon	Mod ISO/DIS 9308-1	Coliforme bakterier og E.coli	E. coli	Staph. aureus	
Trypton gærekstrakt	DS 6222	Non-selektiv	E. coli 37°C/ Pseudomonas fluorescens 22°C	-	Non-selektiv
Blodagar	DS 2217/ DS 3029	Non-selektiv	S. aureus		Non-selektiv
Membran laurylsulfat agar	Mod ISO/DIS 9308-1	Coliforme bakterier og E.coli	E. coli	Staph. aureus	
Slanetz og Bartley agar	Mod ISO 7899-2 og DS 2401	Enterokokker	Enterococcus faecalis	E. coli	
Galde esculin agar	Mod ISO 7899-2	Enterokokker	Enterococcus faecalis	E. coli	
Cellobiose colistin agar	DS 3030	Vibrio vulnificus	Vibrio vulnificus	E. coli	
GVPC	DS 3029	Legionella	Legionella pneumophila	E. coli	
Brillantgrønt-laktose-saccharose-phenolrødtagar (BS agar)	DS 266	Salmonella	Salmonella adabraka	E. coli	
Phenolrødt agar	DS266	Salmonella	Salmonella adabraka	E. coli	
Cetrimid nalidixinsyre agar (CN agar)	DS 268	Pseudomonas aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa	E. coli	
Jernsulfat agar	DS 2256	Clostridium perfringens	Clostridium perfringens	E. coli	
R2A agar	DS 2402	Varmt vands kim	E. coli (37+44) Bacillus stearothermophilus (55) Thermus spp. (65)		

Ved anvendelse af positive og negative kontrolstammer er det vigtigt, jvf. DS EN 17025 og EAL Guidelines for Microbiology, at disse er sporbare til en anerkendt kultursamling. Anvendelse af bakteriestammer skal foregå styret, idet en n'te generations bakterie ikke kan have samme egenskaber som naturligt forekommende bakterier. Bakterier kan hurtigt tilpasse sig laboratorieforhold med det resultat, at man risikerer, at man ved hjælp af standardmetoder ikke kan påvise naturligt forekommende bakterier. Man bør ikke benytte sig af ældre kulturer end 5. generation fra moderstammen.

Det podeniveau der anvendes ved substratkontrollen er en væsentlig faktor. Ved analyserne skal laboratorierne kunne detektere mikroorganismer i lavt antal, og substratkontrollen skal kunne vise, at medier er i stand til at restituere mikroorganismer i lavt antal. Desuden er det vigtigt at undgå problemer med sammenflydning af kolonier og overvoksede plader, således at korrekt kolonimorfologi og tilstedeværelse af renkultur ikke kan kontrolleres. I de fleste tilfælde vil det være fornuftigt at anvende et podeniveau på 10 til 100 cfu af positive kontrolstammer. Når det drejer sig om de negative kontrolstammer er situationen den modsatte, idet selektive medier skal kunne modstå et vist pres fra følgefloraen og ofte vil det være fornuftigt at anvende 10.000 til 100.000 cfu som podeniveau.

3.7 Hyppighed af substratkontrol

Spørgeskema undersøgelsen viser at hyppigheden af substratkontrol i form af GPT-test er per leverandørbatch eller per fremstillet batch. Nødvendigheden af at udføre GPT-test på hvert fremstillet batch kan diskuteres. Producenter af tørsubstrater udfører typisk GPT-test forud for frigivelse af partier til salg, og ofte medfølger denne kvalitetsdokumentation, når laboratorier indkøber dyrkningsmedier. Såfremt laboratoriet benytter sig af færdigblandede tørsubstrater, vil det ofte være tilstrækkeligt at udføre én GPT-test per leverandørbatch. Dette forudsætter (jvf. ISO 7218) at tørsubstrat opbevares ved anvist temperatur, at det anvendes indenfor holdbarhedstiden, at tørsubstratet ikke klumper og ikke smuldrer, at der ikke er misfarvninger, at korrekt mængde tørsubstrat afvejes til korrekt mængde vand og at varmebehandlingen gennemføres korrekt. I NMKL procedure nr. 10 beskrives det, at såfremt laboratoriet benytter ISO 9000 godkendte leverandører af tørsubstrater vil det være tilstrækkeligt at udføre GPT test når der tages en ny type substrat i arbejde i laboratoriet eller hvis laboratoriet skifter leverandør.

Dyrkningsmedier som laboratoriet selv fremstiller ved afvejning af enkelt ingredienser er behæftet med større usikkerhed, og det vil derfor være hensigtsmæssigt at udføre GPT test med større hyppighed fx på hvert fremstillet batch.

4 anbefalinger

4.1 Fortyndingsvæsker

Følgende tre faktorer anbefales at indgå i kontrollen af fortyndingsvæsker: Korrekt sammensætning (dokumenteret ved fx afvejningskontrol og pH), korrekt volumen og sterilitet (dokumentation af faktisk varmebehandling). Frekvensen for kontrol bør være for hvert fremstillet batch.

4.2 Flydende substrater – Non-selektive

For non-selektive bouilloner anbefales kontrollen desuden at omfatte kvalitativ eller semi-kvantitativ kontrol fx udført som beskrevet under punkt 3.2. Der bør anvendes en relevant positiv kontrolstamme i lavt niveau. Kontrolfrekvensen herfor anbefales at være per leverandørbatch såfremt man benytter sig af færdigblandede tørsubstrater, og per fremstillet batch såfremt laboratoriet selv afvejer alle ingredienserne. Dokumentation for korrekt sammensætning og sterilitet bør under alle omstændigheder foretages per fremstillet batch.

4.3 Flydende substrater – Selektive og/eller indikative

For selektive og/eller indikative bouilloner anbefales kontrollen gennemført som beskrevet for non-selektive bouilloner, dog med yderligere anvendelse af en negativ kontrolstamme i højt niveau.

4.4 Faste substrater – Non-selektive faste substrater

Non-selektive faste substrater anbefales kontrolleret med kvantitative eller semi-kvantitative metoder. Der bør anvendes en relevant positiv kontrolstamme i lavt niveau. Kontrolfrekvensen herfor anbefales at være per leverandørbatch, såfremt man benytter sig af færdigblandede tørsubstrater, og per fremstillet batch såfremt laboratoriet selv afvejer alle ingredienserne. Dokumentation for korrekt sammensætning og sterilitet bør under alle omstændigheder foretages per fremstillet batch.

4.5 Faste substrater – Selektive og/eller indikative faste substrater

For selektive og/eller indikative faste substrater anbefales kontrollen gennemført som beskrevet for non-selektive faste substrater, jvf. 4.4. Der bør dog også anvendes en negativ kontrolstamme i højt niveau. Opnåelse af de indikative principper bør dokumenteres.

De anbefalede kontrolfrekvenser er under forudsætning af, at kontrol af laboratoriets vandforsyning, vægte og driftskontrol af autoklaving er omfattet af god laboratoriepraksis og derved sikrer ensartede fremstillingsbetingelser fra gang til gang.

Det anbefales at medtage såvel positiv som negativ kontrol i alle analysetrin, således at korrekt analyseforløb kan dokumenteres. Også her gælder det, at

man bør kende sit podeniveau for den positive kontrol organisme, og helst vælge den i niveauet lige over detektionsgrænsen for analysen.

Kontrol/dokumentation af korrekt analyseforløb hører under proceskontrollen – på samme måde som kontrol/dokumentation af inkuberingstid og -temperatur.

5 Litteratur

DS/EN ISO/IEC 17025 1. udgave 2000-04-27 Generelle krav til prøvnings- og kalibreringslaboratoriers kompetence

NMKL prosedyre nr. 10 (2001) Kontrol av mikrobiologiske dyrkningsmedier. Versjon 1. 26. november 2001

DS 2250. 1983 Vandundersøgelse. prøvetagning, transport og opbevaring af prøver til mikrobiologisk undersøgelse.

NMKL nr. 91 2001 Prøveudtagning og forbehandling af levnedsmidler og foderstoffer til kvantitativ mikrobiologisk undersøgelse.

EAL G18 Accreditation for Laboratories Performing Microbiological Testing. 1. Ed. 1996.

UKAS Lab 31 Use of Culture Media Procured Ready-to-use or Partially Completed in Microbiological Testing. 1. Ed. 2000.

DS/EN ISO 6222 1. udg. 2000 Vandundersøgelse. Bestemmelse af antal mikroorganismer i gærekstraktar ved 22°C og 36°C. Dybdeudsæd