



Tidsensitive analyser Mikrobiologi

Indira Secic

Tidssensitive analyser

Cambridge Dictionary: «time sensitiv» is an adjectiv used to describe a product that has to be delivered by a particular time, or information that is only useful for a particular period

Begrepet er tatt i bruk av flere laboratorier for å beskrive analytiske metoder med definert maksimaltid mellom prøveuttak og analysestart

Prøvetaking for mikrobiologisk vannundersøkelse

- ISO 19458, pkt. 5:
 - drikkevannsprøver analyseres samme dag som prøveuttak
 - prøvene transporteres kjølig ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$), viktig å sikre at prøvene ikke fryser under transport
 - nødvendig med overvåking og registrering av temperatur for transport > 8 timer
 - $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ økning i temperatur gir 2-fold økning i bakterievekst og/eller bakteriedød

Anbefalte (R) og akseptable (A) verdier for lagringstid ved $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$

- ISO 19458, Annex B:

Parameter	Maks. lagringstid (inkludert transporttid)	
	Anbefalt (R)	Akseptabelt (A)
Kimtall	8	12
Fekale indikatorbakterier, vegetative	12	18
Sporer (Sulfittreduserende bakterier, Clostridium spp.)	24	72
Virus (Bakteriofager)	48	72
Fekale patogene bakterier (Salmonella spp. Enterobacteriaceae)	12	18
Enterovirus	48	72
Cryptosporidium og Giardia	24	96
Pseudomonas aeruginosa	8	12
Legionella spp.	24 (romtemperatur)	48
Cyanobacteria	48	72
Campylobacter spp.	24 (3 ± 2), oksygensensitiv	

Drikkevannsforskriften

§ 21. Minstekrav til drikkevannsprøver

- Analyser av drikkevannsprøver skal foretas i samsvar med internasjonale eller nasjonale standarder når slike foreligger. Der vedlegg 1 eller vedlegg 2 angir krav til analysemetoder, skal disse benyttes. Laboratoriene som benyttes, skal være akkreditert for de aktuelle analysene.

Vedlegg 1, Grenseverdier

- *Escherichia coli* – 0 cfu/100 ml, NS-EN ISO 9308-1 eller NS-EN ISO 9308-2
- Intestinale enterokokker – 0 cfu/100 ml, NS-EN ISO 7899-2

Vedlegg 2, Tiltaksgrenser

- *Clostridium perfringens* (inkludert sporer) – 0 cfu/100 ml, NS-EN ISO 14189
- Kimtall 22°C – 100 cfu/ml og ingen unormal endring, NS-EN ISO 6222
- Koliforme bakterier – 0 cfu/100 ml, NS-EN ISO 9308-1 eller NS-EN ISO 9308-2

Krav til analysestart etter prøveuttak

- NS-EN ISO 7899-2 (Intestinale enterokokker):
 - 6 timer etter prøveuttak hvis prøvene lagres ved romtemperatur
 - inntil 24 timer hvis prøvene lagres ved $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$
- NS-EN ISO 9308-1 eller NS-EN ISO 9308-2 (*Echerichia coli*, koliforme bakterier):
 - inntil 18 timer hvis prøvene lagres ved $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$
 - under spesielle omstendighetene kan prøvene lagres inntil 24 timer ved $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$

Krav til analysestart etter prøveuttak

- NS-EN ISO 6222 (Kimtall 22 °C):
 - inntil 12 timer hvis prøvene lagres ved 5 °C ± 3 °C
- NS-EN ISO 14189 (*Clostridium perfringens*):
 - inntil 18 timer hvis prøvene lagres ved 5 °C ± 3 °C for vegetative celler
 - inntil 72 timer hvis prøvene lagres ved 5 °C ± 3 °C for sporer

Avvik fra krav om analysestart etter prøveuttak

- Prøvene med forsinket analysestart tilfredsstill ikke krav i Drikkevannsforskriften
- Laboratoriet plikter å informere kunder om at analyse ikke tilfredsstill krav i Drikkevannsforskrift
- Analyseresultat som overskrider krav til analysestart i referansestandard kan ikke rapporteres akkreditert

Akkreditering av intern metode

- Analyse som avviker fra referanse standard (f.eks. analysestart etter 12 timer for ISO 6222) kan akkrediteres som intern metode
- Validering av metode utføres
- Søknad om utvidelse med tilhørende valideringsdokumentasjon sendes NA til gjennomgang
- Vedtak om utvidelse av akkrediteringsomfang

Forskrift om næringsmiddelhygiene (næringsmiddelhygieneforskriften)

Artikkel 5, Særlige regler for prøving og prøvetaking:

De analysemetodene og prøvetakingsplanene og -metodene som er oppført i vedlegg I, skal benyttes som referansemetoder.

Forskrift om næringsmiddelhygiene (næringsmiddelhygieneforskriften)

Bruk av alternative analysemetoder godtas forutsatt at de er:

- validert på grunnlag av den spesifikke referansemetoden fastsatt i vedlegg I, i samsvar med protokollen fastsatt i standard EN ISO 16140-2, og
- validert for næringsmiddelkategorien angitt i det relevante mikrobiologiske kriteriet fastsatt i vedlegg I, som den driftsansvarlige for næringsmiddelforetaket kontrollerer oppfyllelsen av, eller er validert for en lang rekke næringsmidler som omhandlet i EN ISO 16140-2.

§ 17. Mikrobiologiske kriterier for drikkevann på flaske

- *Clostridium perfringens* (inkl. sporer)
- *Escherichia coli*
- Intestinale enterokokker
- Kimtall 22 °C og 37 °C
- Koliforme bakterier
- *Pseudomonas aeruginosa*

Krav til metodestandard ikke angitt

Mikrobiologiske kriterier for næringsmidler

- *Listeria monocytogenes*: EN/ISO 11290-1
- *Salmonella*: EN ISO 6579-1
- Enterotoksiner framkalt av stafylokokker: EN ISO 19020
- *Cronobacter* spp.: EN ISO 22964
- *Escherichia coli*: EN/ISO 16649-3
- Histamin: EN ISO 19343
- Shigatoksinproduserende *E. coli* (STEC) O157, O26, O111, O103, O145 og O104:H4: CEN/ISO TS 13136

Hygienekriterier for prosessen

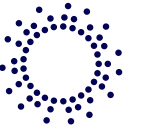
- Aerobe kimtall: EN ISO 4833-1
- Enterobacteriaceae: EN ISO 21528-2
- *Escherichia coli*: ISO 16649-1, -2 eller 3
- *Campylobacter* spp.: EN ISO 10272-2
- Koagulasepositive stafylokokker: EN/ISO 6888-1 eller 2
- *Bacillus cereus*: ISO 7932



Tidssensitive analyser

Vannkjemiske metoder

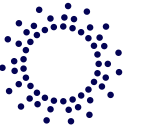
Åge Molvermyr (NORCE)



Tidssensitive analyser

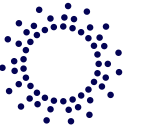
- Begrepet brukes om metoder som har definert en maksimalt tillatt tid mellom prøveuttak og analysestart
- Omfatter både metoder der prøver ikke forbehandles/konserves, og metoder der prøver blir forbehandlet/konservert





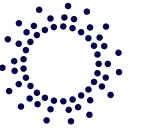
Prøvetaking for kjemisk vannundersøkelse

- ISO 5667-5 «Vannundersøkelse - Prøvetaking - Del 5: Veiledning i prøvetaking av drikkevann fra vannbehandlingsanlegg og distribusjonssystem»:
 - Drikkevannsforskriften sier at uttak av drikkevannsprøver skal foretas i samsvar med denne standarden
 - I pkt. 9 vises det til ISO 5667-3 for veiledning om konservering og behandling av prøver
 - Men sier: «Noen parametere, inkludert residual-klor, pH og turbiditet bør testes umiddelbart etter prøvetaking, da det er sannsynlig at de vil endre seg under transport og lagring»



Prøvetaking for kjemisk vannundersøkelse

- ISO 5667-3 «Vannundersøkelse - Prøvetaking - Del 3: Konservering og behandling av vannprøver»:
 - Spesifikk informasjon om konservering og behandling av prøver gis i Annex A for en rekke analysemetoder
 - Mange analytiske standarder refererer normativt til ISO 5667-3 (når spesifikk informasjon om prøvebehandling og lagringstid ikke gis i slike standarder, har informasjonen i Annex A i ISO 5667-3 normativ status)



Prøvebehandling og lagring

- ISO 5667-3 om transport og lagring av prøver:
 - Under transport skal prøvene oppbevares i en kjøleenhet som er i stand til å opprettholde en temperatur på $(5 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$
 - Registrering av temperatur bør gjøres for «proper evaluation» av forholdene under transport
 - Ved lagring i lab. er kravet $(3 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$

- ISO 5667-3 om lagring av prøver – definisjoner:
 - Lagringstid: perioden mellom prøveuttak og oppstart av analysen i laboratoriet
 - Konservering: for å stabilisere prøven i tiden fra prøveuttak til oppstart av analyse



Eksempler på maksimum lagringstid

Parameter	Standardmetode	Forbehandling/ Konservering	Maksimum lagringstid
Turbiditet	ISO 7027-1	Ingen (lagres mørkt) Unngå kontakt med luft	24 timer
pH	ISO 10523	Ingen (lagres mørkt) Unngå luft i prøveflasken	24 timer
Ledningsevne	ISO 7888	Ingen Prøveflasken fylles helt	24 timer
Farge	ISO 7887	Ingen (lagres mørkt) Unngå kontakt med luft	5 døgn
Total organisk karbon	EN 1484	Flyktige forbindelser? Surgjøring Frysing	8 timer 7 døgn Flere uker

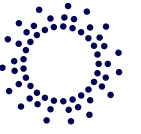


Eksempler på maksimum lagringstid

Utdrag fra ISO 5667-3

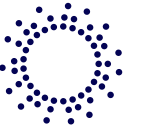
Table A.1 (continued)

Analyte to be studied	Reference International Standard	Type of container	Preservation and storage conditions additional to Clauses 8 and 11	Maximum storage times	Validated or Best practice
Tin	ISO 11885:2007 refers normatively to ISO 5667-3	For normal concentrations: PE-HD, PTFE	Acidify to pH 1 to pH 2 with HCl (5.2.3) or HNO ₃ (5.2.4).	1 month	Validated [87]
	ISO 17294-2:2016 refers normatively to ISO 5667-3	For low concentrations: PFA, FEP	HCl (5.2.3) should be used if the hydride technique is used for analysis.		
Total hardness: See <i>Calcium</i>					
Total solids (total residues, dry extract)		Plastics or glass		7 d	Best practice
Trihalomethanes: See <i>Volatile organic compounds</i>					
Turbidity	ISO 7027-1:2016 No reference to ISO 5667-3	Glass or plastics	Store samples in the dark or use dark-coloured bottles. Analyse preferably on site.	1 d	Best practice
Uranium	ISO 17294-2:2016 refers normatively to ISO 5667-3	Plastics or borosilicate glass	Acidify to pH 1 to pH 2 with HNO ₃ (5.2.4).	1 month	Best practice
Vanadium	ISO 15586:2003 refers normatively to ISO 5667-3	PE, PP, FEP	Acidify to pH 1 to pH 2 with HNO ₃ (5.2.4).	1 month	Best practice
	ISO 11885:2007 refers normatively to ISO 5667-3	For normal concentrations: PE-HD, PTFE			
	ISO 17294-2:2016 refers normatively to ISO 5667-3	For low concentrations: PFA, FEP			



Krav som følger av drikkevannsforskrift

- Analyser av drikkevannsprøver skal foretas i samsvar med internasjonale eller nasjonale standarder når slike foreligger
- Der vedlegg 1 eller 2 angir krav til analysemetoder, skal disse benyttes
 - For kjemiske/fysikalske analyser gjelder dette for turbiditet (ISO 7027-1) og total organisk karbon (EN 1484)
- Laboratoriene som benyttes skal være akkreditert for de aktuelle analysene



Avvik fra tidskrav for analysestart

- Overskridelse av maksimum lagringstid gitt i standardmetoder bryter med kravene i drikkevannsforskriften
 - Kunder må informeres om at analyser ikke tilfredsstillter krav i drikkevannsforskriften
- Analyseresultater kan i slike tilfeller ikke rapporteres akkreditert
- Hvis tidskrav ikke kan overholdes kan en intern metode akkrediteres
- Må valideres at fravik fra standardmetode gir akseptable resultater



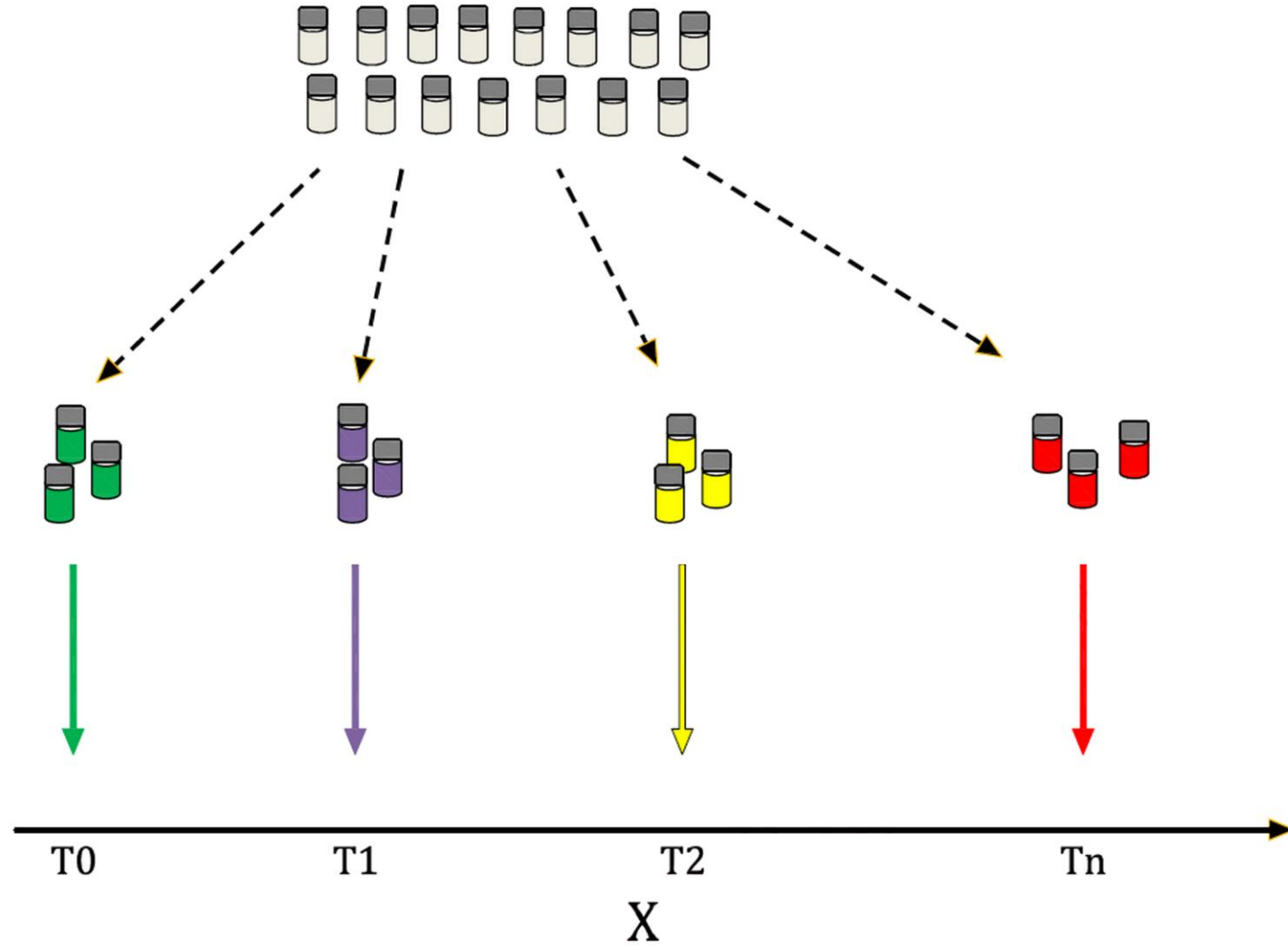
Validering av lagringstid for prøver

- ISO/TS 5667-25:2022 Water quality – Sampling – Part 25: Guideline on the validation of the storage time of water samples
- Beskrive fremgangsmåte og metodikker for å verifisere hvor lenge en prøve er stabil under spesifikke lagringsbetingelser (temperatur, matrise, lys, tilsetning av stabilisator - der det er aktuelt, type konservering osv.)
- Gjelder for kjemiske og fysikalsk-kjemiske analysemetoder
Biologiske og mikrobiologiske metoder er ikke omfattet



Validering av lagringstid; ISO/TS 5667-25

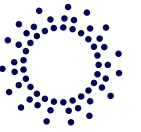
- Det kreves en analytisk metode med allerede karakteriserte egenskaper (repeterbarhet, reproduserbarhet, systematiske feil, nøyaktighet og usikkerhet)
- Stabilitetsstudie: en serie tester for å analysere variasjonene i verdien av en gitt parameter mellom en starttid og en maksimal tid, på representative prøver
- Brukes til å fastslå maksimal akseptabel tid før analysestart





Validering av lagringstid; ISO/TS 5667-25

- Krever nøye planlegging, og gjennomføring av omfattende forsøk for å verifisere akseptabel lagringstid på tilfredsstillende statistisk grunnlag
- Krever statistisk kompetanse



Validering av lagringstid; ISO/TS 5667-25

- Stadier i en stabilitetsstudie
 - Definere omfang og krav (analytter, matrikser, konsentrasjonsnivåer, lagringsbetingelser, lagringstid, maksimalt akseptabelt avvik)
 - Definere plan for eksperimenter (type studie, antall tidsintervaller, total varighet)
 - Utføre testene (og overvåke og dokumentere alle lagringsforhold)
 - Validere resultatene (statistiske analyser)
 - Framstille og vurdere resultatene for å bestemme maksimum akseptabel lagringstid (“maximum acceptable delay before analysis”), i forhold til maksimalt akseptabelt avvik



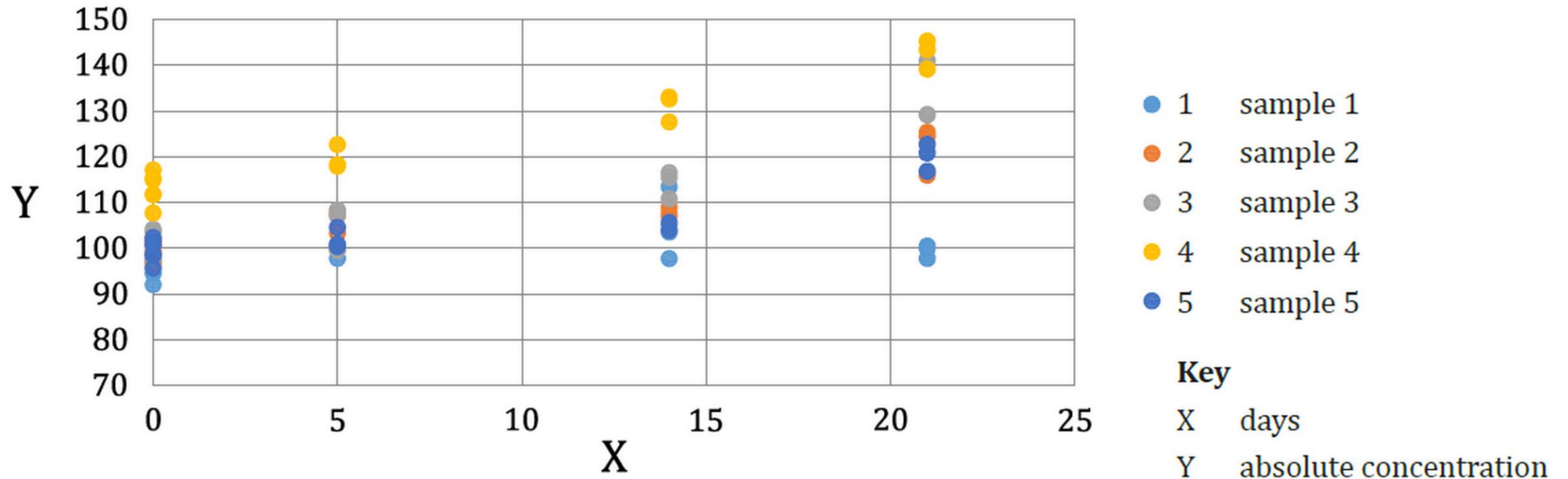
Validering; eksempel fra ISO/TS 5667-25

- 5 ulike matrikser av vann
- Varighet: 22 dager
- Oppbevaring: (3 ± 2) °C i kjølerom
- Maksimum tillatt avvik: 10 %



Validering; eksempel fra ISO/TS 5667-25

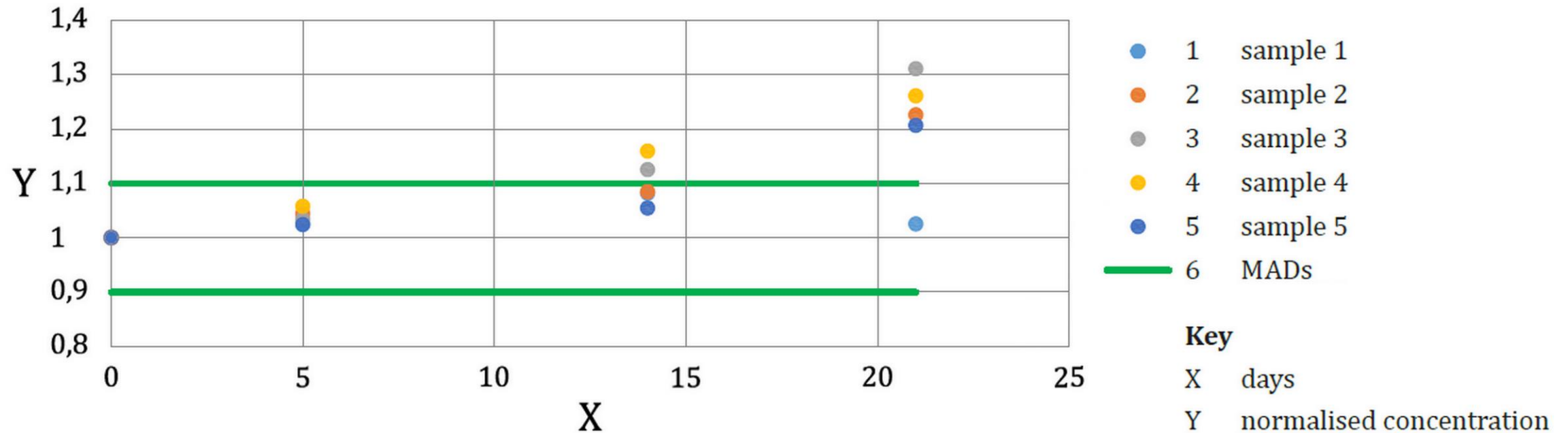
Rådata:





Validering; eksempel fra ISO/TS 5667-25

Normaliserte data, gjennomsnitt pr. prøvetype:



➤ Maksimum akseptabel lagringstid er 5 dager for alle vanntyper

Thank you. Takk.
Merci. Gracias. Obrigado.

Åge Molversmyr
agmo@norceresearch.no

norceresearch.no

NORCE