

Substratkontroller utifrån SS-EN ISO 11133:2014

Tolkning och vägledning



Denna titel kan laddas ner från: [Livsmedelsverkets sida för att beställa eller ladda ner material](#).

Citera gärna Livsmedelsverkets texter, men glöm inte att uppge källan. Bilder, fotografier och illustrationer är skyddade av upphovsrätten. Det innebär att du måste ha upphovsmannens tillstånd att använda dem.

© Livsmedelsverket, 2022

Författare:

Tommy Šlapokas

Rekommenderad citering:

Livsmedelsverket. Šlapokas, T. 2022. *Substratkontroller utifrån SS-EN ISO 11133:2014 – Tolkning och vägledning*.

Livsmedelsverkets PM Mars 2022. Uppsala.

ISSN 1104-7089

Omslag: Livsmedelsverket

Förord

Sen ett antal år finns standarden SS-EN ISO 11133:2014 *Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media* med ett par tillägg ("Amendment"). Standarden behandlar kvalitetskontroll av mikrobiologiska odlingssubstrat och andra medier. Den förväntas att användas utifrån de olika specifika ISO-metodstandarderna för områdena dricksvatten- och livsmedelsmikrobiologi. Denna PM vill vara ett stöd och hjälpmedel för svenska laboratorier inom dessa analysområden. Här ges tolkningar av standardens syfte och intention, samt vägledning och alternativa tillvägagångssätt gällande substratkontroller till de som anges i standarden. De här beskrivna alternativa sätten baserar sig huvudsakligen på användande av referensmaterial.

Vid framtagandet av denna PM så har en grupp bestående av representanter från några svenska laboratorier deltagit som diskussionspartner och bollplank. Dessa anges i en bilaga sist i dokumentet. Dessutom har mikrobiolog Jonas Ilbäck från Livsmedelsverket bidragit administrativt såväl som med synpunkter och kommentarer. Här framförs ett tack till alla som har bidragit på olika sätt.

Huvudansvarig vid utarbetandet har varit undertecknad.

Livsmedelsverket, Biologiavdelningen

Tommy Šlapokas, Mikrobiolog

2022-03-10

Innehåll

Förord.....	3
Bakgrund	7
Inledning.....	8
Förslag på vad som behöver testas – delvis baserat på tolkning.....	10
Fysikalisk-kemisk kvalitetskontroll	10
Sterilkontroll.....	10
Allmänt om kvalitetstester av medier	10
Generellt.....	10
Testfrekvens och omfattning	11
Referensvärden	13
Stammar till inokulum	14
Substratkontroller i förhållande till andra interna kontroller – synergism	14
Kvalitetstester – fasta medier (kapitel 7).....	15
Kvantitativt test (koloniräkningsmedier)	15
Kvalitativt test (isoleringsmedier)	15
Kvalitetstester – flytande medier (kapitel 8-9)	16
Kvantitativt test (spädvätskor)	16
Kvantitativt test (transportmedier).....	16
Kvantitativt test (selektiva anrikningsbuljonger och MPN-buljonger).....	17
Kvalitativt test (selektiva anrikningsbuljonger och isoleringsmedier)	18
Referenser	20
Bilaga – Organisationer som deltagit vid utarbetandet	21

Bakgrund

För att mikrobiologiska analysresultat ska vara trovärdiga måste de använda metoderna vara kvalitets-säkrade. Det innebär att egna metoder måste vara validerade i olika avseenden och att förmågan att producera trovärdiga resultat med standardmetoder eller andra referensmetoder, där generell prestanda finns framtagen, måste vara verifierad. Både för att kunna utföra valideringar/verifieringar och för att kunna lita på resultat från rutinmässiga analyser måste det finnas en tillit till att använda substrat och andra medier är ändamålsenliga och ger förväntade och upprepningsbara analysresultat. Detta dokument handlar om kvalitetssäkring av olika medier när de används på mikrobiologiska laboratorier.

För att säkerställa att använda metoder levererar korrekta och likvärdiga resultat inom och mellan laboratorier så har standarden EN ISO 11133:2014 utarbetats vad gäller kontroll av olika medier. Den ger vägledning och riktlinjer till vad det är som ska kontrolleras och hur det bör göras. Standarden behandlar fasta medier för kvantifiering – där olika mått ska beräknas, fasta medier för kvalitativa analyser – där gradering av växt och utseende görs, såväl som olika flytande medier/vätskor för andra steg i analyskedjan.

För ISO-standardmetoder inom vatten- och livsmedelsmikrobiologi är ISO 11133 numera normerande. I äldre standarder framgår det inte men i ISO 11133 står vad som gäller för respektive äldre ISO-metod. I nyare metoder står ISO 11133 inskriven under "Normative references". Det innebär att den i princip är en obligatorisk del av den metodstandard referensen står i. I nyproducerade ISO-standarder införs dessutom i regel direkt information rörande mediekontroller, som motsvarar de i ISO 11133.

Inledning

Standarden ISO 11133:2014 är mycket omfattande. Den vänder sig till alla som på ett eller annat sätt tillverkar de medier som används tillsammans med ISO-standardmetoderna för mikrobiologiska vatten- och livsmedelsanalyser. Det gäller 1) kommersiella medietillverkare, 2) icke-kommersiella tillverkare som säljer till andra, såväl som 3) mikrobiologiska laboratorier som tillverkar medier åt sig själv. Här kommer endast att beröras de tester av olika kategorier medier (t ex olika tillverkningsbehov) som behöver utföras på ett enskilt mikrobiologiskt laboratorium.

Vad innebär standarden för oss? Ger den möjlighet till alternativa tillvägagångssätt? Vilka är då principerna som bör följas?

Dessa frågor är viktiga att ta i beaktande för att utföra tillräckliga men inte onödigt komplicerade kontroller. Trots att standarden är omfattande och ser ut att ställa specifika krav, så finns en del möjligheter att använda andra kontroller men likväl följa andan och principerna i standarden.

Förutom de krav/rekommendationer som anges i ISO 11133 så har ett, till viss del nytt, tänk och tillvägagångssätt på det enskilda laboratoriet klargjorts i den senaste versionen av ISO/IEC 17025 från 2018. I kapitel 8.5 "Åtgärder för hantering av risker och möjligheter" framgår under 8.5.1 att **laboratoriet ska beakta risker och möjligheter i syfte att förbättra möjligheterna att 1) uppnå syfte och mål och att generellt 2) åstadkomma förbättring**. I 8.5.2 sägs att laboratoriet ska **planera för åtgärder rörande hantering av dessa risker och möjligheter**. Enligt anmärkningarna till 8.5.3 kan åtgärderna innebära att **ta en risk i syfte att utnyttja en möjlighet**, där en möjlighet kan innebära att använda ny teknik eller **andra sätt för att möta (uppdragsgivarens) behov**.

I linje med detta nya betraktelsesätt föreslås i detta vägledningsdokument i vissa fall alternativa sätt, än de som i klartext ges som exempel i standarden ISO 11133, för att uppnå de mål och krav som den ställer upp. Dessa kommer att framgå vid beskrivningarna av kontrollerna som behöver göras för de olika medietyperna.

Inledningsvis anges här först en del textsammanhang från ISO 11133 som genom tolkningar öppnar för alternativa tillvägagångssätt. Tolkningar anges nedan med kursiv stil.

I "Introduction" till ISO 11133 står:

The establishment of widely accepted minimum performance criteria for media should lead to products with more consistent quality and thus *reduce the extent of testing necessary in the user's laboratory*.

Texten antyder klart intentionen att nödvändiga tester hos det analysutförande laboratoriet inte ska öka utan snarare minska genom att standardens principer tillämpas. *Tolkningen blir då att det måste innebära att mycket av testerna ska göras/ska ha gjorts av kommersiella tillverkare som levererar medier eller andra tillverkare som säljer till tredje part. Laboratorierna ska då behöva utföra endast en mindre verifierande del. Alternativt innebär det att laboratorier som själva inte har kapacitet att utföra standardens krav på tester blir hänvisade till att köpa färdigttestade substrat från andra (kommersiella) tillverkare. Detta senare kan inte ses som önskvärt och bör inte vara standardens intention eftersom det kan slå ut mindre laboratorier.*

Vidare står i "Introduction":

It is recommended that in the determination of the performance characteristics of a culture medium tests are carried out that conform with this international Standard.

Det tycks alltså vara en rekommendation att använda tester utifrån andan av standarden men tydligen inte absolut nödvändigt att den följs bokstavigt. I denna tolkning av "recommended" och "conform" bör man nog i alla fall se det som att någon form av tester ska utföras och att det är nödvändigt att använda standardens prestandakriterier.

I avsnittet "Scope" i ISO 11133 står:

These requirements are applicable to all categories of culture media prepared for use in laboratories performing microbiological analyses. ... microbiological laboratories preparing media for their own use.

"applicable to" innebär att de är tillämpliga för, "passar för" eller "går att använda för" eller mera strikt att de "gäller för". Den rimligaste tolkningen är nog att den sista varianten "gäller för" är mest korrekt. Det innebär i så fall att kraven ska följas men det anges inte exakt hur detta ska uppnås.

Enligt punkt 6.1 i standarden framgår:

- Standarden innehåller krav för **alla odlingsmedier** och för vilken batchstorlek som helst.
- Tester ska anpassas till det mediet ska användas till, såsom kvantitativa respektive kvalitativa bestämningar.
- Varje "batch" ska testas med relevanta tester före användande (om möjligt).

Vad är en "batch"? Enligt standardens definition kan en "batch" eller "lot" vara en definierad mängd av basprodukt ("bulk"), halvfärdig produkt eller slutprodukt som är likformig i formulering och kvalitet och som har producerats inom en definierad produktionsperiod och har tilldelats samma produktionsnummer.

Enligt texten är en "batch" ibland ett tillverkningsparti, ett "kok" på laboratoriet. Men en "batch" kan också vara en "lot" av en köpt medieburk eller t ex ett tillverkningsparti membranfilter. Vad en "batch" är måste alltså avgöras från fall till fall.

På sidan 9 i NMKL Procedure no. 10 (2017) används båda begreppen av "batch", men för olika nivåer av kontroll av mediet vid tillverkning av slutprodukt på det enskilda laboratoriet. Dels beskrivs under punkt 2 kontroller som gäller för "Every new batch" i meningen ett kommersiellt produktionsparti ("lot") med ett produktionsnummer. Dels beskrivs under punkt 3 kontroller som gäller för "Every batch of medium prepared in the laboratory" (ett "kok").

Den tolkning NMKL gjort gällande kontrollfrekvensen för de olika typerna av "ny produkt" respektive "batch" av produkt används delvis i detta dokument utifrån intentionerna i ISO/IEC 17025:2018 om **risker och möjligheter att uppnå syfte och mål samt åstadkomma förbättringar** gentemot det syfte som finns i ISO 11133 att "**reduce the extent of testing necessary in the user's laboratory**" (se nedan avsnittet där testfrekvens och omfattning behandlas).

Förslag på vad som behöver testas – delvis baserat på tolkning

Fysikalisk-kemisk kvalitetskontroll

Ska utföras genom kontroll av data, visuell kontroll eller mätning där det är relevant.

Ska enligt 6.2 utföras, där det är relevant, för att visa överensstämmelse med respektive använd metodstandard. Där det är möjligt räcker indirekt eller visuell kontroll av:

- vattenkvalitet vid tillverkning (tillagt utöver 6.2)
- volymer och medietjocklek
- generellt utseende, färg och jämnhet
- gelstyrka (kan hoppas över när det gjorts av ”certifierade tillverkare”)
- vätskeinhåll (vattenaktivitet)
- pH (ska alltid mätas)

Dessa kontroller beskrivs inte närmare här.

Sterilkontroll

Ska utföras på en representativ kvantitet beroende av batchstorleken.

Enligt 6.3.3 ska en representativ kvantitet, beroende på batchstorleken, testas för frånvaro av mikrobiell växt (sterilkontroll).

Sterilkontroller beskrivs inte närmare här.

Allmänt om kvalitetstester av medier

Generellt

Alla tester behöver inte utföras för varje tillverkningsparti ("kok") av medium, endast de som är relevanta för varje typ av medium samt ändamålet (kvalitativt, kvantitativt, med membranfilter etc.). Frekvensen bör kunna sänkas vid långvarig och väldokumenterad allmän QA vid laboratoriet.

Hur ska "alla odlingsmedier" testas? Detta är delvis öppet för tolkning.

Enligt punkt 6.4.1 beskrivs **exempel på** kvantitativa och kvalitativa testmetoder:

- När odlingsmediet ska användas för kvantifiering ska kvantitativa tester utföras.
- När metoden innefattar membranfilter (vattenanalyser) ska ISO 7704 användas, *d v s godkända filter ska inkluderas och användas vid testerna. För test av själva filtren krävs dock godkända*

medier och något utvidgad metodik. Det beskrivs här kortfattat (7.3) men kommer att beskrivas utförligare i en reviderad version av ISO 7704.

- **Testfrekvensen ska rättfärdigas** hos slutanvändaren **med beaktan av** beredningens omfattning och **nivån av övrig QA**.

Alla testmetoder måste alltså inte alltid användas. Det som anges är exempel. Det bör då också kunna vara rimligt att använda alternativa metoder.

Vidare gäller generellt enligt standarden:

- Mildare testkrav på "ready-to-use"-medier jämfört med egenproducerade (6.4.2-3).
- En mediebatch kan accepteras när både de allmänna och de mikrobiologiska kvalitetskriterierna är uppfyllda. *De allmänna kriterierna bör då avse utfallet på de fysikalisk-kemiska kontrollerna (färg, gelstyrka, pH, steriliseringstemperatur etc.) och sterilkontroller.*
- Medier och reagenser för konfirmering ska testas med relevanta positiva och negativa kontroller (6.6).

Testfrekvens och omfattning

Typ av medium, "certifikat", liksom behov av supplement styr – tillsammans med ändamålet – frekvens och omfattning av tester enligt Tabell 1 – när möjligt med beaktan av allmän QA.

Ur kvalitetssynpunkt hade det optimala varit att kontroller görs av varje producerat "kok" av substrat ("batch") och att processkontroller görs vid varje provansättning. Nödvändig testfrekvens – och omfattning enligt punkt 7.2.2.1.1 b) – kan dock anpassas utifrån nivån (omfattningen) av övrig QA vid laboratoriet och hos kommersiella substratleverantörer. *En god egen QA med relevanta indirekta kontroller (t ex sportester, vikt-/volymkontroller, tid och tempkontroller vid autoklivering; byte av luftfilter; arbete i laf-bänkar etc.) bör alltså kunna minska behovet och frekvensen av kontroller.*

Här anges med mindre typsnitt hur testerna tolkats på sidan 8-9 i NMKL Procedure no. 10 (2017). Den engelska texten är citat från proceduren och de kursiverade delarna är kommentarer.

Kvalitativ kontroll

"Qualitative control shall be carried out on every batch of culture medium that the laboratory purchases or prepares. This applies to all media used in the laboratory."

Kvalitativ kontroll ska enligt NMKL-proceduren utföras i det egna laboratoriet på varje färdigköpt medium eller "kok" av medium. Detta är "strängare" än vad ISO 11133 anger.

Kvantitativ kontroll

"Quantitative control" for media used for quantitative testing shall be carried out as a minimum after the following criteria:

1. "Ready-to use"-medier och medier tillverkade från dehydrerat pulver från ISO "9000"-certifierade producenter

"Control is carried out when a **new type** of medium is introduced into the laboratory and when **changing to a new manufacturer**."

De mildare kraven enligt 6.4.2-3 för "Ready-to-use"-medier tillämpas alltså här även för medier från dehydrerat pulver från ISO "9000"-certifierade producenter eller producenter som utfört analyser i för metoderna ackrediterat laboratorium som anger att de uppfyller ISO 11133:2014.

2. "Ready-to use"-medier och medier tillverkade från dehydrerat pulver från icke-ISO "9000"-certifierade producenter

"Every new batch of medium/powdered medium is controlled (one defined production lot with the same production number)."

Detta innebär att kvantitativa tester behöver göras endast när man tar i bruk en ny "lot" (nytt produktionsnummer) av köpt medium som inte är från ISO "9000"-certifierade producenter eller från sådana producenter som inte utför ackrediterade analyser och testar i enlighet med ISO 11133:2014.

3. Medier tillverkade från enskilda komponenter

"Every batch of medium **prepared in the laboratory** is controlled."

Principerna utifrån punkterna 6.4.2-4 i standarden sammanjämkas i denna vägledning i viss mån med de från NMKL Procedure no. 10 (2017). Tabell 1 sammanfattar vilka tester som behöver göras för olika substrat. **Kvantitativa kontroller behöver endast utföras när mediet ska användas för kvantifiering.**

Vid all tillverkning i det egna laboratoriet ska indirekt kontroll göras genom avläsning av relevant dokumentationen från tillverkningen (vattenkvalitet, pH, steriliseringstemperatur, spor-test, färg, gelstyrka, sterilkontroll etc.).

"Ready-to use"-medier och dehydrerade medier från ISO "9000"-certifierade producenter

Användaren ska försäkra sig om att tillverkaren har kvalitetssäkring för kontrollerna av sina produkter och upprättar certifikat enligt kraven i ISO 11133, *alltså att de är ISO "9000"-certifierade producenter eller producenter som utfört analyser i för metoderna ackrediterat laboratorium som anger att de uppfyller ISO 11133:2014.* Användaren ska granska tillverkarens dokumentation för att se att angivna acceptanskriterier är ändamålsenliga.

Endast sporadiska kvalitativa* och kvantitativa kontroller behöver göras med lämplig frekvens för att försäkra sig om att produkten fungerar som den ska efter leverans och nödvändig hantering på det egna laboratoriet, t.ex. smältning.

* Även den kvalitativa kontrollen kan uteslutas när, från tillverkaren kontrollerade och med certifikat försedda, "ready-to-use"-medier och dehydrerade medier används direkt utan tillsats av supplement.

Medier med tillsats av ett eller flera supplement för att öka selektivitet eller specificitet kan hanteras så att kvalitativ och vid behov kvantitativ kontroll (beroende på analysen) görs endast när det sker ett byte av "lot", antingen av basmediet eller av något av supplementen. När tidigare öppnade förpackningar används räcker det med att kontrollera att data från tillverkningen är korrekt.

"Ready-to use"-medier och dehydrerade medier från icke-ISO "9000"-certifierade producenter

Kvalitativa tester med indikativa stammar och indirekt kontroll av tillverkningsdata ska utföras vid varje tillverkning ("kok").

Kvantitativa tester behöver göras när man tar i bruk en ny "lot" (nytt produktionsnummer) av köpt medium och därefter endast sporadiskt med viss frekvens.

Medier tillverkade från enskilda komponenter (= lösa ingredienser)

Kvalitativa, och när relevant kvantitativa, tester ska göras för varje tillverkat "kok" på laboratoriet.

Kvantitativa tester behöver generellt endast utföras när mediet ska användas för kvantifiering; se dock även not 2b till Tabell 1

Tabell 1. Kontroller som enligt denna vägledning minst bör utföras för respektive färdigt substrat

Substrattyp		Tester ¹					
		Kvalitativa			Kvantitativa ²		
Bassubstrat	Supplement	Nytt ³ fabrikat	Ny ³ batch	Ej nytt ⁴	Nytt ³ fabrikat	Ny ³ batch	Ej nytt ⁴
Ready-to-use (ISO 9000 certif.)	Nej	*	*	—	*	*	—
	Ja	X	X	*	*	*	—
Dehydrerat (ISO 9000 certif.)	Nej	*	*	—	*	*	—
	Ja	X	X	*	*	*	—
Medier/substrat (ej ISO 9000 certif.)	Nej	X	X	X	X	X	*
	Ja	X	X	X	X	X	*
Enskilda ingredienser	Nej	X	X	X	X	X	X
	Ja	X	X	X	X	X	X

1 X: test vid varje tillverkning = "kok"; *: Sporadiska tester ska göras för att se att ev. förändringar efter leverans och hantering på lab., t.ex. smältning, inte påverkar utfallet; — : test krävs inte

2 Kvantitativt test behöver utföras a) generellt endast när kvantifiering ska göras och dessutom b) vid kvalitativa tester när enskilda ingredienser används, åtminstone när någon ny "burk" öppnas

3 Nytt fabrikat respektive Ny batch gäller bassubstrat, enskilda ingredienser och/eller supplement

4 Ej nytt innebär att substratet har använts till tidigare "kok" utan anmärkning

Referensvärden

Det finns tre olika sätt att testa aktuellt medium emot:

1. Referensmedium (beskrivs i standarden, inte i detta dokument)
2. Äldre godkänd "batch" (beskrivs i standarden, inte i detta dokument); *utbytet på "1:a" godkända batchen bör då ha testats mot referensmedium*
3. Referensvärde för referensmaterial (RM)

I samtliga fall kan kvantitativ bedömning av **produktivitet** eller motsvarande göras, samtidigt som kvalitativ bedömning av storlek (inkl. **selektivitet**: hämning av icke målorganism) respektive utseende (inkl. **specificitet**: typiskhet) kan göras.

Det krångligaste sättet är att använda ett referensmedium, vilket därför kan vara önskvärt att minimera. En äldre godkänd "batch" (t ex den senast föregående) kan däremot fungera bra liksom RM.

Stammar till inokulum

Flerstams-referensmaterial rekommenderas när det finns att tillgå, för att regelmässigt slippa använda referensmedium och uppodling av separata stammar

För samtliga tillvägagångssätt krävs lämpliga testorganismer. Dessa kan vara:

- a. enskilda (egna eller köpta) stammar som förvaras frysta men tinas och späds vid användning
- b. RM bestående av enskilda stammar (enstams-RM)
- c. RM bestående av flera stammar (flerstams-RM)

Om referensmedium ska användas som jämförelse är enskilda stammar lämpligt. I jämförelse med äldre godkänd "batch" kan enskilda stammar eller flerstams-RM användas. Om man vill komma ifrån användandet av referensmedium är RM det enklaste alternativet. *För att, när det är möjligt, slippa att hantera jämförelseprov för olika stammar parallellt är då flerstams-RM lämpligast.*

Flerstams-RM är därför det som rekommenderas när det är möjligt att använda. *Tills det finns lämpliga flerstams-material med stammar som anges i ISO 11133 bör väl utprovade flerstams-RM med andra stammar kunna användas.*

Substratkontroller i förhållande till andra interna kontroller – synergism

Varje laboratorium som är ackrediterat måste utföra olika typer av interna kontroller. Det kan t ex vara som laboranterns **kompetenskontroller** eller **processkontroller** vid rutinmässig provansättning (negativa och – vid behov kvantitativa – positiva kontroller) såväl som **substratkontroller**. Dessa ansättningar görs med någon sorts frekvens eller regelbundenhet. För odlingsmetoder används i många fall referensmaterial (RM) men också andra typer av processkontroller såsom enskilda kontrollstammar.

Genom att åberopa andan i standarderna ISO 11133 – *som hävdar att arbetsbördan för det enskilda laboratoriet bör bli mindre genom bra allmän QA och substratkontroller* – och i ISO/IEC 17025:2018 – där man ska beakta risker och möjligheter – bör man kunna ha flera syften med en del av de interna kontrollerna. Om *substratkontroller* görs med t ex RM bör de kunna användas även som *kompetenskontroller* och i många fall även som *processkontroller (positiv- och negativkontroller)* eller *omvänt. Stammar från RM kan ofta hållas levande några dagar till processkontroller.*

Att kontroller ska utföras enligt principerna i ISO 11133 innebär att ansättning av RM eller egna kulturer – ofta måste utföras med t ex **duplikat eller triplikat** för att erhålla tillräckligt antal målkolonier att räkna (ca 100 stycken) för att en platta inte ska bli svårräknad. *För vissa analyser är 50 kolonier på en platta/membranfilter för mycket, varför lägre antal måste väljas.*

En möjlighet eller förbättring, utifrån andan i ISO/IEC 17025:2018, är alltså att använda kontroller för mer än ett syfte. Användande av replikat i sin QA kan dessutom utnyttjas även för andra syften – såsom till delar av mätosäkerhet – än enbart till substratkontroller, vilket kan bli en positiv sideeffekt.

Kvalitetstester – fasta medier (kapitel 7)

Alternativt tillvägagångssätt till standardens med användande av flerstams-RM

Beskrivningarna är utifrån användande av flerstams-RM när det är möjligt.

OBS, för medier som är "Ready-to-use"/"Gjort utifrån hydrerat pulver" med dugligt certifikat (se sidan 12) behöver tester inte utföras mer än sporadiskt enligt tabell 1.

Kvantitativt test (koloniräkningsmedier)

Utifrån tabell E.1 för livsmedelsmetoder och tabell F.1 för vattenmetoder anges att *Produktivitet* ska bestämmas **kvantitativt** medan *Selektivitet* (och i vissa fall *Specificitet*) ska bestämmas **kvalitativt**.

Produktivitet

Målorganismen/erna utvärderas. Kvantitativ test ska utföras enligt tabellerna E.1 och F.1.

- Duplikat eller triplikat måste ofta ansättas för att få tillräckligt med kolonier (ca 100 cfu) utan att överskrida lämpligt antal att räkna på plattan. Totalsumman används.
- Koloniutseende för målorganismer som räknas ska bedömas – ska vara typiskt (*foton från godkänd mediebatch kan användas*).
- *Erhållet antal kan enligt 7.2.2.2 jämföras med förväntat värde för aktuellt RM (ska hamna inom laboratoriets egna 2s för singelvärden, duplikat eller triplikat) istället för toleransintervall för produktivitet.*

Selektivitet/Specificitet

Icke-målorganismerna utvärderas. Kvantitativ test av selektivitet är inte möjlig eftersom flera bakgrundsstammar ingår i flerstams-RM. Är heller inte nödvändig enligt tabellerna E.1 och F.1. Endast kvalitativt test behöver utföras enligt dessa.

- Koloniutseende av icke-målorganismerna bedöms – ska vara hämmade eller inte växa alls (selektivitet) och/eller atypiska (specificitet). *Foton från godkänd mediebatch kan användas.*

Kvalitativt test (isoleringsmedier)

OBS! Vissa medier är både koloniräkningsmedier och isoleringsmedier. Om båda metoderna används parallellt räcker det med de kvantitativa testerna enligt not j till annex E (se föregående avsnitt).

Står inget i standarden just i detta avsnitt (7.4) om att RM kan användas. *Bör dock principiellt kunna användas även här.*

- Använd en platta med testmedium.
- Bedöm växt utifrån en tregradig skala (0, 1, 2).
 - målorganismer ska ha bra växt (2) och typiskt utseende (*Produktivitet*)
 - andra organismer ska uppträda atypiskt (*Specificitet*)
 - icke-målorganismer ska vara helt eller delvis inhiberade, (0, 1; *Selektivitet*)

Kvalitetstester – flytande medier (kapitel 8-9)

Alternativt tillvägagångssätt till standardens med användande av RM

Beskrivningarna är utifrån användande av flerstams-RM där det är möjligt.

OBS, för vätskor eller buljonger som är "Ready-to-use"/"Gjort utifrån hydrerat pulver" med dugligt certifikat (se sid. 12) behöver tester inte utföras mer än sporadiskt enligt tabell 1.

Kvantitativt test (spädvätskor)

För flytande medier behövs kvantitativt mått endast för spädvätskor enligt tabellerna E.1 och F.1. För spädvätskor kan metoden i 9.2 tillämpas. Lämpliga RM att använda är t ex Food 20xx:12 respektive Dw 20xx:A. Det är totalantalet kolonier som växer fram som ska räknas.

- A. Lös upp ett RM i lämplig volym spädvätska som ska testas så att koncentrationen ca 10^3 cfu/ml * erhålls av de organismer som växer ut på icke-selektivt referensmedium under rimlig tid. Kan vid behov vara mycket liten volym, t ex 5-15 ml.
- B. Efter upplösning och omblandning (ca 5 min = tid t_0):
 1. Överför omedelbart 0,1 ml * från spädvätskan till en agarplatta med icke-selektivt referensmedium alternativt till en tom petriskål och gjut in.
 2. Starta inkuberingen omedelbart, t ex vid 22 eller 30 °C under ca 72 timmar (tid t_0).
 3. Håll resten av spädvätskan under test vid rumstemperatur under ytterligare 45 minuter och överför på nytt 0,1 ml * av vätskan till en platta med icke-selektivt referensmedium.
 4. Starta inkuberingen omedelbart, t ex vid 22 eller 30 °C under ca 72 timmar (tid t_1).
- C. Räkna kolonierna från plattor inkuberade vid t_0 respektive t_1 . Antalet vid t_1 får inte avvika mer än $\pm 30\%$ av det vid t_0 .

* *Ingjutning som det normalt för dricksvattenanalyser måste alternativt kunna användas. Då kan det alternativt vara tillräckligt med en koncentration av 10^2 cfu/ml om volymen 1 ml överförs till ingjutning.*

Kvantitativt test (transportmedier)

Är inte aktuellt för dricksvattenanalyser. Om svabbar eller dylikt används, se särskild procedur.

Lämpliga RM att använda är det som närmast motsvarar analysen i fråga.

T ex RM Food P-LE innehåller ca $1,8 \log_{10}$ cfu/ml ≈ 60 cfu/ml av *Listeria monocytogenes* vid upplösning i 100 ml spädvätska. Motsvarar ca 1200 cfu/ml med upplösning i 5 ml spädvätska.

- A. Lös upp ett RM i lämplig volym tidigare godkänd spädvätska.
- B. Ympa en testportion av transportmedium (t ex 10 ml) med en lämplig testorganism genom att föra över 10^3 till 10^4 celler (i t ex 1 eller 0,1 ml) till varje testportion (rör) om 10 ml.
 1. Ta omedelbart ut 0,1 ml prov efter omblandning och sprid ut på ytan av ett fast icke-selektivt referensmedium (tid t_0).

2. Inkubera både transportmediet och det fasta referensmediet under relevanta förhållanden utifrån respektive specifik standardmetod (t ex 25 °C, 5 dygn för transportmediet och 30 °C, 3 dygn för referensmediet).
 3. Ta därefter på nytt ut 0,1 ml prov från det inokulerade transportmediet efter omblandning och sprid ut på ytan av ett fast icke-selektivt referensmedium (tid t_1).
 4. Inkubera referensmediet under samma tid som vid första utstryket.
- C. Räkna kolonierna från plattor inkuberade vid t_0 respektive t_1 . Antalet vid t_1 får inte avvika mer än $\pm 30\%$ av det vid t_0 .

Kvantitativt test (selektiva anrikningsbuljonger och MPN-buljonger)

Vare sig enligt tabell E.1 eller F.1 och inte heller enligt tabell J.1 behöver kvantitativa test utföras med anrikningsbuljonger.

Enligt tabell J.1 ska däremot kvantitativ test göras för MPN-buljonger ("enumeration broths") men detta anges trots detta inte i tabellerna E.1 och F.1 – mer än för Colilert i F.1. *Att kvantitativa test ska göras är dock rimligt eftersom sådana tester ska göras vid kvantifiering enligt avsnitt 6.4.1.* Här beskrivs ett alternativ till proceduren under 8.2 med användande av flerstams-RM. *Flera enstams-RM kan vara lättare att använda.* Då kan standardens beskrivning användas.

- A. Plocka ut ett representativt antal rör med selektivt medium för test.
- B. Lös upp ett relevant RM innehållande målorganism och icke-målorganismer i en bestämd mängd spädningssväska (= spädning 0) för att erhålla 1000-1500 cfu/ml (= 100-150 cfu/ 0,1 ml) av målorganismen utifrån känd halt i använt RM. Gör vid behov en spädningsserie i 2-, 5- eller 10-steg från det upplösta provet för att erhålla ett rör med denna koncentration.
 1. Gör i ordning rör med 10-spädningar i ytterligare minst fyra steg för att med säkert nå halten noll av bakgrundsorganismer i högsta spädningen ("utspädning till noll").
 2. Använd sen spädningsserien inom en fastställd tid (max 30 min). Överför en bestämd volym från noll-provet och spädningarna, t ex 0,1 ml till ytan på både en **icke-selektiv platta** (både målkolonier och bakgrund växer) och en **selektiv platta** (för att kunna kvantifiera målkolonier som är de enda som växer bra och är typiska där).
 3. Inkubera under relevant atmosfär, tid och temperatur för respektive organism.
 4. Räkna antalet kolonier från den minsta spädningen som uppvisar upp emot 150 målkolonier på den selektiva plattan och kolonierna på åtminstone de två närmast högre (mer utspädda) spädningstegen på både selektiva och icke-selektiva plattor.
- C. Ta fram lika många rör för det flytande mediet under test som i serien ovan.
 1. Använd rören under B – om samma pipett används, börja med det mest utspädda röret – och ympa en bestämd volym t ex 0,1 ml från varje rör till det **selektiva mediet under test**.
 2. Inkubera rören under de förhållanden som gäller enligt ISO-metoden.

3. Ta efter inkubering en för varje rör ny 10 µl steril plastögla och stryk ut på både en icke-selektiv platta och en **selektiv platta** (endast målkolonier växer bra).
 4. Inkubera under relevant atmosfär, tid och temperatur för respektive organism.
 5. Bestäm för respektive platta växt eller inte växt efter inkuberingen.
 6. Kontrollera om det finns spädningssteg där annat än målkolonierna växer på den icke-selektiva plattan. Notera i så fall detta.
- D. Produktiviteten P_R för den selektiva buljongen är tillfredsställande om bra växt (minst 10 cfu från en 10 µl ögla) av målorganismen erhålls från det selektiva mediet från spädningen som gett färre än 100 cfu per 0,1 ml (= 10 cfu per 10 µl) på selektivt medium.
- E. Selektiviteten S_F bestäms som differensen av det högsta spädningssteget (mest utspädda, t ex steg 3) som ger bra växt (≥ 10 cfu) av icke målorganismen på den **icke-selektiva plattan** under B och det högsta spädningssteget (mest utspädda) efter odling i den selektiva testbuljongen under C som ger frånvaro av bakgrundsväxten (eller < 10 cfu) på den **icke-selektiva plattan**, t ex steg 1. Vid beräkningen måste först antalet målorganismer från de selektiva plattorna med motsvarande spädningsgrader subtraheras (nödvändigt p g a att de växer fram och ingår i totalfloran).

Kvalitativt test (selektiva anrikningsbuljonger och isoleringsmedier)

Här beskrivs ett alternativ till proceduren under 8.3 med användande av flerstams-RM.

- A. Plocka ut ett representativt antal rör eller 10 ml portioner av buljonger från varje mediebatch som ska testas.
- B. Lös upp ett relevant RM innehållande målorganism och icke-målorganismer i en bestämd mängd spädningsvätska (spädning 0).
 1. Gör en spädningsserie från det upplösta provet tills högsta spädning innehåller ≤ 100 målorganismer. Antalet av icke-målorganismer ska samtidigt vara ≥ 1000 . För över 0,1 ml från den spädningen till rören som ska testas.
 [T ex RM Food P-CS innehåller ca $2,7 \log_{10}$ cfu/ml ≈ 500 cfu/ml av *Campylobacter jejuni* vid upplösning i 100 ml spädningsvätska. 0,1 ml innehåller då ca 50 cfu vilket är lämplig mängd att ympa till ett teströr om 10 ml. Samtidigt tillförs röret då ca 50 cfu av *Salmonella* Enteritidis och $5,7/10 \log_{10}$ cfu/ml $\approx 5,0 \times 10^4$ cfu/ml av annan bakgrundsflora, vilket är i enlighet ISO 11133. För *Salmonella* gäller motsvarande på medier för den organismen.]
 2. Inkubera rören under de förhållanden som gäller enligt ISO-metoden.
 3. Överför med en ögla 10 µl till en platta med för målorganismen selektivt medium och till en lämplig platta med icke-selektivt medium och fördela (rackla ut).
 4. Inkubera plattorna under de förhållanden som gäller enligt ISO-metoden.
- C. **Produktiviteten** av mediet under test är tillfredsställande om god växt (minst 10 cfu eller sammanhängande växt runt utstryket) erhålls av målorganismen på plattan med det specifika mediet för målorganismen.

D. **Selektiviteten** av mediet under test är tillfredsställande om ingen växt (eller <10 cfu) erhålls av icke-målorganismerna på den icke-selektiva agarplattan. Antalet av målorganismerna behövs då också för att först kunna räkna bort dessa.

Referenser

ISO 11133:2014 (= SS-EN ISO 11133:2014). Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media.

ISO/IEC 17025:2018 (= SS-EN ISO/IEC 17025:2018). General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.

ISO 7704:1985 (= SS 02 81 05, utg. 1). Utvärdering av membranfilter för mikrobiologiska vattenanalyser.

(Inom ISO håller en ny, reviderad version på att tas fram som följer principer och mått i ISO 11133.)

NMKL Procedure No. 10. 2017. Quality control of microbiological culture media.

Bilaga – Organisationer som deltagit vid utarbetandet

Vid utarbetandet av detta dokument har en grupp bestående av representanter från svenska privata och kommunala laboratorier deltagit. Ett antal möten har hållits och för övrigt har korrespondens skett via epost. Livsmedelsverket har skrivit utkastet och presenterat för deltagarna som har fått lämna synpunkter. Swedac har tillsänts skrivelsen för att kunna lämna synpunkter. Nedanstående organisationer har, förutom Livsmedelsverket, deltagit som samtalspartner och bollplank.

- **Eskilstuna Strängnäs Energi & Miljö**, Hyndevads Vattenverk, Laboratoriet, Eskilstuna
- **Göteborgs stad**, Kretslopp och vatten, Dricksvattenproduktion, laboratoriet, Göteborg
- **SGS Analytics Sweden AB** (tidigare SYNLAB Analytics & Services Sweden AB), Linköping
- **Uppsala Vatten och Avfall AB**, Vattenlaboratoriet, Uppsala
- **VASYD Bulltofta vattenverk**, Dricksvattenlaboratoriet, Malmö

