

Framställning av bakteriesuspensioner för att säkerställa att odlingsmedier fungerar (SkimMilk)

1. Princip

De bakteriesuspensioner som avses i arbetsbeskrivningen är blandningar av fettfri (skummad) mjölk och en bakterieodling med ett fastställt antal bakterier. Dessa kan bland annat användas till kvantitativ kvalitetssäkring av odlingsmedier eller till valideringstester (en noggrant fastställd bakterietillsats).

Vid framställning av suspensioner odlas bakteriestammen först direkt från frysröret (referensstammens "stock") och ympas i icke-selektiv anrikningsbuljong. Bakteriehalt i den odlade anrikningen bestäms med hjälp av en spädningsserie och plattodling medan anrikningen väntar i kylskåpstemperatur.

Då det är klart vilken utspädningsnivå och volym som ska ympas i mjölk för att göra suspensionen, görs en ny spädningsserie av anrikningen som förvaras i kylskåp. Spädningsseriens sista spädning (önskad halt i mjölkröret) görs i fettfri mjölk.

Mjölksuspensionen pipetteras i frysrör och förvaras i -80 °C. Mjölkkampuller som framställts på detta sätt förblir i allmänhet stabila i ett år, beroende på bakteriearten (Schijven et al. 1994).

Den beskrivna metoden lämpar sig inte som sådan för förvaring av vissa bakteriearter som är känsliga för nedfrysning, såsom *Campylobacter* och *Clostridium*. I denna arbetsbeskrivning ges separata anvisningar om framställning och nedfrysning av campylobactersuspensioner.

2. Arbetssäkerhet

Vid arbete i ett mikrobiologiskt laboratorium iakttas verksamhetsbeskrivning LAB 223.

Dessutom iakttas verksamhetsbeskrivning LAB 741 vid framställning av suspensioner från STEC-stammar.

3. Utrustning och redskap

- 1) Mikrobiologisk basutrustning
- 2) Frys -80 °C
- 3) Kylskåp 4 ± 2 °C
- 4) Värmeskåp 25 °C ± 1 °C, 30 °C ± 1 °C, 37 °C ± 1 °C, 44 °C ± 1 °C beroende på bakteriens tillväxtkrav
- 5) DiluShaker

4. Medier och reagenser

- 1) Blodagar eller TSA-agar
- 2) TSB-, BHI- eller BPW-buljong (beroende på bakteriens tillväxtkrav kan den också ersättas med en annan icke-selektiv anrikningsbuljong, t.ex. BRULIE för campylobacter)
- 3) 9 ml peptonsaltlösning (PEPSU) eller 9 ml Dilucup
- 4) Fettfri (skummad) mjölk (Skim milk) 20 % (Skim milk lösning, 20 %) 50/100 ml
- 5) 2,0 ml frysrör

5. Utförande

Anvisningen nedan lämpar sig för de flesta mikrobstammar. Framställningen av campylobactersuspensioner beskrivs under punkt 6 i denna arbetsbeskrivning.

Dag 0

1. Gör en renodling på en blodplatta eller TSA av nedfrost "stock" och inkubera i en temperatur som är lämpad för stammen i enlighet med metodbeskrivningen i 18–24 h. De odlade plattorna får endast användas till framställning av bakteriesuspensioner.

Dag 1

2. Ympa en bakteriekoloni med 1 µl ögla i 10 ml icke-selektiv anrikningsbuljong (TSB, BHI eller BPW) och inkubera som ovan. Beroende på bakteriens tillväxtkrav kan den också ersättas med en annan icke-selektiv anrikningsbuljong, t.ex. BRULIE för campylobacter (punkt 6).

Dag 2

3. Gör en spädningsserie av buljongen till -8 (eller enligt bakteriens kända tillväxt) och odla 0,1 ml av de tre största utspädningarna i följd, då antalet på plattorna motsvarar utspädningarna -7, -8 och -9. Odlade utspädningarna på två parallella plattor (TSA/blodagar). Förvara buljongodlingen i 4 ± 2 °C tills odlingsresultatet är klart.

Inkubera i enlighet med metodbeskrivningen vid en temperatur som är lämplig för stammen i 24 eller 48 h beroende på bakterien.

Dag 3

1. Fastställ halten på anrikningsbuljongen utgående från plattorna som gjorts med spädningsserien.
2. Utgående från det erhållna resultatet fastställs en lämplig spädning med vilken en mjölk suspension av önskad styrka kan framställas av anrikningsbuljongen.

- **Teststammar för produktivitetstestning** av medier: 60–100 cfu/0,1 ml
- Kvalitativ testning av medierna samt testning av mediernas **selektivitet och specificitet**: 10⁴ cfu/0,1 ml

Andelen anrikning som tillsätts får vara högst 10 % av mjölk suspensionens totala volym.

På blankett LAB 7497 finns en beräkningstabell för beräkning av lämplig spädning och volym. Fyll i blanketten och skriv ut den till en arbetsbok och ett dokument.

4. Framställ mjölk suspensionen.

Gör en ny spädningsserie av anrikningsbuljongen och tillsätt en lämplig volym av ovan fastställda utspädning. Volymen som pipetteras kan avrundas neråt till närmaste 10 µl. Om det är känt att stammen utökas under kylförvaring (till exempel *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pseudotuberculosis*), kan volymen avrundas neråt till närmaste 100 µl. Anteckna ändringarna på blankett LAB 7497.

5. Blanda väl och dela upp mjölk suspensionen som ska frysas i frysror i partier om 1,5 ml. Blanda suspensionerna allt emellanåt under pipetteringen.
 6. Pipettera på TSA/blodagar för att fastställa suspensionens koncentration.
- Produktivitetstestning (**60–100 cfu/0,1 ml**): odla 0,1 ml av suspensionen på fyra parallella plattor.
 - Starka suspensioner (**10⁴ cfu/0,1 ml**): framställ en spädningsserie till 10⁴ av suspensionen. Odlar -2, -3 och -4 100 µl av utspädningarna på två parallella plattor (platta -3, -4, -5).

Inkubera liksom ovan (dag 2).

7. Frys omedelbart till -80 °C. Suspensionen ska frysas senast inom 2 h efter att den påbörjades, och om det blir avbrott i arbetet ska den förvaras i kylskåpstemperatur.

Dag 4

1. Räkna plattorna som odlats med den framställda bakteriesuspensionen.

Räkning av resultat

- - Produktivitetstestning (**60–100 cfu/0,1 ml**): medelvärde av fyra plattor
 -
 - Starka suspensioner (**10⁴ cfu/0,1 ml**):räkna suspensionens koncentration enligt verksamhetsbeskrivning LAB 703. Observera att enheten för det räknade resultatet är cfu/1 ml. Ändra resultatet till koncentrationen cfu/100 µl genom att dividera resultatet med 10.
2. Anteckna mjölk suspensionens verkliga koncentration i arbetsdokumenten och i förteckningen över mikrosuspensioner för odlingsmedietestning som förvaltas på server.

När du behöver en mikrosuspension, tina upp den i rumstemperatur i högst 30 minuter. Alternativt kan du tina upp suspensionen över natten i kylskåp eller till exempel i värmeskap i + 37 °C i högst 30 minuter.

Starka suspensioner som används för **kvalitativ testning** kan efter upptiningen förvaras i kylskåp och samma rör kan användas under arbetsveckan. Suspensioner för andra ändamål ska tinas upp före användningen på samma sätt som ovan.

6. Framställning av campylobactersuspensioner

Dag 1

Ympa en bakteriekoloni i 10 ml brusellabuljong (BRULIE). Inkubera i 24 timmar i 37 °C under mikroaerobiska förhållanden.

Dag 2

Pipettera 0,1 ml buljongodling i 30 ml BHI-buljong. Tillsätt i blandningen 3 ml steril glycerol (till halten 10 %). Frysa blandningen i partier om 1,5 ml till -80 °C. Antalet campylobacter i blandningen minskar avsevärt i samband med nedfrysningen. Därför ska koncentrationen av blandningen fastställas först i den nedfrysta suspensionen.

Dag 3

Tina upp två rör. Gör en spädningsserie av båda rören till 10⁻⁴ och odla alla utspädningar på två parallella blodplattor för att fastställa odlingens koncentration. Den förväntade koncentrationen är cirka 10²–10³ cfu/100 µl.

Utifrån resultaten väljs en utspädningsnivå för att späda ut suspensionen så att koncentrationen blir 50–100 cfu /100 µl. Anteckna utspädningsanvisningen i de arbetsböcker där campylobactersuspensioner behövs.

Koncentrationen av den nedfrysta blandningen förblir oförändrad i minst sex månader.

7. Referenser

Schijven, J.F., Havelaar, A.H. och Bahar, M. 1994. A simple and widely applicable method for preparing homogenous and stable quality control samples in water microbiology. Applied and environmental microbiology: Nov. s. 4160–4162.

SFS-EN ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and performance testing of culture media

Niemelä, S. HAMB1 220: Sisäisen vertailunäytteen valmistus. Pakastusmenetelmä. 18.10.1996.

8. Ändringar sedan föregående version

- 11.9.2018 Omnämmandet om ELMO-registrering av suspensioner raderades.
- 11.9.2018 Användningsändamålen för suspensioner preciserades och koncentrationen för kvalitativ testning och selektivitets- och specificitetstestning av medier ändrades från 10^5 cfu/0,1 ml till 10^4 cfu/0,1 ml.
- 11.9.2018 Anvisning för framställning av campylobactersuspensioner lades till.
- 11.9.2018 Anvisningen för framställning av suspensioner preciserades.
- 15.11.2018 Anvisningens namn preciserades.
- 15.11.2018 Anvisningen för räkning av koncentrationer preciserades.
- 15.11.2018 Anvisningen för framställning av campylobactersuspensioner preciserades.
- 15.11.2018 Små korrigeringar i språkdräkten.
- 4.11.2021 Möjlighet att förvara starka suspensioner för kvalitativ testning i kylskåp och använda samma rör under arbetsveckan lades till.

14.12.2018 Sidhuvudet uppdaterades enligt organisationsförändringen (1.1.2019). Teknisk uppdatering.