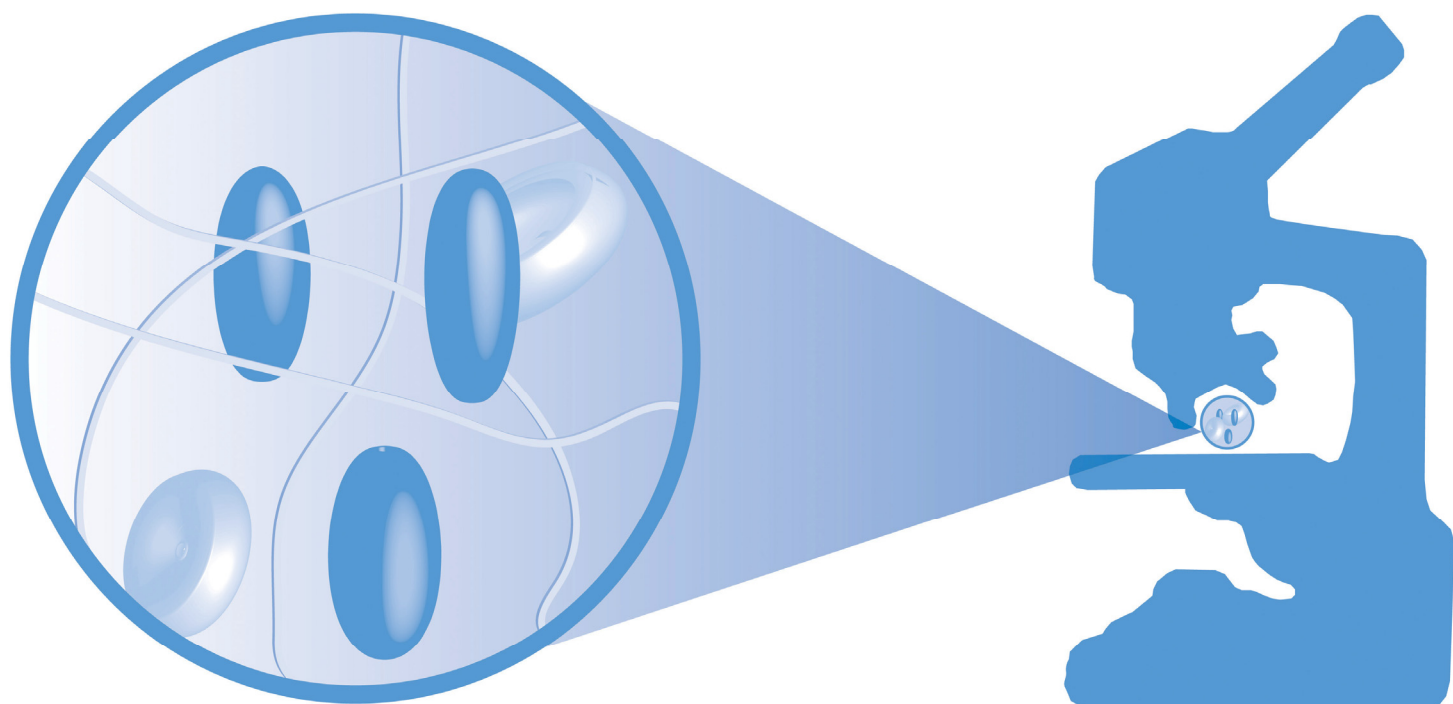


MIKES

METROLOGIA

J1/2005



Mikrobiologiset vertailukannat

Metrologian neuvottelukunta
Kemian ja mikrobiologian jaosto
Mikrobiologian työryhmä

Helsinki 2005

Julkaisu J1/2005

Mikrobiologiset vertailukannat



Kemian ja mikrobiologian jaosto
Mikrobiologian työryhmä

Toimittanut Tapio Ehder

Helsinki 2005

Esipuhe

Kansainvälisestä kirjallisuudesta on vaikea löytää yhtenäistä ohjeistusta vertailukantojen valinnasta, käytöstä ja säilytyksestä. Kirjallisuuden perusteella kantojen käyttö- ja säilytysohjeet ovat joko liian ylimalkaisia tai liian tiukkoja. Sen tähden Metrologian neuvottelukunnan kemian ja mikrobiologian jaoston asettama mikrobiologian työryhmä katsoi tarpeelliseksi laatia oppaan vertailukantoihin liittyvistä olennaisista näkökohdista.

Oppaan laadintaan osallistuneeseen mikrobiologian työryhmään ovat kuuluneet seuraavat henkilöt:

Marja-Leena Kantanen, pj	Kansanterveyslaitos
Ritva Heikkilä	Yhtyneet Laboratoriot Oy
Seija Kalso	Helsingin kaupungin ympäristökeskus
Maija Lappalainen	HUSLAB
Oili Liimatainen	PSHP Laboratoriokeskus
Raija Myllys	Labquality Oy
Tuula Pirhonen	EELA
Eija Seuna	EELA
Maija-Liisa Suihko	VTT, Biotekniikka
Pirjo Torkko	Kansanterveyslaitos
Jaana Järvinen siht. (2002 - 2003)	Mittatekniikan keskus
Tapio Ehder siht. (2004 -	Mittatekniikan keskus

Sisällysluettelo

1 Termit	8
Jäljitettävyys	8
Kantakokoelma	8
Kontaminaatio	8
Kontrollikanta	8
Käyttökanta	8
Pasaasi, pasasointi	8
Referenssikanta	8
Siirrostus, siirrostaminen	8
Tyyppikanta	8
Validointi	8
Vertailukanta	8
2 Kantakokoelmat	9
3 Yleistä vertailukannoista	11
4 Vertailukantojen jäljitettävyys ja valinta	12
5 Vertailukantojen säilytys	13
5.1 Yleistä	13
5.2 Bakteerit ja sienet	13
5.2.1 Pitkäaikaissäilytys	13
5.2.2 Päivittäiset käyttökannat	14
5.3 Virukset	14
5.4 Parasiitit	15
5.4.1 Yleistä	15
5.4.2 Alkueläimet	15
6. Vertailukantojen dokumentointi	16
7. Poikkeamatilanteet	17
8 Viitteet	18

3 Yleistä vertailukannoista

Vertailukannoilla tarkoitetaan sellaisia tunnettuja mikrobikantoja, joita laboratorioissa käytetään mikrobiviljely- ja tunnistusmenetelmien sisäiseen laadunohjaukseen ja menetelmien validointiin. Vertailukannoista käytetään myös nimityksiä referenssikannat ja kontrollikannat. Tyypikanta sen sijaan on erillinen käsite ja liittyy uuden mikrobilajin kuvaamiseen ja sen taksonomiaan.

Vertailukantojen avulla varmistetaan menetelmien toimivuus ja tulosten oikeellisuus ja toistettavuus. Jäljitettävyyden vuoksi vertailukannat ovat useimmiten peräisin kansainvälisistä kantakokoelmista. Kantakokoelmissa on yleensä useita saman lajin edustajia, jotka saattavat poiketa ominaisuuksiltaan toisistaan (esim. mikrobilääke-resistenssi). Näin ollen niitä voidaan laboratorioissa käyttää eri tarkoituksiin. Perusteluista syistä voidaan vertailukantoina käyttää muitakin kuin tunnettujen kantakokoelmien kantoja.

Kansainvälisestä kirjallisuudesta on vaikea löytää yhtenäistä ohjeistusta vertailukantojen valinnasta, käytöstä ja säilytyksestä. Kirjallisuuden perusteella kantojen käyttö- ja säilytysohjeet voivat olla joko liian ylimalkaisia tai liian tiukkoja. Toisessa ääripäässä kantojen toimivuus saattaa vaarantua ja toisessa ääripäässä kantojen ylläpito on niin työlästä ja kallista, ettei se laboratorioden päivittäisessä työskentelyssä ole aina järkevää.

Vertailukanta valitaan siten, että mikrobin ominaisuudet soveltuvat mahdollisimman hyvin käyttötarkoitukseensa. Kun laboratoriossa otetaan käyttöön uusi vertailukanta, tulee sen ominaisuudet varmistaa ennen käyttöönottoa menetelmäkohtaisesti (validointi). Laboratorion sisäisellä laadunohjausmenettelyllä seurataan, että halutut ominaisuudet säilyvät mikrobikannalla muuttumattomina. Seurannan tulee olla säännöllistä sekä selkeästi ohjeistettua ja dokumentoitua.

4 Vertailukantojen jäljitettävyys ja valinta

Jäljitettävyydellä tarkoitetaan mittaustuloksen tai mittanormaanin yhteyttä ilmoitettuihin referensseihin, yleensä kansallisiin tai kansainvälisiin mittanormaaleihin, sellaisen aukottoman vertailuketjun välityksellä, jossa on ilmoitettu kaikkien vertailujen epävarmuudet (viite 1). Jäljitettävyyden vuoksi vertailukantoina tulee käyttää kansainvälisessä tai kansallisessa kantakokoelmassa säilytettäviä vertailukantoja (viite 2). Joissakin tilanteissa vertailukantoina voidaan käyttää myös omassa laboratoriossa eristettyjä ja varmistettuja mikrobikantoja. Tällöin vertailukantoja ei ole joko saatavissa kansainvälisistä kantakokoelmista, tai ne ovat harvinaisia tai vaikeasti tunnistettavia kantoja tai kasvuominaisuuksiltaan erikoislaatuisia kantoja. Oma kanta olisi hyvä tallettaa johonkin varsinaiseen kantakokoelmaan.

Vertailukannan valinnassa otetaan huomioon seuraavat seikat:

- käytetään ensisijaisesti kansainvälisestä kantakokoelmasta peräisin olevia kantoja tai laadunarviointikierrosten näytteistä eristettyjä kantoja, jotka ovat jäljitettävissä kansainvälisiin kantakokoelmiin
- kantakokoelmissa on yleensä useita saman lajin edustajia, jotka saattavat poiketa ominaisuuksiltaan toisistaan; näistä valitaan kanta/kannat, joilla on halutut ominaisuudet
- valitaan kanta, joka edustaa ominaisuuksiltaan ja alkuperältään mahdollisimman hyvin sitä ryhmää, jonka määrittämisestä on kyse
- valitulla kannalla tulee olla selkeä positiivinen / negatiivinen kasvu tai reaktio halutussa kontrollitilanteessa
- jos haluttua ominaisuutta voidaan testata useammalla eri kannalla, valitaan vähiten patogeeninen kanta
- jos käytössä on standardoitu menetelmä, kanta valitaan sen vaatimusten mukaisesti

5 Vertailukantojen säilytys

5.1 Yleistä

Vertailukannat tulee säilyttää siten, että kontaminoitumisen tai ominaisuuksien muuttumisen riski on mahdollisimman pieni. Vertailukantojen säilyvyys käyttökelpoisina riippuu paitsi säilytysolosuhteista myös mikrobikannasta sekä tarvittavien käyttöominaisuuksien laadusta. Näin ollen täsmällisiä, kaikissa tilanteissa päteviä säilytysohjeita ja säilyvyysaikoja ei voida antaa.

Mitä useammin mikrobikantoja siirrostetaan eli pasasoidaan, sen todennäköisempää on ominaisuuksien muuttuminen tai mikrobikannan kontaminoituminen vieraalla mikrobikasvustolla. Tästä syystä pyritään välttämään mikrobikantojen tarpeettoman tiheää siirrostamista. Tähän päästään kaksivaiheisella järjestelmällä, jossa vertailukantaa otetaan useisiin putkiin pitkäaikaissäilytystä varten ja käyttökannat otetaan näistä putkista määrävlein (kts. kohta 5.2.2).

Vertailukannoille ei yksiselitteisesti voida määritellä sukupolvien korkeinta sallittua lukumäärää, sillä se riippuu mikrobikannasta ja sen ominaisuuksista sekä käyttötarkoituksesta ja säilytysolosuhteista. Mikrobikannan ominaisuuksien säilyminen varmistetaan laboratorion sisäisillä tarkistustoimenpiteillä.

Isoissa laboratorioissa, joissa vertailukantojen lukumäärä on suuri ja käyttö runsasta, kannattaa pitää omia kantakokoelmia. Pienissä laboratorioissa on kantojen asianmukainen pitkäaikainen säilytys hankalaa, joten niissä kannattaa turvautua kotimaisilta toimittajilta säännöllisin väliajoin tilattaviin kantoihin.

5.2 Bakteerit ja sienet

Seuraavat ohjeet soveltuvat useimmille bakteerikannoille (mukaan lukien mykobakteerit) sekä hiiva- ja homekannoille.

5.2.1 Pitkäaikaissäilytys

Bakteeri- ja sienikantojen pitkäaikaissäilytys on käytännön testauslaboratoriossa helppoa toteuttaa syväpakastamalla mikrobisuspensiot suojaavaan liuokseen. Tällaisia liuoksia ovat esim. rasvaton maito (skim milk), glyseroli, dimetyylisulfoksidi (DMSO) (viitteet 4, 9). Kaupallisesti on saatavilla putkia, joissa on säilytysliuoksen lisäksi helmiä. Näistä kanta voidaan ottaa kätevästi käyttöön helmi kerrallaan.

Mikrobikantojen suositeltava säilytystapa on syväpakastus lämpötilassa -70 °C ... -150 °C , jossa kannat säilyvät jopa vuosia muuttumattomina (viitteet 3, 4, 5, 9). Korkeammissa lämpötiloissa (esim. -20 °C) säilyvyys on olennaisesti huonompi, mikrobikannasta riippuen jopa vain muutamia kuukausia (viite 3).

Kun bakteeri- tai sienikanta on saapunut kantakokoelmasta, tulee siitä tehdä välittömästi ensimmäisen viljelyn yhteydessä useita pitkäaikaiseen säilytykseen soveltuvia mikrobisuspensioita. Näitä suspensioita on suositeltavaa säilyttää kahdessa eri pakastimessa, useita putkia kummassakin. Näin varmistetaan kantojen säilyvyys myös mahdollisen laitehäiriön yhteydessä.

Pakastamisen lisäksi mikrobikantojen pitkäaikais säilytyksessä voidaan käyttää muitakin menetelmiä (kylmäkuivaus, säilöminen nestetyypeen, gelatiinikuivaus) (viitteet 3, 9), mutta ne ovat hankalammin toteutettavissa tavallisissa testauslaboratorioissa.

Jos säilyvyysajaksi riittää 6-12 kk, voidaan käyttää pelkästään kiinteää ravintoagaria sisältäviä kantaputkia, joita säilytetään jääkapissa ja ääritapauksissa jopa huoneenlämmössä (viite 5). Tämä menetelmä soveltuu kuitenkin vain hyvin elävyytensä ja ominaisuutensa säilyttäville mikrobikannoille.

5.2.2 Päivittäiset käyttökannat

Päivittäiset käyttökannat voidaan säilyttää kiinteässä tai nestemäisessä elatusaineessa (viitteet 4,5). Käytettävä elatusaine, säilytyslämpötila ja jatkoviljelyiden tiheys määräytyvät mikrobikannan mukaan. Mitä useammin kantaa siirrostetaan maljalta (putkesta) toiseen, sen suurempi on riski, että kanta kontaminoituu tai sen ominaisuudet muuttuvat. Siirrostuskertojen ylärajaa ei kuitenkaan voi tarkkaan määrittellä, sillä se riippuu mikrobikannasta ja sen ominaisuuksista. Suositeltavaa on, että vertailukannat otetaan uudestaan käyttöön pitkäaikais säilytyksestä pääsääntöisesti noin kuukauden väliajoin (viite 4). Jos kuitenkin käytännössä todetaan, että tietyn vertailukannan tietty kontrolloitava ominaisuus säilyy muuttumattomana pitempään, voidaan pitkäaikais säilytyksestä ottamisen frekvenssiä harventaa. Hidaskasvuiset bakteerikannat (*Mycobacterium*-lajit) sekä sienikannat otetaan harvemmin (esim. 6 kk:n välein).

5.3 Virukset

Viruskantojen säilytyksessä pätevät samat yleisperiaatteet kuin bakteeri- ja sienikantojen säilytyksessä. Syväpakastaminen -70 °C ... -150 °C lämpötilassa on suositeltavin tapa, tällöin säilytysputkiin siirretään kasvatusputkista virusviljelyn kasvatusnestettä ja solukkoa. Myös nestetyppisäilytystä käytetään, mutta menetelmä on hankalampi.

Virusviljelyissä vertailukantoja ei käytetä samalla tavoin päivittäisessä toiminnassa kuin bakteeri- ja sieniviljelyissä. Vertailukantoja käytetään mm. silloin, kun työntekijä vaihtuu tai otetaan käyttöön sesonkiluonteiset viljelymenetelmät (esim. influenssavirukset) tai jos otetaan käyttöön uusia soluviljelykantoja. Myös harvinaisia viruksia (SARS-koronavirus) tutkittaessa käytetään vertailukantoja. Tarvittaessa viruskannat kasvatetaan normaaleissa soluja ja kasvuliuosta sisältävissä viljelyputkissa.

5.4 Parasiitit

5.4.1 Yleistä

Parasiitteihin kuuluu varsin monenlaisia eliöitä yksisoluisista alkueläimistä monimutkaisempiin matoihin ja niveljalkaisiin. Parasitologian diagnostiikka perustuu pääosin morfologiaan eli muotojen tarkasteluun, jolloin menetelmän toimivuuden tarkasteluun ei tarvita välttämättä vertailukantoja.

Vertailukantojen tarve on rajoittunut pääasiassa suurempiin viljelytutkimuksia tekeviin referenssi- ja tutkimuslaboratorioihin, sillä viljelytutkimukset ovat monimutkaisia ja laadunarviointi vertailukantojen saatavuuden ja säilyttämisen vuoksi vaikeaa.

Nykyisin on olemassa vain alkueläinkantojen säilytykseen käytännössä toimiva menetelmä.

5.4.2 Alkueläimet

Alkueläinkantoja voidaan säilyttää ampulleissa syväpakastettuina tai nestemäisessä työssä (viite 9). Vertailukantojen pitkäaikaissäilytys on laboratoriossa toteutettavissa säilyttämällä pakastettuja ampulleja nestemäisessä työssä (-196 °C) lämpötilan ollessa alle -130 °C, mielellään n. - 150 °C (viite 8). Säilytysaika nestemäisessä työssä on pitkä, stabiliteetti hyvä, kontaminaatiovaara pieni, soveltuu suurillekin kantakoelmille, mutta menetelmän kustannukset ovat korkeat (viite 1). Korkeammassa lämpötilassa kannat säilyvät huonosti, - 70 °C:ssa viikosta puoleen vuoteen, riippuen lajista. Tavallisessa kotitalouspakastimessa (n. - 18 °C ... - 20 °C) alkueläimet kuolevat lyhytaikaisessakin säilytyksessä (viite 7).

6. Vertailukantojen dokumentointi

Laboratorion on laadittava ohjeet vertailukantojen hankintaan, ylläpitoon, säilytykseen, varmentamiseen ja käyttöön.

Kaikista laboratorion käytössä olevista vertailukannoista dokumentoidaan seuraavat tiedot:

- mikrobin nimi
- tunnistetieto (esim. kantakokoelmanumero)
- hankintapaikka ja -aika
- sukupolvitiedot (jos ne ovat oleellisia tutkimukselle tai ovat saatavilla)
- omassa laboratoriossa varmennetut vertailukannan ominaisuudet
- pitkäaikaissäilytyksen tapa ja paikka
- käyttökantojen säilytys
- spesifinen ominaisuus (tarvittaessa)
- käyttökantojen uusimiset

Lisäksi näytteistä eristetyistä vertailukannoista on oltava tiedot näytelaadusta, tarvittaessa näytelajista tai eläinlajista sekä näytenumero, jonka perusteella voidaan löytää tiedot alkuperäisestä potilas- tai muusta näytteestä (joka mahdollisesti myös on talletettu) ja sen tutkimuslähteestä.

Vertailukantojen käyttö ja niiden antamat tulokset dokumentoidaan. Näin pystytään seuraamaan, että kantojen halutut ominaisuudet säilyvät muuttumattomina.

7. Poikkeamatilanteet

Laboratoriolla tulee olla dokumentoidut menettelytavat poikkeamatilanteiden varalle.

8 Viitteet

- [1] SFS 3700, Metrologia, Perus- ja yleistermien sanasto, Suomen Standardisoimisliitto SFS, 3. painos, vahvistettu 16.2.1998.
- [2] EA-4/10 Accreditation in microbiological laboratories. July 2002 rev02.
(<http://www.european-accreditation.org/>)
- [3] Snell JJS, Brown DFJ, Roberts C, editors, Quality assurance; principles and practice in the microbiology laboratory, London: Public Health Laboratory Service, 1999: 324 pp.
- [4] National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1996, Quality Assurance for Commercially Prepared Microbiological Culture Media, 2nd ed., Approved Standard, M22-A2. NCCLS, Wayne, PA.
- [5] Basic Laboratory procedures in Clinical Bacteriology, WHO, Geneva, 1991 ISBN 92 4 154425 2.
- [6] Garcia LS. Practical guide to diagnostic parasitology, Washington: ASM Press, 1999: 349 pp.
- [7] Product Information Sheet for ATCC®30957, Giardia intestinalis
- [8] Frank P. Simione, M.S. of the American Type Culture Collection (ATCC) in cooperation with Nalge Nunc International Corp., Cryopreservation Manual, Nalge Nunc International, 1998, <http://nalgenelab.nalgenunc.com/techdata/technical/cryo.pdf>
- [9] Kirsop, B.E and Doley, A. Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. A Manual of Laboratory Methods, 2nd ed., Academic Press, London, 1991, 308 pp, ISBN 012-410351-0 (1991)

Viimeisimmät julkaisut

J3/2000	K. Riski, Mass comparison M3
J4/2000	K. Riski, Mass and volume comparisons at MIKES
J5/2000	A. Lassila ja S. Nevalainen, Nanometritason mittaukset, kartoitus
J6/2000	M. Rantanen, Nordic intercomparison in gauge pressure range 0 ... 2 Mpa
J1/2001	S.I. Niemelä, Mikrobiologian kvantitatiivisten viljelymääritysten mittausepävarmuus
J2/2001	J. Järvinen (Ed.), Finnish National Standards Laboratories. Annual Report 2000
J3/2001	T. Weckström, Lämpötilan vertailumittaus L 11, PT100-anturin sovitusten kehittämisen kehittäminen
J4/2001	B. Hemming, High precision roundness. Euromet project 533. Final Report
J5/2001	M. Heinonen, Kaasun kosteuden mittaaminen
J6/2001	M. Heinonen, S. Bell, K. Flakiewics, G. Mamontov, P.K. Birch, A. Steiner and S. Ugus, Intercomparison of humidity standards
J7/2001	M. Rantanen, Comparisons in the pressure range from 50 kPa to 350 kPa
J1/2002	T. Weckström, Lämpötilan mittaus
J2/2002	J. Järvinen, M. Heinonen and A. Lassila (Eds.), Annual Report 2001
J3/2002	S.I. Niemelä, Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms
J4/2002	A. Lassila, Calibration of gauge blocks by mechanical comparison. Final Report
J5/2002	V. Köning, A. Pitkäkoski, M. Rantanen and S. Semenoja, Comparison of spinning rotor vacuum gauges between MIKES, SP and Vaisala Oyj
J6/2002	M. Rantanen and S. Semenoja, Calibration of a 130 Pa CDG: Comparison of the results from MIKES PTB and MKS Deutschland
J1/2003	J. Järvinen, M. Heinonen and A. Lassila (Eds.), Annual Report 2002
J2/2003	K. Riski, Basic formula for mass calibration
J3/2003	M. Rantanen, Intercomparison in gauge pressure range 0...60 Mpa
J4/2003	S.I. Niemelä, Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganism
J5/2003	K. Riski, Mass comparison: 5 kg laboratory balance
J6/2003	M. Rantanen, Comparison in absolute pressure range 0,02 hPa ... 10 hPa between MIKES and Beamex
J7/2003	M. Heinonen, Comparison of dew-point temperature calibrations
J8/2003	J. Järvinen (Toim.), Kansallinen mittanormaalityö ja sen kehittäminen 2003 - 2007
J1/2004	J. Järvinen et al. (Eds.) Annual Report 2003
J2/2004	S. Semenoja, M. Rantanen, J. Leskinen and A. Pitkäkoski, Comparison in the absolute pressure range 100 kPa to 2100 kPa between MIKES and Vaisala Oyj
J3/2004	V. Esala, Pituuden vertailumittaus D6, loppuraportti
J4/2004	J. Halttunen, Coriolis-mittarin vertailumittaus, syksy 2002. Interlaboratory comparison of a Coriolis flowmeter, Autumn 2002
J5/2004	L. Uusipaikka, Suhteellisen kosteuden kalibrointien vertailu, loppuraportti.
J6/2004	K. Riski, Mass Comparison: 2 kg, 100 g, 20 g, 2 g and 100 mg weights.
J7/2004	M. Rantanen, S. Semenoja, Intercomparison in Gauge Pressure Range from 20 Pa to 13 kPa.

Tilaukset: Kirsi Tuomisto, puh. (09) 6167 761 (vaihde), e-mail tilaukset@mikes.fi.



- PL 239, Lönnrotinkatu 37, 00181 HELSINKI
- Puh. 09 616 761 • Fax 09 616 7467
- www.mikes.fi