



**NMKL**

*NORDISK METODIKKOMITÉ FOR LEVNEDSMIDLER*  
www.nmkl.org

## **NMKL-PROTOKOLL NR. 2, 2006**

(erstatte NMKL-RAPPORT NR. 19, 1998:  
Harmonisering af mikrobiologiske metoder)

# **Harmonisering af mikrobiologiske metoder**

## **Model for udarbejdelse af mikrobiologiske metoder i NMKL**

# Harmonisering af mikrobiologiske metoder

## Formål

Formålet med denne rapport er at beskrive de forhold, der skal harmoniseres i forbindelse med udarbejdelse af NMKL's mikrobiologiske metoder.

## Baggrund

Behovet for en harmonisering af de mikrobiologiske metoder blev aktuelt som en følge af laboratoriernes akkreditering. Akkrediteringen stiller krav om, at laboratorier nøje skal følge en metodebeskrivelse, med mindre det kan dokumenteres, at en metodeafvigelse ikke medfører ændringer i resultatet sammenlignet med resultatet, der er opnået ved den godkendte/akkrediterede metode.

Ved anvendelse af NMKL's mikrobiologiske metoder har der vist sig en række problemer på grund af manglende ensartethed i metoderne, fx krav til temperaturangivelse for termostater, pH-angivelse for substrater, forskellig sammensætning af "ens" substrater og lignende, uanset at der ikke foreligger faglige begrundelser herfor.

Det blev derfor i 1993 besluttet, at en arbejdsgruppe skulle udarbejde forslag til harmonisering, dels for at afhjælpe ovennævnte problemer og dels for at harmonisere metoderne i overensstemmelse med den reviderede vejledning i kvalitetssikring for mikrobiologiske laboratorier (NMKL-rapport nr. 5, 1994).

På årsmødet i 1996 vedtoges en rapport om harmonisering af mikrobiologiske metoder (dateret 28/11-95), og på årsmødet i 1997 blev der vedtaget et tillæg til rapporten (dateret 9/7-97). Rapport nr. 19 blev udgivet i 1998 som et sammendrag af disse og af årsmødernes beslutninger for emnet.

Herværende rapport er nu en revideret version af den oprindelige rapport nr. 19.

Følgende har deltaget i arbejdsgrupperne (oprindelig og revision):

Danmark: Ulla Brander, Lis Nielsen,  
Island: Franklin Georgsson, Margrét Geirsdóttír  
Finland: Tuula Johansson, Olli Pensala  
Norge: Bjørn Tore Lunestad, Gjermund Bø, Kristine Naterstad  
Sverige: Jan Nützmänn, Marianne Boysen.

## Model for udarbejdelse af mikrobiologiske metoder

I overensstemmelse med referentvejledningen fastsættes følgende model for udarbejdelse af mikrobiologiske metoder.

1. Formål og anvendelsesområde
  2. Definition
  3. Referencer
  4. Princip
  5. Fortyndingsvæske, substrater og reagenser
    - 5.1. Fortyndingsvæske
    - 5.2. Opformeringsmedier
    - 5.3. Substrater
    - 5.4. Reagenser/kemikalier
  6. Apparatur og glasudstyr
  7. Prøvetagning
  8. Fremgangsmåde
    - 8.1. Forbehandling/fortynding
    - 8.2. Udsæd
    - 8.3. Inkubation (temperatur + tid)
    - 8.4. Aflæsning/tælleintervaller
    - 8.5. Konfirmering
  9. Angivelse af resultat
  10. Metodens pålidelighed
  11. Sikkerhedsanvisninger (generelle sikkerhedsanvisninger - idet anvisninger for substratfremstilling og håndtering bør angives i forbindelse med det emne, det omhandler)
  12. Evt.
  13. Metodens referent
- Bilag med resultater fra kollaborativ afprøvning

Særlige forhold kan betyde, at en metode ikke kræver tekst i hvert afsnit. I så fald udgår afsnittet med overskrift, og nr. for de følgende afsnit ændres.

### Overskrift

Der henvises til valideringsstatus for metoden med teksten: "Denne NMKL-metode er kollaborativt valideret i en metodeafprøvning." eller "Denne NMKL-metode er ikke valideret i en kollaborativ metodeafprøvning."

### Pkt. 1. Formål og anvendelsesområde

Her noteres, hvis standarden er begrænset til bestemte formål, f.eks. særlige typer med særligt beskrevne fænotypiske, genotypiske eller biokemiske egenskaber, eller hvis metoden ikke kan anses for egnet til alle typer prøver. Omvendt kan f.eks. noteres, hvis "metoden er velegnet til alle typer fødevarer og / eller foder (svaberprøver / fæces)".

Hvis metoden ikke er valideret, eller en afprøvning har været begrænset til få matricer, kan tages forbehold, hvis det skønnes nødvendigt, med teksten: "Denne metode er ikke nødvendigvis egnet til alle matricer".

## Pkt. 3. Referencer

Der henvises til dokumenter med angivelse af enten seneste udgave og år eller som udateret, og kun med angivelse af nr. Hvis referencen er angivet uden udgavenummer, kan bemærkes, at der henvises til seneste udgave af dokumentet, inkl. evt. tilføjelser.

Der skal som minimum altid henvises til NMKL-rapport nr. 5, (1994 eller senere udgave): Vejledning i kvalitetssikring for mikrobiologiske laboratorier.

M.h.t. prøveudtagning henvises til Procedure nr. 12, (2002 eller senere udgave): Håndbok i prøvetaking av næringsmidler.

M.h.t. forbehandling henvises til NMKL nr. 91 (4. udgave, 2002 eller senere udgave): Prøveudtagning og forbehandling af levnedsmidler og foderstoffer til kvantitativ mikrobiologisk undersøgelse.

## Pkt 4. Princip

Teksten i afsnittet skal være i fuldstændig overensstemmelse med teksten i afsnit 2, definitioner m.h.t. hvilke egenskaber, der testes for.

## Pkt 5. Fortyndingsvæske, substrater og reagenser

Muligheden for anvendelse af kommercielle substrater nævnes, f.eks. med teksten "Kommercielle (dehydrerede substrater, materialer) er tilgængelige og kan med fordel anvendes. Ved brug af disse, følges producentens anvisninger."

Sikkerhedsanvisninger i forbindelse med fremstillingen skal angives, hvor det er relevant i forbindelse med det aktuelle punkt.

Steriliseringsbetingelser bør angives.

### Pkt. 5.1. Fortyndingsvæske

Fortyndingsvæske og dets sammensætning skal altid angives.

pH-tolerancer for fortyndingsvæske og substrater skal være i overensstemmelse med NMKL-rapport nr. 5, dvs.  $\pm 0,2$ , med mindre der foreligger faglig begrundelse for skærpede krav.

pH-angivelsen for fortyndingsvæske og substrater gælder **det brugsfærdige** substrat, målt ved 20 - 25°C. I metoderne angives: "Efter sterilisering (varmebehandling) skal pH i det brugsfærdige substrat (fortyndingsvand) være  $x,y \pm 0,2$  målt ved 20 - 25°C." Tidspunkt for måling af pH er ikke afgørende og angives ikke i metoden.

Valg af fortyndingsvæske skal ske i overensstemmelse med NMKL nr. 91, med mindre der foreligger faglig begrundelse for anden sammensætning.

## **Pkt. 5.2 og 5.3. Opformeringsmedier og substrater:**

### **a) Substratnavn**

Substratnavnet angives på skandinavisk sprog. Det internationale navn skal fremgå af den engelske tekst.

Vedr. pH-måling henvises til pkt. 5.1.

### **b) Teknisk opsætning for substrater**

Den ovenfor nævnte rækkefølge og de nævnte overskrifter (pkt. 5.1 – 5.4) anvendes.

Er der tale om substrater med tilsætninger er første underpunkt sammensætning og fremstilling af basissubstrat og følgende underpunkt(er) er sammensætning og fremstilling af tilsætning(er).

### **c) pH i substrater**

Vedr. pH-måling henvises til pkt. 5.1.

### **d) Ingredienser**

Alle ingredienser i substrater nævnes med navn. Der skal tilføjes den kemiske formel, med angivelse af evt. krystalvand, hvis der kan være tvivl.

Hvis det er afgørende for substratets kvalitet, skal ingredienserne opgives med relevant antal decimaler, også for hele gram og ml.

Vand i substrater angives som den mængde vand, der skal **tilsættes**. Om muligt skal substratsammensætningen angives for tilsætning af 1000 ml vand. Det skal tydeligt fremgå, om tilsætninger af vand til fortyndinger, substrater er til (ad) en vis mængde, f.eks. 1000 ml, eller der tilsættes en nøjagtig mængde (f.eks. der tilsættes 1000 ml).

### **e) Krav til vand**

Vand skal opfylde de krav, der er angivet i NMKL-rapport nr. 5, 1994 eller senere udgave (side 7). I metoden angives vand som "destilleret eller ligeværdigt vand".

### **f) Plader**

Tykkelsen på plader eller substratmængden bør angives, f.eks. ved flg. tekst: "Hæld det smeltede substrat i Petriskåle til en tykkelse af mindst 3 mm. Til en Petriskål med diameter på 90 mm behøves normalt 18-20 ml agar, eller som angivet i den pågældende metodeforskrift. Hvis pladerne skal inkuberes udover 48 timer eller ved temperaturer over 40°C, er det nødvendigt med mere agar."

### **g) Ligeværdige substrater**

Det generelle krav til ligeværdige substrater er, at de indeholder de samme ingredienser både kvalitativt og kvantitativt som angivet i metoden, og at fysiske egenskaber såsom pH også er identiske.

En afgørelse af om substrater med en anden sammensætning og/eller andre egenskaber er ligeværdige må bero på en konkret vurdering i hvert tilfælde.

Denne vurdering kan ske i forskellige led

- afprøvning/vurdering af referenten allerede ved metodeudvikling
- afprøvning hos bruger
- afprøvning/vurdering hos de myndigheder, der anviser metoder til anvendelse i offentlig kontrol med levnedsmidler
- afprøvning/vurdering hos et valideringsorgan som f.eks. NordVal.

Referenter skal i det omfang, det er muligt, vurdere brug af ligeværdige (kommercielle) substrater. Af praktiske årsager bør der til alle substratbeskrivelser i NMKL-metoder tilføjes "ligeværdige substrater kan anvendes" (se desuden pkt. 5).

## **Pkt. 6. Apparatur**

Under dette punkt skal kun nævnes specialapparatur, dog altid de krævede inkubatorer. Med henvisning til NMKL-rapport nr. 5, 1994 (eller senere udgave) skal der ikke ske en oprensning af almindeligt mikrobiologisk standardudstyr (fx pipetter, stomacher o.a.).

### **Pkt. 8.1. Forbehandling/fortynding**

I dette afsnit skal der ske en henvisning til NMKL nr. 91.

For visse fødevarer og i visse tilfælde er det nødvendigt med særlig forbehandling.

### **Pkt. 8.3. Inkubation**

#### **a) Temperaturtolerancer**

Temperaturtolerancer for inkubatorer skal være i overensstemmelse med NMKL-rapport nr. 5, 1994 (eller senere udgave) dvs.  $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$  for luftinkubatorer og  $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$  for vandinkubatorer, med mindre der foreligger faglig begrundelser for skærpede krav. Temperaturen angives som eksempel på følgende måde:  $37,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ .

Ved intervaller for inkubation (f.eks.  $20 - 25^{\circ}\text{C}$ ), angives ingen tolerancer.

#### **b) Inkubationstemperaturer**

Generelt anvendes følgende temperaturer: 20, 25, 30, 37, 42 og  $44^{\circ}\text{C}$ . Andre inkubationstemperaturer anvendes kun, når der er faglig begrundelse herfor.

#### **c) Inkubationstid**

Med mindre metoden med henvisning til faglige begrundelser kræver andet, gælder følgende generelle regler for aflæsning:

- 24 timer  $\pm$  3 timer
- 48 timer  $\pm$  4 timer
- 72 timer  $\pm$  6 timer

Ved inkubation i et antal dage/døgn (f.eks. 5 eller 7 dage), angives ingen tolerancer.

## **Pkt. 8.4. Aflæsning/tælleintervaller**

Aflæsning samt udregning og angivelse af resultat skal for kvantitative metoder ske i overensstemmelse med NMKL-rapport nr. 5, 1994 eller senere udgave (afsnit 13).

Der angives et ønskeligt koloni-interval til aflæsning, hvis mulig.

For kvalitative metoder angives resultatet som påvist/ikke påvist pr. analyseret prøvemængde.

## **Pkt. 8.5. Konfirmering**

### **a) Rendyrkningsmedier**

Det er oftest uden betydning, hvilket substrat (ikke-selektivt), der anvendes til rendyrkning. I metoden skal der derfor indbygges en fleksibilitet i formuleringen, evt. kan angives forskellige medier, der kan anvendes. OBS! Rendyrkningssubstratet skal vælges, så en efterfølgende konfirmering ikke påvirkes. Hvis f.eks. der skal udføres katalasetest, bør blodagar ikke vælges, og ved efterfølgende oxidasetest, må substratet ikke indeholde sukker!

Konfirmering behøver ikke foregå efter rendyrkning, hvis metoden foreskriver andet.

### **b) Konfirmering**

Med mindre faglige begrundelser kræver et bestemt antal kolonier til konfirmering, anvendes følgende formulering: "Test et udvalg af suspekter kolonier – som regel 5 af hver type – hvis konfirmering er nødvendig eller ønskelig."

## **Pkt. 10. Metodens pålidelighed.**

Her angives hvornår metoden er kollaborativt valideret (årstal), på hvilke matricer og niveauer (høj, lav) samt hvor mange laboratorier, der deltog i afprøvningen.

For kvalitative metoder angives specificitet og sensitivitet, mens der for kvantitative metoder angives værdier (evt. standardafvigelser hhv. relative standardafvigelser) for repeterbarhed og reproducerbarhed, evt. som henvisning til bilag med data for resultater fra afprøvningen i skematisk form

## **Pkt. 11. Sikkerhedsanvisninger**

Her angives generelle sikkerhedsanvisninger. Desuden henvises til, at særlige anvisninger for substratfremstilling er angivet under de aktuelle punkter.

## **Pkt. 13. Metodens referent**

Her angives referentens adresse og evt. Mailadresse.

© NMKL  
[www.nmkl.org](http://www.nmkl.org)