

Mikrobiologi - Livsmedel

April 2015



Utgåva
Version 1 (2015-05-28)

Ansvarig utgivare
Hans Lindmark, avdelningschef, Biologiavdelningen, Livsmedelsverket

Programansvarig
Laurence Nachin, mikrobiolog, Biologiavdelningen, Livsmedelsverket

KP April 2015 har diarienummer 2015/06123 vid Livsmedelsverket.

Kompetensprovning
Mikrobiologi – Livsmedel
April 2015



Kvantitativa analyser

- Aeroba mikroorganismer, 30 °C
- Psykrotrofa mikroorganismer
- Enterobacteriaceae
- *Escherichia coli*
- Presumtiv *Bacillus cereus*
- Koagulaspositiva stafylococker
- Mjölksyrabakterier
- *Clostridium perfringens*
- Anaeroba sulfitereducerande bakterier
- Aeroba mikroorganismer i fiskprodukter, 20-25 °C
- Vätesulfidproducerande bakterier i fiskprodukter
- Jäst
- Mögel

Förkortningar

Substrat

BA	Blodagar
BcsA	Bacillus cereus selektiv-Agar
BP	Baird Parker-agar
DG 18	Dichloran-Glycerol-agar
DRBC	Dichloran-Rosbengal kloramfenikol-agar
JSA	Järnsulfit-agar
MPCA	Milk Plate Count-agar
MPN	Most Probable Number
MRS	de Man, Rogosa and Sharpe-agar
MRS-aB	de Man, Rogosa and Sharpe-agar med amphotericin
MRS-S	de Man, Rogosa and Sharpe-agar med sorbinsyra
MYP	Mannitol-egg Yolk-Polymyxin agar/Mossel agar
OGYE	Oxytetracyklin-Glukos-Jästextrakt agar
P	Polymyxin
PCA	Plate Count-agar
RPF	Rabbit Plasma Fibrinogen
SFP	Shahidi Ferguson Perfringens-agarbas
TBX	Trypton-galla-X-glukuronid-agar
TGE	Trypton Glukos Extract agar
TSA	Trypticase-Soja-Agar
TSC	Tryptos-Sulfit-Cykloserin-agar
VRG	Violettröd-Galla-agar
VRGG	Violettröd-Galla-Glukos-agar
YGC	Jästextrakt-Glukos-kloramfenikol-agar

Organisationer

IDF	International Dairy Federation
ISO	International Organization for Standardization
NMKL	Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler
SLV/NFA	Livsmedelsverket/National Food Agency, Sweden

Innehåll

Allmän information om utvärdering av resultaten	4
Analysresultat från provtillfället april 2015	5
- Generellt utfall	5
- Aeroba mikroorganismer, 30°C	6
- Psykrotrofa mikroorganismer	7
- Enterobacteriaceae och <i>Escherichia coli</i>	8
- Presumtiv <i>Bacillus cereus</i>	10
- Koagulaspositiva stafylococker	10
- Mjölksyrabakterier	11
- <i>Clostridium perfringens</i> och anaeroba sulfitereducerande bakterie	12
- Aeroba mikroorganismer i fiskprodukter, 20-25 °C	14
- Vätesulfidproducerande bakterier i fiskprodukter	14
- Jäst	15
- Mögel	15
Utvalda fall av enskilda laboratoriers analysresultat – bedömning	17
- Boxdiagram	18
Testmaterial och kvalitetskontroll	23
- Test material	23
- Kvalitetskontroll	24
Referenser	25
Bilaga 1 – Deltagarnas analyssvar	
Bilaga 2 – z-värden	

Allmän information om utvärdering av resultaten

Statistisk utvärdering av resultaten

Värden som ligger utanför en strikt normalfördelning identifieras som extremvärden (Grubbs' test med modifiering av Kelly (1)). I en del gränsfall görs subjektiva justeringar för att sätta rätt gräns utifrån den kunskap som finns om innehållet i blandningarna. Falska svar och extremvärden inkluderas inte i beräkningarna av medelvärden och standardavvikelser. Resultat som har rapporterats "> värde" kan inte utvärderas. Resultat som rapporterats "< värde" betraktas som noll (negativt utfall). Alla rapporterade resultat finns i bilaga 1.



Enligt EN ISO/IEC 17043, som Livsmedelsverkets kompetensprovningar är ackrediterade mot, är det obligatoriskt för deltagande laboratorier att rapportera metodinformation för alla analyser som de rapporterar analys svar för. Metoduppgifterna kan vara svåra att tolka, eftersom flera laboratorier t.ex. har uppgivit substrat, som skiljer från vad den refererade standarden anger. Jämförelser uppdelade efter metod- eller substratval presenteras i anknytning till analysresultaten.

Mätosäkerhet för åsatt värde

Mätosäkerhet för ett åsatt värde beräknas som standardavvikelsen från provomgången dividerat med kvadratroten ur antal korrekta svar. Åsatt värde är medelvärdet av deltagarnas resultat för en parameter.




Förklaringar till tabeller och figurer

Tabeller

n	antal laboratorier som utförde analysen
m	medelvärde av deltagarnas resultat i \log_{10} cfu/ml (falska och extrema värden ingår inte)
s	standardavvikelse av deltagarnas resultat (falska och extrema värden ingår inte)
F	antal falskpositiva eller falsknegativa resultat
<	antal låga extremvärden
>	antal höga extremvärden
	totalt resultat för analysen
	värden som diskuteras i text

Figurer

Frekvensdiagram visar fördelningen av deltagarnas resultat för var blandning. Analysens medelvärde anges ovanför staplarna.

-  värden inom accepterat intervall (bilaga 1)
-  extremvärden
-  falsknegativa resultat
- * värden utanför X-axelns intervall

Analysresultat av provtillfälle april 2015

Generellt utfall

Provmaterial sändes ut till 188 laboratorier, varav 45 i Sverige, 125 i övriga Europa och 18 laboratorier i övriga världen. Av de 187 laboratorier som rapporterade utvärderade svar hade 135 (72 %) minst ett analys svar med anmärkning. Vid det senaste provtillfället med ungefär samma parametrar (april 2014) var andelen 81 %.

Individuella resultat för varje analys visas i bilaga 1 och finns även på hemsidan efter inloggning www2.slv.se/absint.

Tabell 1: Blandningsinnehåll och % av avvikande resultat (F%: falsksvar, Ext: extremvärden).

	Blandning A			Blandning B			Blandning C		
% deltagare med 									
Organismer	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Penicillium verrucosum</i>			<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Staphylococcus warneri</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Shewanella putrefaciens</i>			<i>Micrococcus sp.</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Staphylococcus aureus</i>		
Analys	Målorganism	F%	Ext	Målorganism	F%	Ext	Målorganism	F%	Ext
Aeroba mikroorg. 30 °C	<i>L. plantarum</i> <i>E. coli</i>	0	3	<i>A. hydrophila</i> <i>S. warneri</i> <i>S. aureus</i> <i>S. putrefaciens</i>	0	6	<i>Micrococcus</i> <i>S. aureus</i>	0	3
Psykrotropha microorganismer	<i>L. plantarum</i> <i>E. coli</i> <i>P. verrucosum</i>	46	0	<i>A. hydrophila</i> <i>S. warneri</i> <i>S. aureus</i> <i>S. putrefaciens</i>	47	0	<i>Micrococcus</i> <i>S. aureus</i>	0	0
Enterobacteriaceae	<i>E. coli</i>	1	5	(<i>A. hydrophila</i>)	43	-	<i>E. coli</i>	1	5
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	0	6	-	2	-	<i>E. coli</i>	3	8
Presum. <i>B. cereus</i>	-	1	-	(<i>A. hydrophila</i>)	14	-	<i>B. cereus</i>	2	1
Koagulaspositiva stafylokokker	-	0	-	(<i>S. warneri</i>) <i>S. aureus</i>	7	14	<i>S. aureus</i>	2	4
Mjölksyrabakterier	<i>L. plantarum</i>	0	4	-	11	-	-	29	-
<i>C. perfringens</i>	-	0	-	<i>C. perfringens</i>	3	3	-	3	-
Anaerob. sulfited.	-	0	-	<i>C. perfringens</i>	0	1	-	3	-
Aeroba mikroorg. i fiskprodukter	<i>L. plantarum</i> <i>E. coli</i>	0	0	<i>A. hydrophila</i> <i>S. warneri</i> <i>S. aureus</i> <i>S. putrefaciens</i>	0	3	<i>Micrococcus</i> <i>S. aureus</i>	0	19
H ₂ S-prod. bakterier i fiskprodukter	-	0	-	<i>S. putrefaciens</i>	3	7	-	0	-
Jäst	<i>K. marxianus</i>	10	10	-	3	-	-	3	-
Mögel	<i>P. verrucosum</i>	4	6	-	2	-	-	3	-

-:saknar målorganism; (mikroorganism):falskpositiv före konfirmering

Aeroba mikroorganismer, 30 °C

Blandning A

I blandning A förekom stammar av *Lactobacillus plantarum* och *Escherichia coli* i de högsta koncentrationerna och utgjorde därför de flesta kolonierna på plattorna.

Blandning B

Aeromonas hydrophila, *Shewanella putrefaciens*, *Staphylococcus warneri* och *Staphylococcus aureus* var målorganismer i analysen.

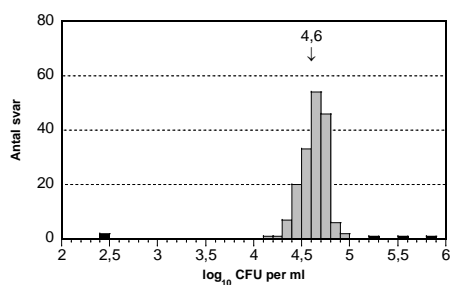
Blandning C

I blandning C förekom stammar av *Micrococcus sp.* och *Staphylococcus aureus* i de högsta koncentrationerna och utgjorde därför de flesta kolonierna på plattorna.

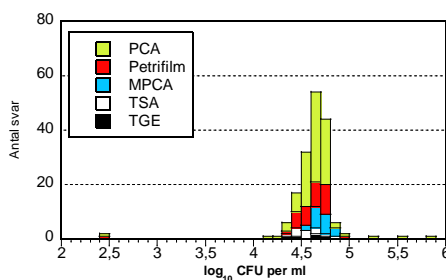
Resultat från analys av aeroba mikroorganismer

Substrat	Blandning A						Blandning B						Blandning C					
	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>
Alla svar	175	4,62	0,13	0	2	3	175	4,78	0,13	0	6	4	174	4,82	0,13	0	3	2
PCA	96	4,62	0,13	0	1	3	96	4,77	0,13	0	3	3	96	4,82	0,12	0	2	2
Petrifilm™	36	4,62	0,13	0	1	0	36	4,82	0,13	0	2	1	35	4,83	0,13	0	1	0
MPCA	20	4,69	0,08	0	0	0	20	4,78	0,11	0	1	0	20	4,84	0,12	0	0	0
TSA	11	4,57	0,13	0	0	0	11	4,78	0,11	0	0	0	11	4,80	0,17	0	0	0
TGE	5	4,55	0,15	0	0	0	5	4,70	0,11	0	0	0	5	4,74	0,12	0	0	0

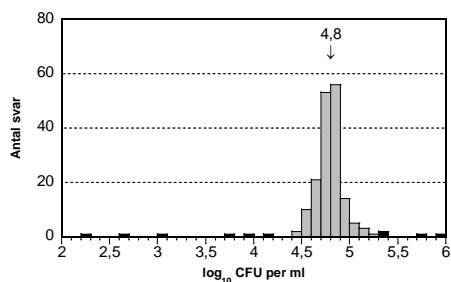
A



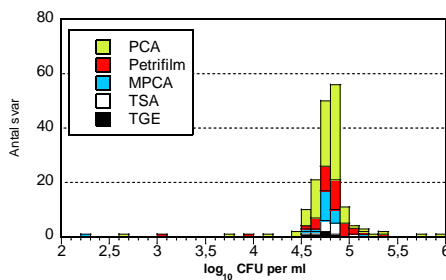
A



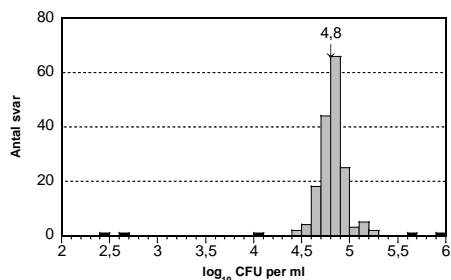
B



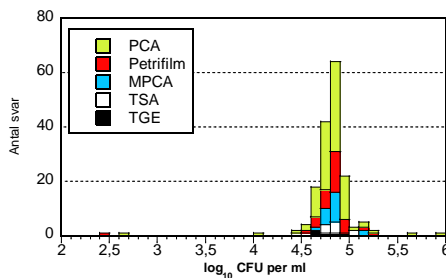
B



C



C



Det finns ingen tydlig skillnad i resultaten som beror på vilket substrat som användes.

Psykrotrofa mikroorganismer

Blandning A

Vid kontroll av blandning A, bildade *Penicillium verrucosum* kolonier i PCA efter inkubering i 10 dygn vid 6,5°C. Kolonierna var mycket små och lupp användes för avläsning av plattor. Detta kan förklara en del av de rapporterade falsknegativa resultaten.

Blandning B

Mikroorganismer i blandning B kan växa vid temperaturer lägre än 30°C. Efter inkubering vid 6,5°C i 10 dygn var dock kolonierna mycket små och svåra att räkna utan lupp. De flesta av laboratorerna som rapporterade ett falsknegativt resultat utförde inkubering vid 6,5°C eller 7°C.

Blandning C

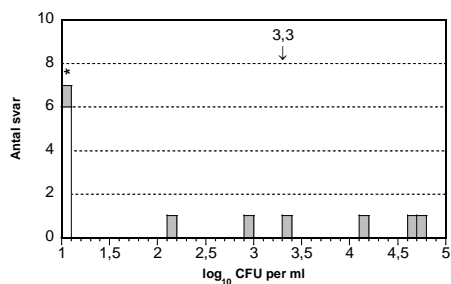
Efter inkubering i 10 dygn vid 6,5°C, observerades ingen växt på PCA vid kvalitetskontroll av blandningen. Samma resultat erhöles av laboratorerna som utförde inkubering vid 6,5°C eller 7°C. Vid högre inkuberingstemperatur kan dock mikroorganismer som finns i blandning C växa. Därför bör både negativa resultat och beräkningar av cfu betraktas som korrekt för denna analys. Detta leder till en mycket hög standardavvikelse för resultaten.

Resultat från analys av psykrotrofa mikroorganismer

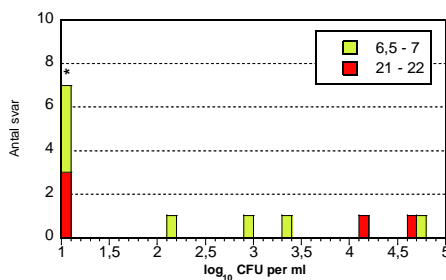
T°C	Blandning A					Blandning B					Blandning C				
	n	m*	s	F	< >	n	m*	s	F	< >	n	m*	s	F	< >
Alla svar	13	3,30	1,38	6	0 0	15	3,08	0,90	7	0 0	12	1,49	2,05	0	0 0
6,5 - 7	8	4,16	-	4	0 0	10	2,87	-	6	0 0	7	0	-	0	0 0
21 - 22	5	3,11	-	2	0 0	5	3,14	-	1	0 0	5	3,42	-	0	0 0

*: median

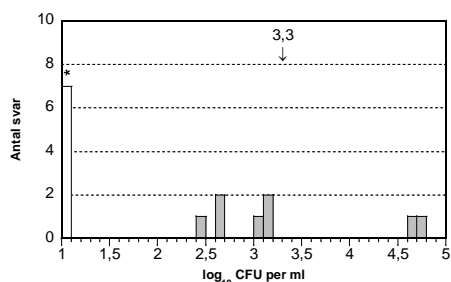
A



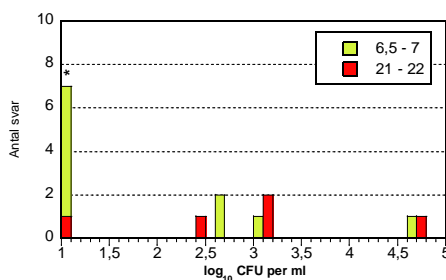
A

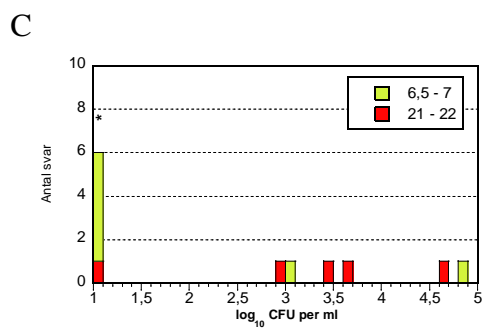
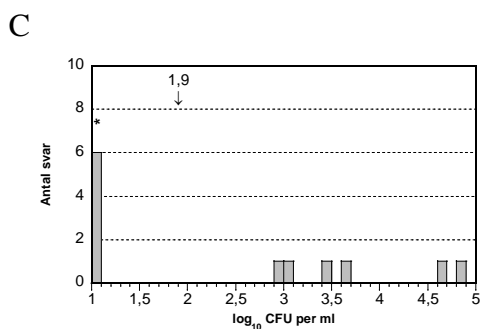


B



B





På grund av att få resultat rapporterades, presenteras medianvärde istället för medelvärde i tabellen. Dessutom beräknades inga standardavvikelser för gruppering av resultat efter inkuberingstemperatur. Nästan alla laboratorier använde PCA eller MPCA som substrat men tid och temperatur av inkubering varierade beroende på använd metod. NMKL 86:2013 ersätter NMKL 74:2000 (17°C / 20 tim + 7°C / 3 dygn) och föreslår inkubering vid 6,5°C / 10 dygn eller 17°C / 20 tim + 7°C / 3 dygn. Det finns tre olika ISO metoder för analys av psykrotrofa mikroorganismer: ISO 1741:2001 föreslår inkubering vid 6,5°C / 10 dygn och ISO 6730:2005 och ISO 8552:2004, både specifika för mjölk, föreslår inkubering vid 6,5°C / 10 dygn, respektive 21°C / 24 tim. Dessa skillnader återspeglar skiftande definitioner för psykrotrofa mikroorganismer som olika laboratorier har, vilket även gör det svårt att statistiskt utvärdera resultaten.

Enterobacteriaceae och *Escherichia coli*

Blandning A

En stam av *Escherichia coli* var målorganism för båda analyserna.

Blandning B

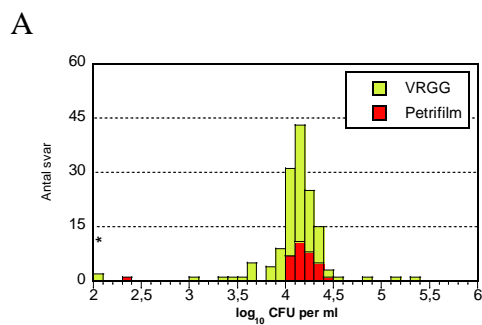
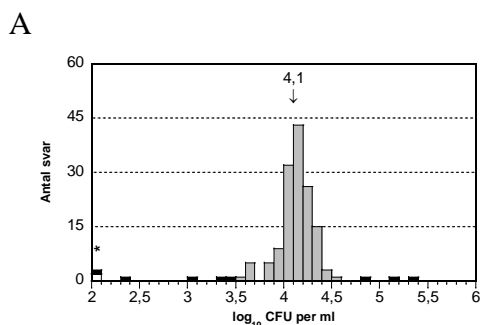
Trots att blandning B inte innehöll någon målorganism för dessa analyser var 64 rapporterade resultat falskpositiva (av 150 svar). Stammen av *Aeromonas hydrophila*, som fanns i blandningen, bildar röda kolonier på VRGG men är oxidaspositiv och kan därmed särskiljas från enterobacteriaceae som är oxidasnegativa.

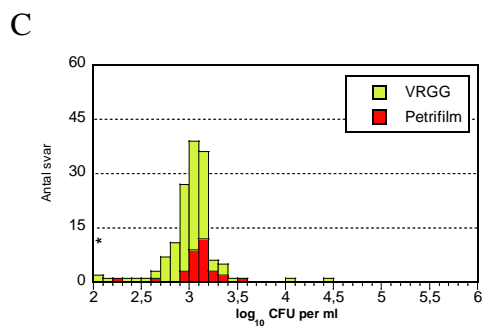
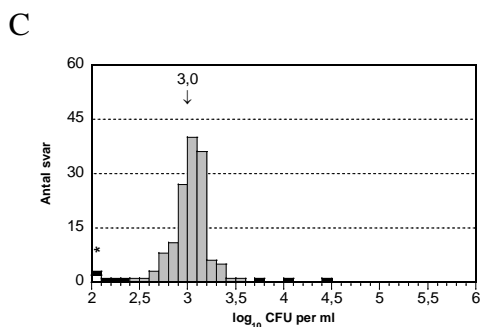
Blandning C

En stam av *Escherichia coli* var målorganism för dessa analyser.

Resultat från analys av Enterobacteriaceae

Substrat	Blandning A						Blandning B						Blandning C					
	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>
Alla svar	150	4,12	0,16	2	5	3	150	-	-	64	-	-	149	3,02	0,17	2	4	3
VRGG	113	4,11	0,17	1	4	3	112	-	-	36	-	-	113	3,00	0,16	1	3	2
Petrifilm™ Entero	33	4,18	0,11	0	1	0	33	-	-	26	-	-	32	3,11	0,16	0	1	0

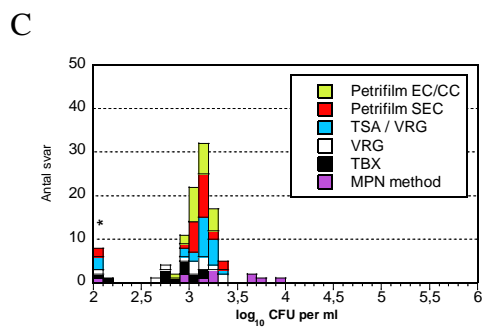
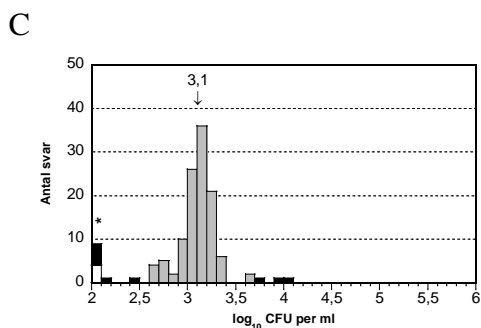
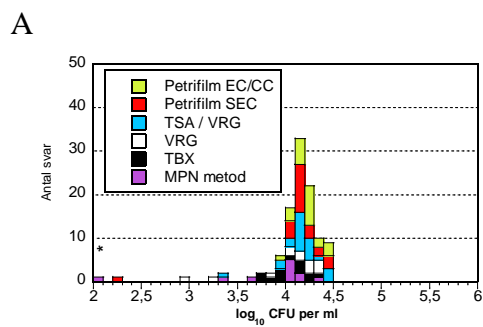
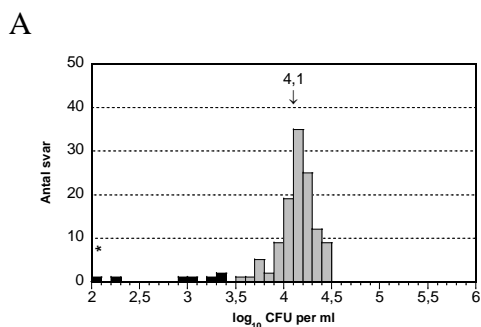




De flesta laboratorierna använde VRGG eller Petrifilm™ Enterobacteriaceae och liknande medelvärde beräknades med dessa substrat, både för blandning A och C. För blandning B rapporterade 79% av laboratorierna som använde Petrifilm™ och 32% av dem som använde VRGG ett falskpositivt resultat. Falskpositiva resultat kopplades dock till laboratorierna som inte utförde konfirmeringssteg, vilket uppstår oftare när Petrifilm™ använts.

Resultat från analys av *E. coli*

Substrat/metod	Blandning A						Blandning B						Blandning C					
	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>
Alla svar	125	4,14	0,18	0	7	0	124	-	-	3	-	-	126	3,09	0,18	4	7	3
Petrifilm™ EC/CC	24	4,22	0,12	0	0	0	24	-	-	1	-	-	23	3,10	0,11	1	0	0
Petrifilm™ SEC	24	4,19	0,12	0	1	0	22	-	-	0	-	-	24	3,12	0,09	3	1	0
TSA/VRG	23	4,18	0,12	0	1	0	22	-	-	0	-	-	23	3,14	0,09	0	0	0
VRG	13	4,18	0,15	0	2	0	13	-	-	1	-	-	13	3,06	0,20	0	1	0
TBX	13	4,04	0,17	0	0	0	13	-	-	0	-	-	13	2,93	0,13	0	2	0
MPN-metod	11	4,05	0,18	0	2	0	11	-	-	0	-	-	11	3,26	0,26	0	1	2



Samma stam av *E. coli* var målorganism i blandning A och C. Resultat är fördelade på liknande sätt för båda blandningarna med en svans av lägre värden som inte kan kopplas till användning av någon metod eller substrat.

Presumtiv *Bacillus cereus*

Blandning A

I blandning A fanns ingen målorganism för denna analys.

Blandning B

I blandning B fanns ingen målorganism för denna analys. På blodagar växte dock atypiska kolonier omgivna av en hämolyszon och på Bcsa bildade *Aeromonas hydrophila* svagt blå kolonier utan utfällningszon. 10 av de laboratorierna som rapporterade ett falskpositivt resultat använde bara BA eller BA-P för analys.

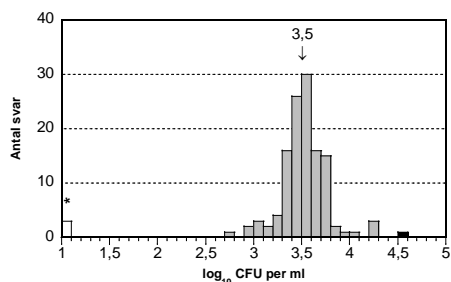
Blandning C

Blandning C innehöll en typisk stam som tillhör gruppen presumtiv *Bacillus cereus* och liknande medelvärde beräknades oberoende av vilket substrat som användes.

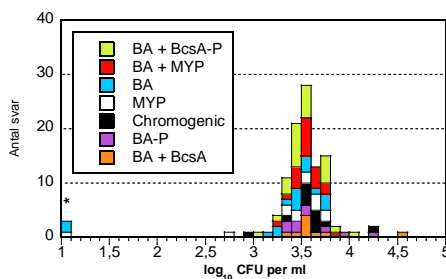
Resultat från analys av presumptiva *B. cereus*

Substrat	Blandning A					Blandning B					Blandning C				
	n	m	s	F	< >	n	m	s	F	< >	n	m	s	F	< >
Alla svar	123	-	-	1	- -	124	-	-	17	- -	126	3,52	0,23	3	0 1
BA + BcsA-P	25	-	-	0	- -	25	-	-	1	- -	26	3,52	0,20	0	0 0
BA + MYP	20	-	-	0	- -	20	-	-	1	- -	20	3,56	0,14	0	0 0
BA	16	-	-	0	- -	16	-	-	3	- -	17	3,48	0,19	2	0 0
MYP	13	-	-	0	- -	13	-	-	1	- -	13	3,50	0,25	1	0 0
Chromogenic	12	-	-	1	- -	12	-	-	0	- -	12	3,58	0,27	0	0 0
BA-P	9	-	-	0	- -	9	-	-	7	- -	9	3,61	0,29	0	0 0
BA + BcsA	8	-	-	0	- -	9	-	-	3	- -	9	3,55	0,12	0	0 1

C



C



Koagulaspositiva stafylokocker

Blandning A

I blandning A fanns ingen målorganism för denna analys.

Blandning B

Blandning B innehöll stammar av *Staphylococcus warneri* och *Staphylococcus aureus*. Bara den sistnämnda var målorganism i analysen. På BP-agar med RPF (Rabbit plasma fibrinogen) bildade *S. warneri* atypiska kolonier utan utfällningszoner. På BP-agar var kolonierna mindre än kolonierna av *S. aureus* och i konfirmeringssteget negativa i koagulastest.

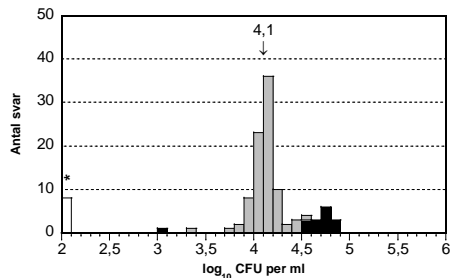
Blandning C

En stam av *Staphylococcus aureus* var målorganism för denna analys.

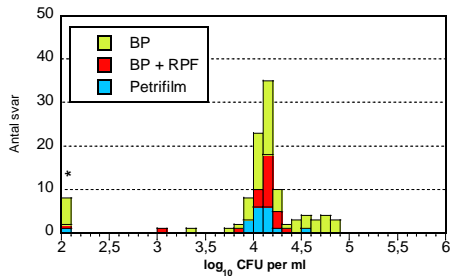
Resultat från analys av koagulaspositiva stafylokocker

Substrat	Blandning A						Blandning B						Blandning C					
	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>
Alla svar	113	-	-	0	-	-	111	4,11	0,16	8	1	15	112	4,62	0,10	2	4	0
BP	68	-	-	0	-	-	66	4,10	0,19	6	0	12	67	4,63	0,09	2	4	0
BP + RPF	24	-	-	0	-	-	24	4,14	0,11	1	1	0	24	4,64	0,09	0	0	0
Petrifilm™ Staph	18	-	-	0	-	-	18	4,07	0,08	1	0	1	18	4,53	0,10	0	0	0

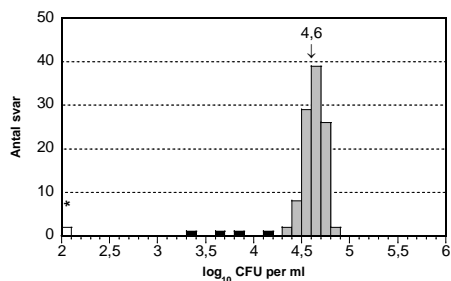
B



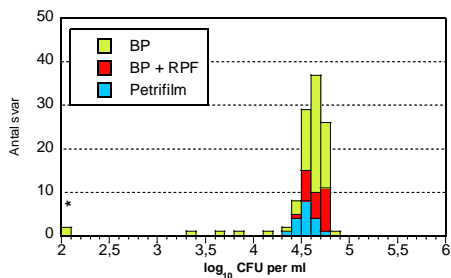
B



C



C



Nästan alla höga extremvärden för blandning B är kopplade till användning av BP-agar. Koagulasreaktionen kan inte testas på detta substrat, så kolonier av *S. warneri* kan tolkas som koagulaspositiva stafylokocker. Nästan alla laboratorier som använde BP-agar utförde dock konfirmering, vilket visar att bara kolonier av *Staphylococcus aureus* i blandning B konfirmerades eller att konfirmeringsteget misslyckades. Resultaten från analys med Petrifilm™ var något lägre än medelvärdet av alla svar. Med Petrifilm™ räknas kolonierna efter 1 dygns inkubering medan traditionella plattor räknas efter 2 dygn. Detta kunde medföra att kolonierna blev mindre, vilket försvårade avläsningen och att färre kolonier räknades på plattan.

Mjölksyrabakterier

Blandning A

En stam av *Lactobacillus plantarum* var målorganism för denna analys.

Blandning B

I blandning B fanns ingen målorganism för analysen men 7 laboratorier rapporterade ändå ett falskpositivt resultat. Både *Staphylococcus warneri* och *Staphylococcus aureus* kan bilda små kolonier på MRS och mycket små kolonier (pin points) på MRS-aB.

Blandning C

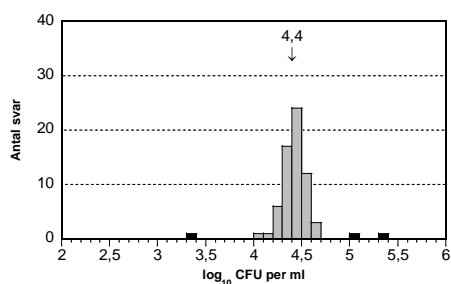
Trots att inga målorganismer fanns i blandningen rapporterade 19 laboratorier (av 66) ett positivt resultat för denna analys. *Staphylococcus aureus* kan bilda små kolonier på MRS och mycket små kolonier (pin points) på MRS-aB. Mjölksyrabakterier växer vanligen på MRS-aB som vita eller gråa kolonier med en diameter på $1,5 \pm 0,5$ mm efter

inkubering i 5 dygn vid 25 °C i anaerob miljö. Dessutom är *S. aureus* katalaspositiv medan mjölksyrabakterier är kalasnegativa.

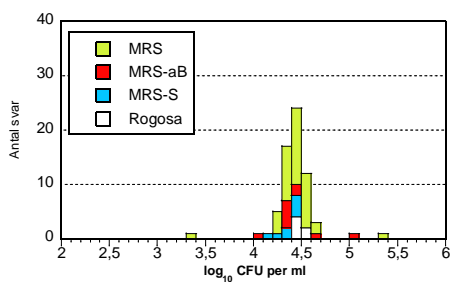
Resultat från analys av mjölksyrabakterier

Substrat	Blandning A						Blandning B						Blandning C					
	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>
Alla svar	67	4,41	0,11	0	1	2	66	-	-	7	-	-	66	-	-	19	-	-
MRS	42	4,43	0,10	0	1	1	42	-	-	5	-	-	42	-	-	12	-	-
MRS-aB	10	4,38	0,13	0	0	1	9	-	-	1	-	-	9	-	-	5	-	-
MRS-S	8	4,36	0,12	0	0	0	8	-	-	1	-	-	8	-	-	1	-	-
Rogosa	6	4,46	0,04	0	0	0	6	-	-	0	-	-	6	-	-	0	-	-

A



A



Räkning av kolonierna av *L. plantarum* från blandning B orsakade inga svårigheter och alla substrat gav liknande resultat.

För blandning B och C, kan flaskpositiva resultat kopplas till laboratorierna som använde MRS eller MRS-aB som är substrat i metoden ISO 15214:1998 respektive NMKL 140:2007. Detta tyder på att de två substraten kan vara mindre selektiva än MRS-S och Rogosa, och möjliggör växt av de mikroorganismer som ingår i blandningarna.

C. perfringens och anaeroba sulfitreducerande bakterier

Blandning A

I blandning A fanns ingen målorganism för dessa analyser.

Blandning B

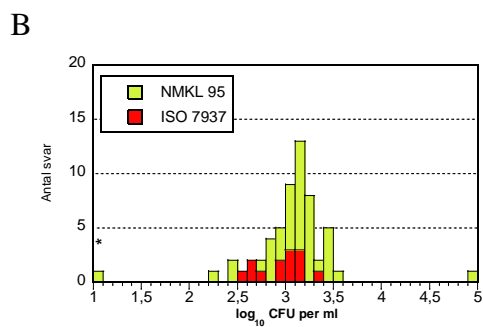
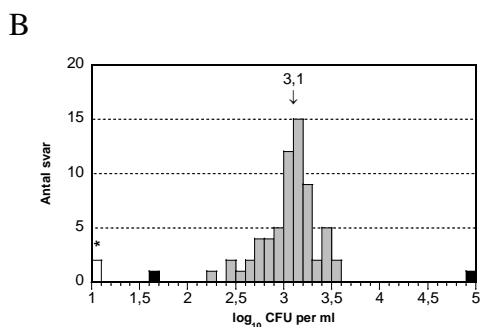
En stam av *Clostridium perfringens* var målorganism för båda analyserna.

Blandning C

I blandning C fanns ingen målorganism för dessa analyser.

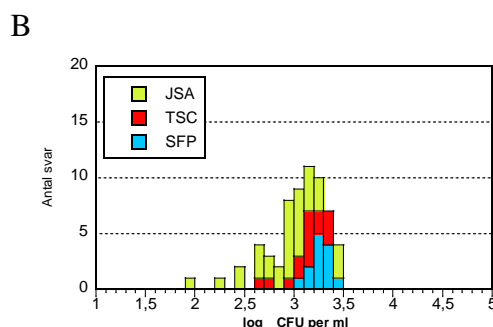
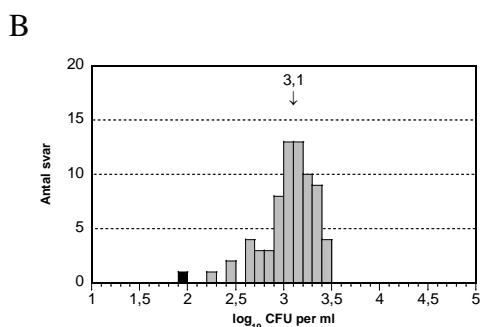
Resultat från analys *C. perfringens*

Metod	Blandning A						Blandning B						Blandning C					
	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>
Alla svar	67	-	-	0	-	-	68	3,06	0,26	2	1	1	68	-	-	2	-	-
NMKL 95:2009	43	-	-	0	-	-	44	3,09	0,26	0	1	1	43	-	-	1	-	-
ISO 7937:2004	13	-	-	0	-	-	13	2,95	0,22	0	0	0	14	-	-	0	-	-



Resultat från analys av anaeroba sulfitreducerande bakterier.

Substrat	Blandning A						Blandning B						Blandning C					
	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>
Alla svar	70	-	-	0	-	-	71	3,06	0,25	0	1	0	71	-	-	1	-	-
JSA	33	-	-	0	-	-	34	2,96	0,28	0	1	0	34	-	-	1	-	-
TSC	15	-	-	0	-	-	15	3,10	0,20	0	0	0	15	-	-	0	-	-
SFP	12	-	-	0	-	-	13	3,26	0,11	0	0	0	30	-	-	0	-	-



Analyserna orsakade inga svårigheter och resultaten för blandning B är ungefär detsamma oberoende av vilken metod som användes. För analys av *C. perfringens* använde nästan alla laboratorier TSC-agar och metoderna NMKL 95:2009 eller EN ISO 7937:2004. NMKL-metoden föreskriver inkubering vid 37 °C i 24 timmar medan ISO-metoden föreskriver 35 eller 37 °C i 20 timmar.

För analys av anaeroba sulfitreducerande bakterier gav odling på SFP något högre resultat. Det har visat sig att SFP agar är mindre selektiv än TSC, men är även gynnsammare för *C. perfringens* och ger ett högre utbyte än TSC (2). Dessutom har vi på Livsmedelsverket noterat att stammen av *C. perfringens* som fanns i blandningen växer sämre på TSC-agar med pH-värde över 7,6.

För analys av aeroba sulfitreducerande bakterier i livsmedel förslår dock både metoderna NMKL 56:2008 och ISO 15213:2003 användning av JSA och inte TSC eller SFP som är avsedda för analys av *C. perfringens*.

Slutligen, bör det noteras att metoden NMKL 56 reviderades och heter nu "Sulfitreducerande klostridier. Bestämning i livsmedel". Denna femte version av metoden beskriver som tidigare bestämning av antalet anaeroba sulfitreducerande bakterier, men inkluderar även bestämning av sulfitreducerande klostridier genom ytterligare konfirmationssteg.

Aeroba mikroorganismer och H₂S producerande bakterier i fisk

Blandning A

Liksom i analys av aeroba mikroorganismer vid 30°C var stammar av *Lactobacillus plantarum* och *Esherichia coli* målorganismer. I blandning A fanns inga H₂S-producerande bakterier.

Blandning B

Stammar av *Aeromonas hydrophila*, *Shewanella putrefaciens*, *Staphylococcus warneri* och *Staphylococcus aureus* utgjorde de flesta kolonierna på plattorna i analys av aeroba mikroorganismer. *S. putrefaciens*, som bildar svarta kolonier på järn agar, var målorganism för analys av H₂S-producerande bakterier.

Blandning C

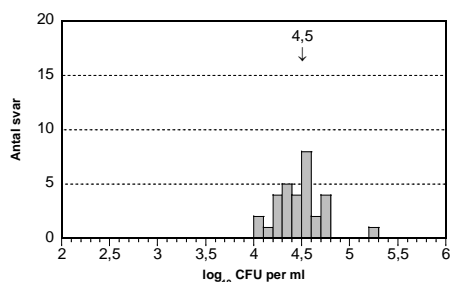
Stammar av *Micrococcus sp.* och *Staphylococcus aureus* var målorganismer i analys av aeroba mikroorganismer. Blandningen innehöll ingen målorganism för analys av H₂S-producerande bakterier.

Resultat från analys av aeroba mikroorganismer i fiskprodukter.

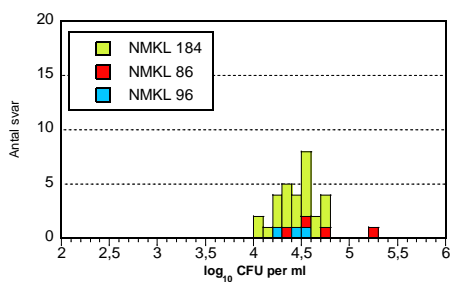
Metod	Blandning A						Blandning B						Blandning C					
	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>
Alla svar	31	4,46	0,23	0	0	0	31	4,15	0,33	0	1	0	31	4,75	0,11	0	5	1
NMKL 184:2006	24	4,43	0,19	0	0	0	24	4,11	0,31	0	0	0	24	4,77	0,10	0	4	0
NMKL 86:2013	4	4,62*	-	0	0	0	4	4,71*	-	0	1	0	4	4,58*	-	0	0	1
NMKL 96:2003	2	4,46*	-	0	0	0	3	4,15*	-	0	0	0	3	4,74*	-	0	1	0

* median

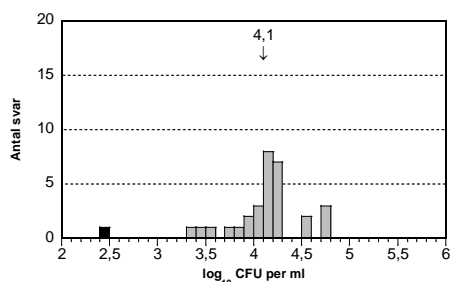
A



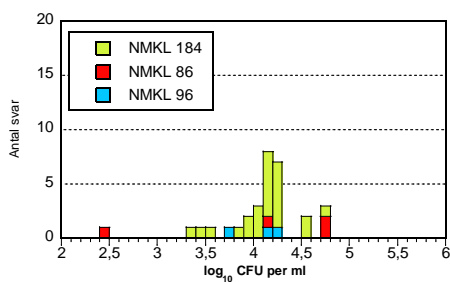
A



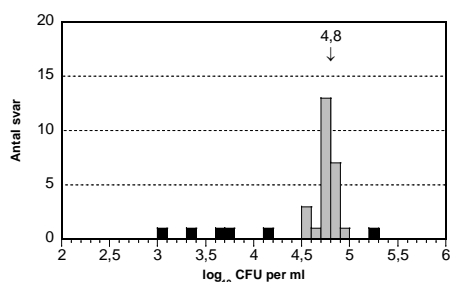
B



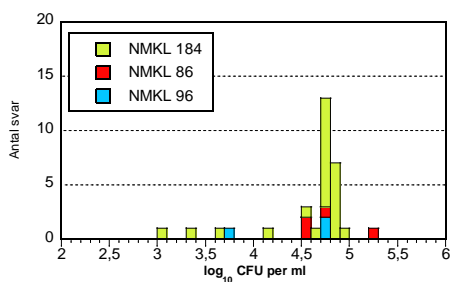
B



C



C

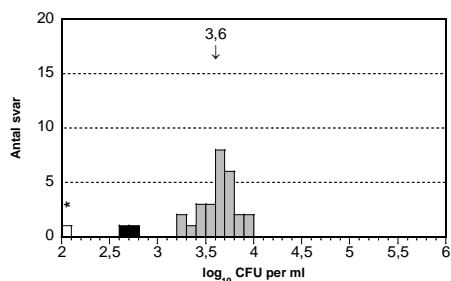


Resultat från analys av H₂S producerande bakterier i fiskprodukter.

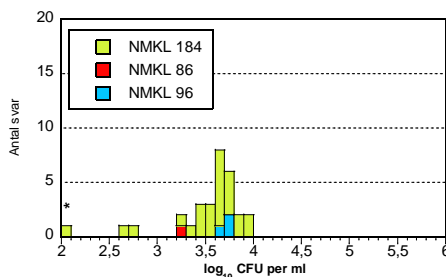
Metod	Blandning A						Blandning B						Blandning C					
	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>
Alla svar	29	-	-	0	-	-	30	3,62	0,18	1	2	0	29	-	-	0	-	-
NMKL 184:2006	25	-	-	0	-	-	26	3,62	0,17	1	2	0	25	-	-	0	-	-
NMKL 96:2003	3	-	-	0	-	-	3	3,71*	-	0	0	0	3	-	-	0	-	-

* median

B



B



De flesta laboratorierna som utförde båda analyserna använde järn agar och metoden NMKL 184:2006 "Aeroba bakterier och specifika förruttelse organismer i fisk och fiskprodukter". Metoden NMKL 96 beskriver analys av koliforma bakterier, termotoleranta koliforma bakterier och *E. coli* med MPN metoder för färsk och frysta skaldjur, medan metoden NMKL 86 beskriver bestämning av aeroba mikroorganismer i livsmedel. Dessa två metoder är inte anpassade till de analyser som utförs här.

Jäst och mögel

Blandning A

Blandning A innehöll en stam av *Kluyveromyces marxianus* som var målorganism för analys av jäst. Av 147 laboratorier som utförde analysen rapporterade 15 att ingen jäst fanns i blandningen och 13 ett resultat som identifieras som högt extremvärde. De falsknegativa resultaten kan förklaras av den låga halten av jäst i blandningen (1,89 log₁₀ cfu ml⁻¹ vid kvalitetskontroll). En stam av *Penicillium verrucosum* var målorganism för analys av mögel.

Blandning B

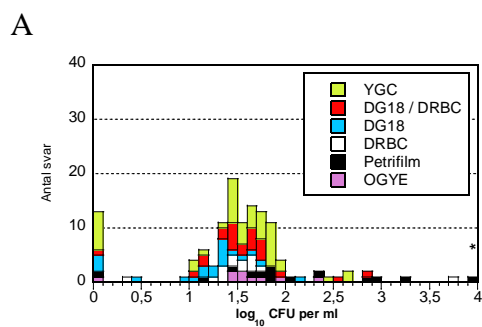
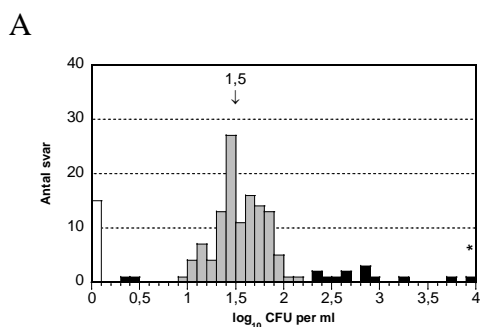
I blandning B fanns varken jäst- eller mögelsvamp.

Blandning C

I blandning C fanns varken jäst- eller mögelsvamp.

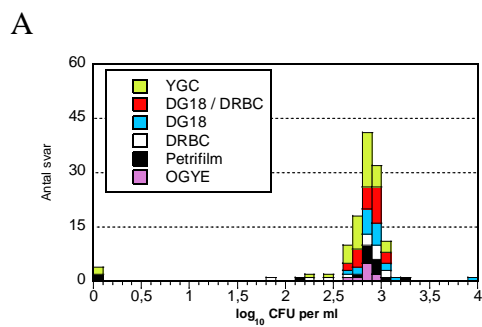
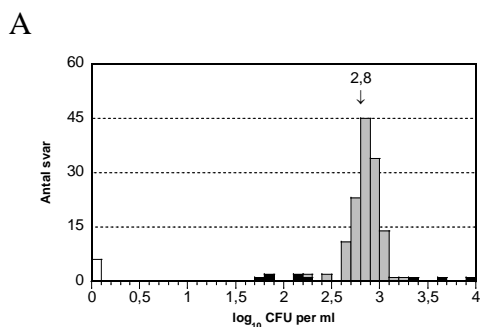
Resultat från analys av jäst.

Substrat	Blandning A						Blandning B						Blandning C					
	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>
Alla svar	147	1,53	0,25	15	2	13	142	-	-	4	-	-	143	-	-	5	-	-
YGC	45	1,60	0,22	7	0	3	45	-	-	1	-	-	45	-	-	0	-	-
DG18/DRBC	24	1,51	0,23	1	0	2	22	-	-	0	-	-	23	-	-	0	-	-
DG18	20	1,36	0,29	3	1	0	19	-	-	0	-	-	19	-	-	0	-	-
DRBC	14	1,50	0,18	0	1	1	14	-	-	0	-	-	13	-	-	1	-	-
Petrefilm™	14	1,70	0,25	1	0	5	12	-	-	2	-	-	12	-	-	1	-	-
OGYE	9	1,60	0,15	1	0	1	9	-	-	1	-	-	9	-	-	1	-	-



Resultat från analys av mögel.

Substrat	Blandning A						Blandning B						Blandning C					
	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>	n	m	s	F	<	>
Alla svar	147	2,85	0,13	6	6	3	142	-	-	3	-	-	142	-	-	4	-	-
YGC	42	2,80	0,14	2	0	0	42	-	-	1	-	-	42	-	-	1	-	-
DG18/DRBC	26	2,85	0,11	0	0	0	24	-	-	0	-	-	25	-	-	0	-	-
DG18	20	2,86	0,11	0	0	1	19	-	-	1	-	-	19	-	-	1	-	-
DRBC	13	2,85	0,16	0	2	0	13	-	-	0	-	-	13	-	-	0	-	-
Petrifilm™	15	2,92	0,13	2	1	0	13	-	-	0	-	-	13	-	-	1	-	-
OGYE	9	2,84	0,10	0	0	0	9	-	-	0	-	-	9	-	-	0	-	-



De flesta laboratorierna rapporterade att de analyserade både jäst och mögel enligt metoderna NMKL 98:2005 och ISO 21527:2008 som föreskriver substraten DRBC, DG18 och/eller OGYE, eller enligt metoden ISO 6811:2004 / IDF:94:2004 som föreskriver substraten YGC eller OGYE.

Analys av mögel orsakade inga svårigheter och resultaten är ungefär desamma oberoende av vilket substrat som användes.

För analys av jäst, är falsknegativa resultat för blandning A kopplade till användning av YGC och DG18. Vid kontroll av blandningen observerade vi att kolonier av *K. marxianus* var större och lättare att räkna på DRBC än på DG18. Vi utförde inte analys med YGC. Det finns ingen koppling mellan höga extremvärden och substrat/metod som användes för analys av jäst för blandning A.

Utfallet av enskilda laboratoriers analysresultat – bedömning

För att göra det möjligt att jämföra resultat från olika analyser och provblandningar med varandra omräknas laboratoriernas resultat från samtliga analyser till standardvärden (z-värden). För kvantitativa analyser blir standardvärdet positivt eller negativt beroende på om resultatet ligger över eller under laboratoriernas gemensamma medelvärde. För kvalitativa analyser, erhåller korrekta resultat z-värdet noll. Z-värden redovisas i bilaga 2 och används med fördel vid laboratoriernas egen uppföljning av resultaten.

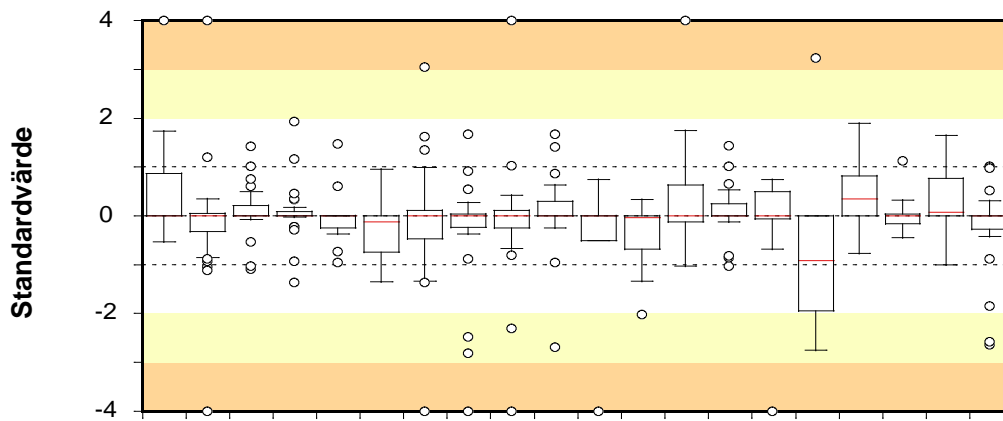
En sammanfattande bild över varje enskilt laboratoriums resultat inklusive extremvärde ges av ett boxdiagram, som baseras på z-värden i bilaga 2. Ju mindre variationsbredd diagrammet har från lägsta till högsta värde och ju mer centrerat kring standardvärdet noll boxen ligger, desto större likhet är det generellt mellan laboratoriets resultat och medelvärden av samtliga laboratoriers svar.

Laboratorierna är inte grupperade eller rangordnade utifrån sina resultat. Varje enskilt laboratorium kan bedömas med antalet falska svar och extremvärden i tabellerna under boxdiagrammen. Svaren med anmärkning är dessutom markerade i Bilaga 1, där alla laboratoriers samtliga inrapporterade svar redovisas, liksom lägsta respektive högsta accepterade värde för varje analys.

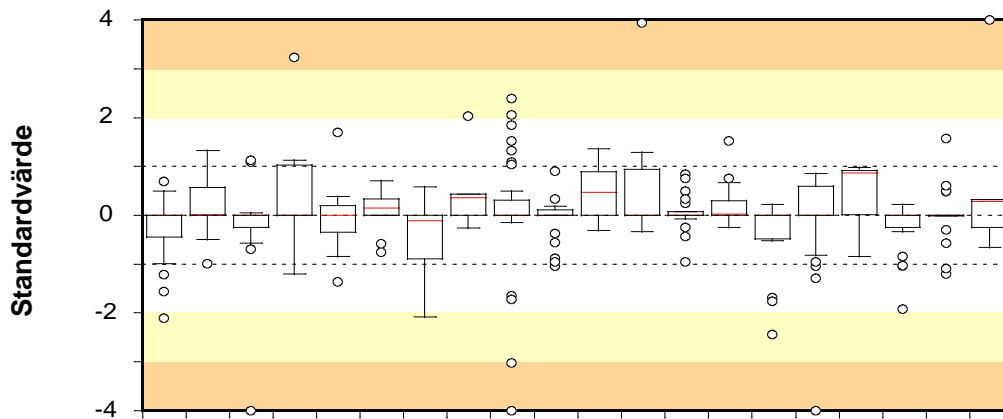
Verksamhetsprotokollet (3) beskriver hur analysresultaten är bearbetade och ger kortfattade rekommendationer om hur resultaten kan följas upp. Extra prov för uppföljning av analyser med avvikande svar kan beställas utan kostnad via webbsidan till www.livsmedelsverket.se/PT-extra

Boxdiagram och antal avvikande värden för varje laboratorium.

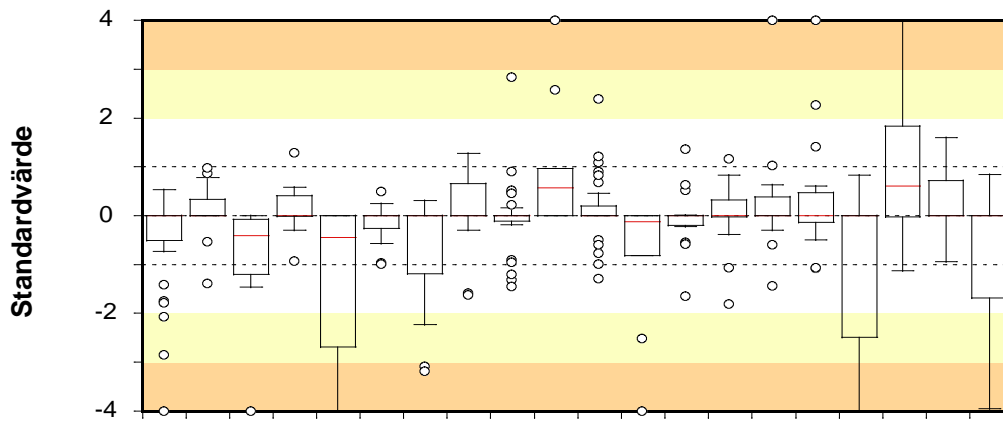
- *Diagrammen är baserade på laboratoriernas svar från samtliga analyser. Svaren är omräknade till standardvärden (z-värden) enligt formeln: $z = (x - m)/s$, där x är enskilt laboratoriums resultat, m är medelvärde beräknat från deltagande laboratoriers svar och s är standardavvikelse beräknad från deltagande laboratoriers svar.*
- *Korrekta negativa resultat för kvantitativa analyser och korrekta resultat för kvalitativa analyser har erhållit z-värdet noll.*
- *Laboratoriets medianvärde markeras med horisontellt streck i boxen.*
- *Boxens volym innesluter 25 % av svaren över medianvärdet och 25 % av svaren under medianvärdet. Resterande 50 % av svaren innesluts av de från boxen utskjutande strecken och ringarna.*
- *Mycket avvikande värden markeras med en ring och beräknas enligt formeln: boxens minsta värde $-1,5 \times (\text{boxens största värde} - \text{boxens minsta värde})$ eller boxens största värde $+1,5 \times (\text{boxens största värde} - \text{boxens minsta värde})$. Standardvärden högre än +4 respektive mindre än -4 har i figuren fått värdena +4 respektive -4.*
- *Bakgrunden är uppdelad med linjer och i olika skuggade fält för att visa inom vilket intervall ett laboratoriums värden hamnade.*



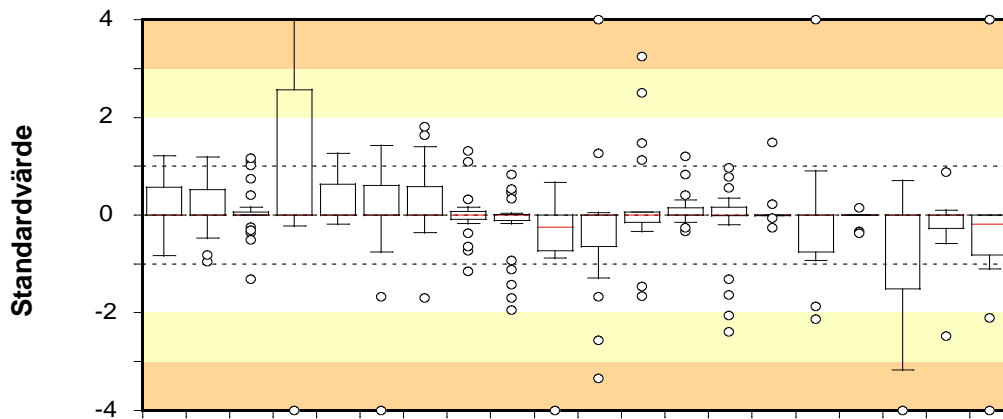
Labnr	1149	1237	1594	1970	2035	2058	2072	2324	2344	2386	2402	2458	2459	2637	2642	2670	2704	2720	2745	2764
Antal värden	19	28	27	37	18	11	32	20	30	18	9	18	13	30	19	8	19	11	18	20
Falskpositiva	2	-	-	-	-	1	1	3	-	-	1	1	3	-	1	-	2	1	-	1
Falsknegativa	-	2	-	2	-	-	-	1	1	-	-	1	-	-	1	1	-	-	-	-
Låga extremer	-	1	-	-	-	-	1	1	1	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Höga extremer	1	1	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-



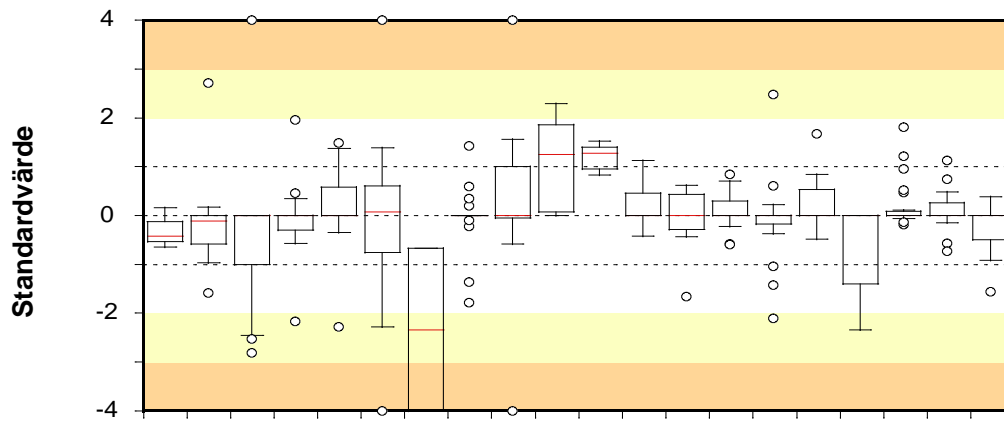
Labnr	2842	2920	2941	3055	3126	3159	3225	3243	3305	3457	3533	3543	3587	3626	3831	3868	3925	4047	4050	4064
Antal värden	23	12	24	14	9	17	14	6	34	24	6	17	21	18	15	36	3	19	18	5
Falskpositiva	1	-	1	1	-	1	1	-	2	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	1
Falsknegativa	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Låga extremer	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Höga extremer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1



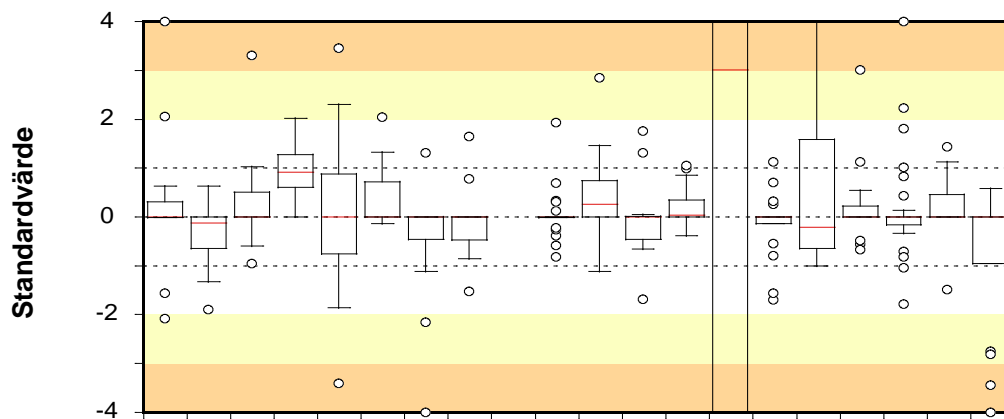
Labnr	4100	4171	4246	4266	4278	4288	4305	4339	4352	4400	4562	4564	4635	4664	4817	4840	4873	4879	4889	4951
Antal värden	33	22	13	17	14	26	20	36	35	10	30	10	24	23	21	18	16	11	24	14
Falskpositiva	-	1	2	1	1	-	-	-	1	1	-	1	-	1	-	3	1	1	-	1
Falsknegativa	-	1	-	-	-	1	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-
Låga extremer	1	-	1	-	3	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	1
Höga extremer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-



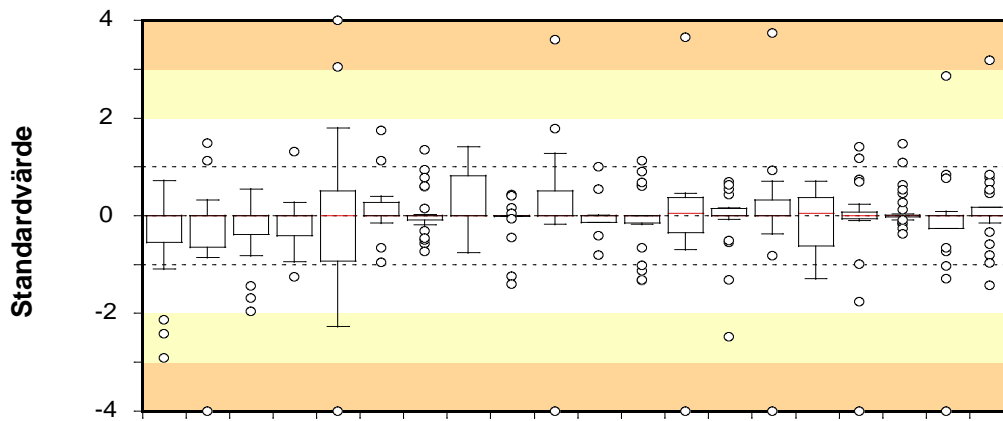
Labnr	4955	4980	5018	5100	5119	5120	5200	5201	5204	5220	5250	5304	5329	5333	5338	5352	5545	5553	5615	5632
Antal värden	30	26	29	12	10	35	18	19	28	9	15	18	20	23	9	23	11	17	24	16
Falskpositiva	-	1	1	1	-	1	-	1	3	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	1
Falsknegativa	-	-	-	2	2	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	1	4	-	-	-
Låga extremer	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
Höga extremer	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	1	-	-	-	2



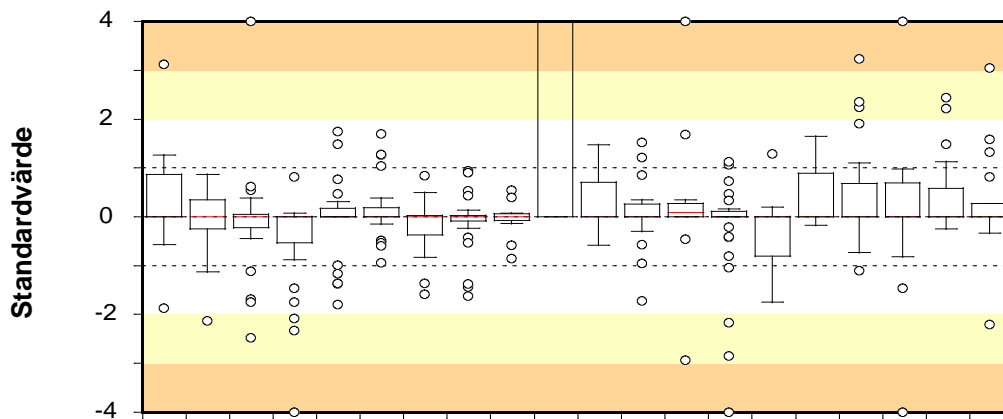
Labnr	5701	5801	5808	5883	5933	5950	5993	6109	6175	6224	6232	6253	6258	6343	6352	6368	6443	6456	6490	6594
Antal värden	3	12	13	24	23	18	2	18	12	7	5	24	12	24	26	26	6	27	20	17
Falskpositiva	-	3	1	-	1	1	1	-	-	1	1	-	2	-	1	-	-	-	1	1
Falsknegativa	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-
Låga extremer	-	-	-	-	-	2	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Höga extremer	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



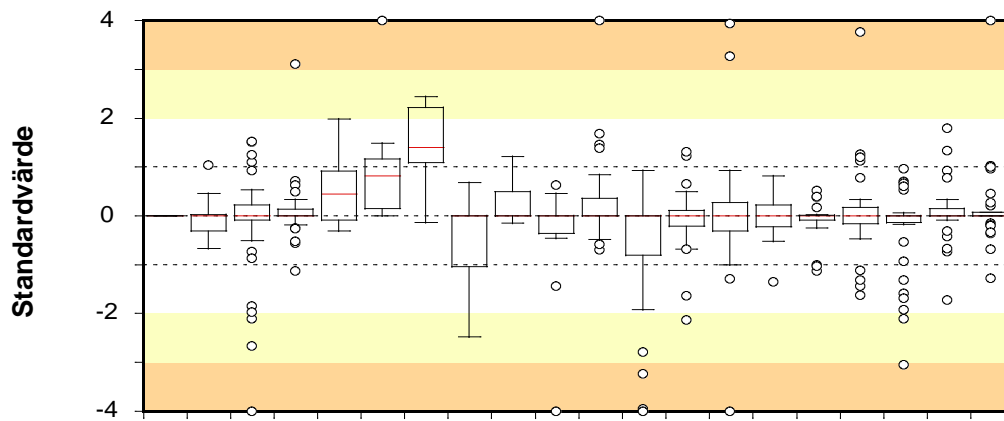
Labnr	6647	6658	6686	6762	6852	6885	6944	6958	6971	6992	7024	7096	7182	7191	7207	7232	7242	7248	7253	7282
Antal värden	11	14	24	8	11	21	15	12	5	22	14	15	14	9	18	6	18	29	14	18
Falskpositiva	-	1	-	1	2	3	-	2	1	-	1	-	3	1	-	3	-	1	-	-
Falsknegativa	-	-	-	-	2	-	-	1	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	1	-
Låga extremer	-	-	-	-	-	-	1	-	5	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	1
Höga extremer	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	1	-	1	-	-



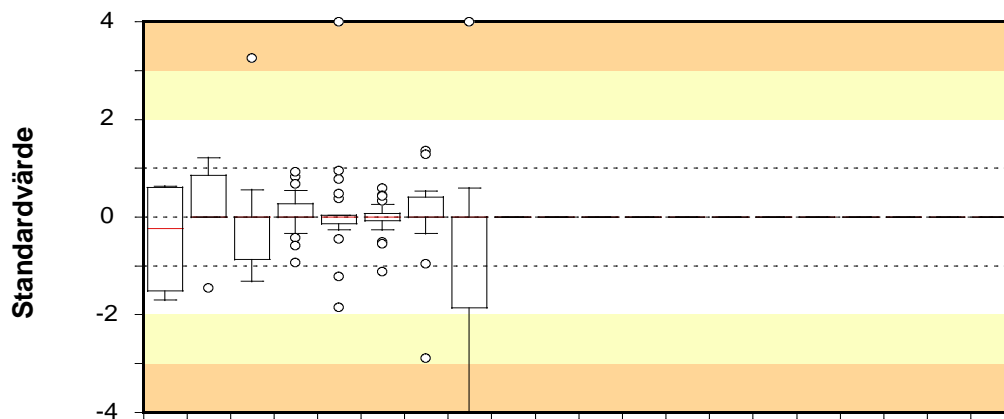
Labnr	7330	7334	7438	7564	7596	7627	7688	7728	7750	7825	7828	7876	7877	7906	7930	7940	7962	7968	8066	8068	
Antal värden	23	21	21	25	28	13	30	24	17	21	12	24	7	24	24	3	21	32	22	30	
Falskpositiva	1	-	-	1	2	2	-	-	1	-	-	-	2	-	-	-	-	1	1	-	
Falsknegativa	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Låga extremer	-	3	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	1	-	
Höga extremer	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1	



Labnr	8105	8228	8260	8313	8333	8397	8430	8435	8523	8528	8529	8568	8626	8628	8657	8734	8742	8756	8766	8891
Antal värden	15	18	26	25	23	32	20	27	12	9	29	20	12	36	12	13	26	20	24	17
Falskpositiva	-	2	1	1	1	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	1	1	1	-	2
Falsknegativa	-	1	-	1	-	1	-	-	-	2	1	-	-	-	-	1	-	-	-	1
Låga extremer	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-
Höga extremer	1	-	1	-	-	-	-	-	-	5	-	-	1	-	-	-	-	3	-	1



Labnr	8909	8918	8955	9002	9003	9034	9078	9217	9408	9429	9436	9441	9451	9453	9512	9555	9559	9569	9589	9662
Antal värden	-	16	36	27	8	15	5	17	15	27	31	37	24	19	14	19	24	35	27	30
Falskpositiva	-	2	-	-	-	-	1	1	-	-	1	-	-	2	1	3	3	-	-	-
Falsknegativa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	2	-	1	-	-
Låga extremer	-	-	1	-	-	-	-	-	-	4	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-
Höga extremer	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	1



Labnr	9747	9783	9853	9886	9890	9903	9923	9950
Antal värden	6	9	14	31	22	24	17	14
Falskpositiva	-	-	1	1	2	-	1	1
Falsknegativa	-	-	-	1	-	-	-	-
Låga extremer	-	-	-	-	-	-	-	1
Höga extremer	-	-	-	-	1	-	-	1

Testmaterial och kvalitetskontroll

Testmaterial

Testmaterialet bestod av tre frystorkade mikroorganismblandningar, A-C, som tillverkades och frystorkades portionsvis (0,5 ml) i vialer enligt beskrivning av Peterz och Steneryd (4). Varje laboratorium erhöll en vial av varje blandning. Före provansättning skulle innehållet i en vial lösas upp i 254 ml steril spädningsvätska. Innehållet i provblandningarna framgår av tabell 2.

Tabell 2. Mikroorganismer i respektive provblandning

Blandning ¹	Mikroorganism	Stambeteckning
A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	SLV-445
	<i>Escherichia coli</i>	SLV-524
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	SLV-439
	<i>Penicillium verrucosum</i>	SLV-526
B	<i>Aeromonas hydrophila</i>	SLV-454
	<i>Clostridium perfringens</i>	SLV-442
	<i>Staphylococcus warneri</i>	SLV-565
	<i>Staphylococcus aureus</i>	SLV-350
	<i>Shewanella putrefaciens</i>	SLV-520
C	<i>Micrococcus sp.</i>	SLV-055
	<i>Escherichia coli</i>	SLV-524
	<i>Bacillus cereus</i>	SLV-518
	<i>Staphylococcus aureus</i>	SLV-280

¹ För koppling av slumpad provbeteckning till respektive provblandning hänvisas till bilaga 1.

Kvalitetskontroll av provblandningarna

Homogena provblandningar och lika volym i varje vial är nödvändigt för att samtliga tillverkade frystorkade prov från en provblandning ska vara jämförbara. Kvalitetskontroll av provblandningarna utförs på 10 vialer i samband med tillverkningen eller på 5 vialer om en ”gammal” blandning används och den sista kvalitetskontroll utfördes för mer än 6 månader sedan. Kriteriet för homogenitet för samtliga analyser är att värdena vid test av reproducerbarhet (T) och vid test med "Index of dispersion" mellan vialer (I₂) inte samtidigt överskrider gränsvärdena på 2,6 respektive 2,0.

Tabell 3: Medelvärden av halter (*m*) och standardavvikelser (*s*) från kvalitetskontroll av blandningarna; *m* och *s* anges i log₁₀ cfu (colony forming units) per ml prov.

Analys och metod	A		B		C	
	<i>m</i>	<i>s</i>	<i>m</i>	<i>s</i>	<i>m</i>	<i>s</i>
Aeroba mikroorganismer, 30°C NMKL-metod nr. 86	4,87	0,12	4,79	0,07	4,88	0,03
Psykrotrofa mikroorganismer NMKL method no. 86	2,95	0,06	3,19	0,09	–	–
Enterobacteriaceae NMKL-metod nr. 144	4,33	0,04	–	–	3,15	0,04
<i>Escherichia coli</i> NMKL-metod nr. 125	4,34	0,04	–	–	3,25	0,04
Presumptiv <i>Bacillus cereus</i> NMKL-metod nr. 67	–	–	–	–	3,54	0,10
Koagulaspositiva stafylokocker NMKL-metod nr. 66	–	–	4,21	0,04	4,70	0,06
Mjölksyrabakterier NMKL-metod nr. 140	4,54	0,09	–	–	–	–
<i>Clostridium perfringens</i> NMKL-metod nr. 95	–	–	3,10	0,04	–	–
Anaeroba sulfitreducerande bakterier NMKL-metod nr. 56	–	–	3,11	0,06	–	–
Aeroba mikroorganismer i fiskprodukter NMKL-metod nr. 184	4,77	0,06	4,62	0,05	4,91	0,04
H ₂ S-producerande bakterier i fiskprodukter NMKL-metod nr. 184	–	–	4,05	0,09	–	–
Jäst NMKL-metod nr. 98, DG18	1,89	0,16	–	–	–	–
Mögel NMKL-metod nr. 98, DG18	3,05	0,05	–	–	–	–

– Ingen målorganism

Referenser

1. Kelly, K. 1990. Outlier detection in collaborative studies. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73:58-64.
2. Harmoni SM, Kautter DA, Peeler JT. 1971. Improved medium for enumeration of *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol. 22:688-92.
3. Anonym, 2012. Verksamhetsprotokoll. Mikrobiologi. Dricksvatten & Livsmedel, Livsmedelsverket.
4. Peterz. M. Steneryd. A.C. 1993. Freeze-dried mixed cultures as reference samples in quantitative and qualitative microbiological examinations of food. J. Appl. Bacteriol. 74:143-148.

Intern och extern kontroll av dricksvatten- och livsmedelsanalyser

I all analysverksamhet är det viktigt att arbetet håller en dokumenterat hög standard. För detta ändamål har de flesta laboratorier någon form av internt system för kvalitetssäkring. Hur väl analyserna fungerar måste dock även utvärderas av oberoende part. Genom deltagande i kompetensprovningar (KP) får laboratorierna en extern kvalitetskontroll av sin kompetens, vilket ackrediteringsorganen vanligen kräver.

Vid en kompetensprovning analyseras likadana prov av ett antal laboratorier med sina rutinmetoder. Organisatören sammanställer och utvärderar resultaten i form av en rapport.

Livsmedelsverkets kompetensprovningar ger

- Extern och oberoende utvärdering av laboratoriers analyskompetens.
- Ökad kunskap om analysmetoder för olika typer av organismer.
- Expertstöd.
- Underlag för bedömning av ackreditering.
- Extra material för uppföljning av resultat utan kostnad.

För mer information, besök vår webbplats: www2.slv.se/absint

Livsmedelsverkets referensmaterial

Som ett komplement till kompetensprovning tillverkar Livsmedelsverket även 8 olika referensmaterial (RM) för interna kontroller av livsmedels- och dricksvattenanalyser, inklusive analyser av patogener.

För mer information, besök vår webbplats: www.livsmedelsverket.se/RM-micro