



Mikrobiologi

Framställning av bakteriesuspensioner för att säkerställa att odlingsmedier fungerar

Framställning av bakteriesuspensioner för att säkerställa att odlingsmedier fungerar

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 medier 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. Bakteriehållten i den odlade anrikningen bestäms med hjälp av spädningsserie och odling på platta medan anrikningen väntar i kylskåpstemperatur.

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

Mjölksuspensionen pipetteras i frysrör och förvaras i -70 °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, exempelvis *Campylobacter* och *Clostridium*.

2 Arbetssäkerhet

Vid arbete i ett mikrobiologiskt laboratorium iaktas verksamhetsbeskrivning LAB 223.

3 Utrustning och redskap

- 1) Mikrobiologisk basutrustning
- 2) Frys -70 °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



Mikrobiologi

Framställning av bakteriesuspensioner för att säkerställa att odlingsmedier fungerar

4 Medier och reagenser

- 1) Blodagar eller TSA-agar
- 2) TSB- 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 pepton saltlösning (PEPSU) eller 9 ml Dilucup
- 4) Fettfri (skummad) mjölk (Skim milk) 20 % (Skim milk lösning, 20 %) 50/100 ml
- 5) 2,0 ml frysör

5 Utförande

Dag 0

1. Gör renodling på 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 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.

Dag 2

3. Gör en spädningsserie av buljongen till -7 (eller enligt bakteriens kända tillväxt) och odla 0,1 ml av de tre största spädningarna i följd, då antalet på plattorna motsvarar spädningarna -6, -7 och -8. Odlade spädningarna på två parallella plattor (TSA/blodagar). Förvara buljongodlingen i 4 ± 2 °C tills odlingsresultatet är klart (ca 24 h).

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



Mikrobiologi

Framställning av bakteriesuspensioner för att säkerställa att odlingsmedier fungerar

Dag 3

1. Framställningen av suspensionerna dokumenteras på blankett LAB 7497. Suspensionerna registreras som skilda prover i ELMO och införs i systemets stamsamling.
 2. Fastställ halten på anrikningsbuljongen utgående från plattorna som gjorts med spädningsserien.
 3. 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: 60–120 cfu/0,1 ml
 - Testning av mediernas **selektivitet och specificitet**: 10^5 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.

4. Framställ mjölk suspensionen. Gör en ny spädningsserie av anrikningsbuljongen och tillsätt en lämplig volym av ovan fastställda spädning. Volymen som pipetteras kan avrundas neråt till närmaste 10 µl. Blanda väl och dela upp mjölk suspensionen som ska frysas i frysror i partier om 1,5 ml. Blanda noggrant mellan pipetteringarna.
5. Ympa 0,1 ml av mjölk suspensionen som ska frysas på fyra parallella TSA/blodagar för att konfirmera halten i suspensionen som ska frysas.

Av suspensioner som görs för testning av selektivitet eller specificitet (10^5 cfu/0,1 ml), framställ först en spädningsserie till -5 och sedan odlas de tre största spädningarna (-3, -4 och -5) som två parallella plattor.

Inkubera liksom ovan (dag 2).

6. Frys omedelbart till -70 °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

- 2 Räkna plattorna som odlats med den framställda bakteriesuspensionen. Märk halten i mjölk suspensionen för partiet rör i fråga på frysasken, på arbetsdokument och i ELMO.

Tina upp bakterieblandningen i högst 30 minuter i rumstemperatur då du behöver den. Du kan alternativt tina upp den i kylskåp över natten eller t.ex. i ett +37 °C värmeskap i högst 30 minuter.



Mikrobiologi

Framställning av bakteriesuspensioner för att säkerställa att odlingsmedier fungerar

6 Referenser

Schijven, J.F., Havelaar, A.H. ja 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.

ISO 11133:2004 Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media.

Niemelä, S. HAMB I 220: Sisäisen vertailunäytteen valmistus. Pakastusmenetelmä. 18.10.1996.

7 Ändringar sedan föregående version

Utarbetad av: Saija Hallanvuo, Riikka Ruohonen, Sirpa Peltola och Kirsi-Maria Eklund.

12.10.2017 Uppdatering av referensmetoden

12.10.2017. Vid övergången till IMS verksamhetssystem började numreringen av versionerna om från början (v1). Teknisk uppdatering

14.12.2018 Sidhuvudet har uppdaterats i enlighet med omorganisationen (1.1.2019). Teknisk uppdatering.