

# Sterilkontroll av helkonserver



Illustrasjon: Nofima

Nofima er et ledende matforskningsinstitutt som driver med forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien. Vi leverer internasjonal anerkjent forskning og løsninger som gir næringslivet konkurransefortrinn langs hele verdikjeden.

«Bærekraftig mat til alle» er vår visjon.

### Kontaktinformasjon

Telefon: 77 62 90 00

post@nofima.no

www.nofima.no

NO 989 278 835 MVA



#### Hovedkontor Tromsø

Muninbakken 9–13

Postboks 6122

NO-9291 Tromsø



#### Stavanger

Måltidets hus

Richard Johnsensgate 4

Postboks 8034

NO-4068 Stavanger



#### Sunnalsøra

Sjølsengvegen 22

NO-6600 Sunndalsøra



#### Ås

Osloveien 1

Postboks 210

NO-1433 ÅS



#### Bergen

Kjerreidviken 16

Postboks 1425 Oasen

NO-5844 Bergen

## Rapport

<i>Rapportnummer:</i> 26/2022	<i>ISBN:</i> 978-82-8296-728-0	<i>ISSN:</i> 1890-579X
<i>Dato:</i> 15. november 2022	<i>Antall sider + sider vedlegg:</i> 20 + 4	<i>Prosjektnummer:</i> 11511
<i>Tittel:</i> <b>Sterilkontroll av helkonserver</b>		
<i>Title:</i> Sterile testing of shelf stable foods		
<i>Forfatter(e):</i> Jan Thomas Rosnes		
<i>Avdeling:</i> Prosessteknologi		
<i>Oppdragsgiver:</i> Norges forskningsråd, bransjeprogram		
<i>Eksternt prosjektnummer/Oppdragsgivers ref.:</i> -		
<i>Stikkord:</i> Helkonserver, mikrobiologi, analyse av sterilitet		
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Norske forskrifter krever at alle produsenter av helkonserver skal gjennomføre mikrobiologisk steriltesting på et godkjent laboratorium. Denne rapporten omhandler mikrobiologisk analyse av helkonserver basert på en metode fra Nordisk Metodiskomite for Levnedsmidler (NMKL). Rapporten belyser svake og sterke sider ved metoden og erfaringer som er gjort ved Nofimas (og tidligere Nrconservs) mikrobiologiske laboratorium		
<i>English summary/recommendation:</i> Norwegian regulations require that all producers of canned food must carry out microbiological sterile testing at an approved laboratory. This report deals with microbiological analysis of canned foods based on a method from the Nordic Methodological Committee for Foodstuffs (NMKL). The report highlights weak and strong aspects of the method and experiences made at Nofima's (and formerly Nrconserv's) microbiological laboratory		

## **Forord**

Denne rapporten er en oppdatert versjon av rapport 19/1999 utgitt av Norconserv, prosjektet bel finansiert av Norges forskingsråd sitt bransjeprogram. Norconserv er i ettertid blitt en del av Nofima AS.

## Innhold

<b>1</b>	<b>Bakgrunn</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Innledning</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Definisjoner</b>	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>Metode til sterilkontroll</b>	<b>6</b>
4.1	Metode til holdbarhetsprøving	6
4.2	Steriltesting av helkonserver NMKL 59	6
4.2.1	Anvendelsesområde	6
4.2.2	Definisjon	6
4.2.3	Prinsipp	6
4.2.4	Bakteriekulturer	6
4.3	Medier og reagenser	6
4.3.1	Kjøttekstraktbuljong (næringsrik)	7
4.3.2	Robertsons substrat	7
4.3.3	Maltekstraktbuljong	7
4.3.4	MRS-buljong	7
4.3.5	MRS-agar	7
4.3.6	Plate count agar	7
4.3.7	Oxytetracyclin-Glucose-Gjærekstrakt agar	8
4.4	Instrumenter og utstyr	8
4.5	Prøveuttak, opparbeidelse og analyse	8
4.6	Utførelse	9
4.7	Supplerende undersøkelser	10
4.8	Tolking av resultatene	11
4.9	Konfirmering	11
4.10	Resultatangivelse	11
4.11	Metodens følsomhet	11
4.12	Arkivering	11
4.13	Avfallsbehandling	12
<b>5</b>	<b>Resultater og diskusjon</b>	<b>13</b>
5.1	Valg av metode (Ref 4.1)	13
5.1.1	Andre beskrevne metoder	13
5.2	Anvendelsesområde (4.1.1)	14
5.3	Bakteriekulturer (4.1.4)	14
5.4	Robertsons substrat (4.2.2)	14
5.5	Instrumenter og utstyr (4.3)	15
5.5.1	Sterilisering av overflaten	15
5.5.2	Hull i boksen	15
5.6	Uttak av prøve	16
5.6.1	Alternative redskap for å ta ut prøve fra boksen	16
5.7	Prøveuttak	16

5.7.1	Forskjellige arbeidsteknikker ved prøveuttak	16
5.8	Mikroskopering	17
5.9	Sporefarging	18
<b>6</b>	<b>Tolkning av resultater</b>	<b>19</b>
<b>7</b>	<b>Referanser</b>	<b>20</b>
<b>8</b>	<b>Vedlegg</b>	<b>i</b>
8.1	Vedlegg 1 - Tolkningsskjema - Sterilkontroll av helkonserver	i
8.2	Vedlegg 2 - Feilsøkingsskjema for usterile bokser, Del 1	ii
8.3	Vedlegg 3 Tolkningsskjema for usterile bokser. Kun for renkulturer.	iv

# 1 Bakgrunn

Norsk fiskehermetikk har helt siden hermetikkindustrien vokste frem før århundreskiftet vært basert på eksport. Det var den lille brislingen som i form av røykte norske sardiner ble en verdensartikkel. Men en rekke hermetiske produkter som fiskeboller, torskerogn, sildesardiner, kippers, krabbe, osv. fikk også stor betydning. Dessuten kom de såkalte salte varer, eller kjølekonservener som gaffelbiter, ansjos, kaviar (som ikke er hermetikk i egentlig forstand) tidlig med. Produksjon av kjøttthermetikk var allerede kommet i gang før produksjonen av hermetiske fiskevarer ble tatt opp.

Hermetikkindustriens produkter var rettet både mot eksport og forbruk på hjemmemarkedet.

Hermetikkindustrien møtte selvfølgelig mange problemer for sine produkter både kvalitetsmessig og teknisk når produktene skulle omsettes over store deler av verden. Det kan her blant annet pekes til holdbarhet over mange år.

Hermetikkindustrien tok selv initiativet til å bygge opp kvalitetskontrollen for sine produkter og startet tidlig med å utarbeide spesifikasjoner for olivenolje som benyttes til sardiner, og ikke minst krav til fortinnet hvitblikk og annet emballasjemateriale.

Fra 1931 opprettet industrien sitt eget laboratorium, Hermetikkindustriens Laboratorium, som gjorde et grunnleggende arbeide med analyser av råstoffer, forbedret produksjonsteknikk, krav til hjelpestoffer til produktene og emballasjematerialer. Og det var særdeles viktig at laboratoriet lærte industrien å kontrollere sine prosesser og produkter gjennom de metoder som ble utarbeidet.

Men en organisert kvalitetskontroll av industriens produkter manglet, bortsett fra en viss handelsmessig kvalitetsendring som hermetikkcentralene hadde gjennomført for sardiner og kippers. Det ble i 1949 opprettet en kvalitetskontrollavdeling ved Hermetikkindustriens Laboratorium som fikk i oppdrag å kontrollere middagshermetikk av kjøtt og fisk etter bestemmelsene av Prisdirektoratet, og føre kontroll med krabbehermetikken som ble eksportert. Fiskeridepartementet tok så i 1950 initiativet ved å nedsette en komite som skulle utrede behovet for en offentlig kvalitetskontroll av hermetiske fiskevarer. Innstillingen konkluderte med å foreslå opprettet et frittstående og selvstendig institutt til å bygge ut offentlig kvalitetskontroll av fiskehermetikk. Fiskeridepartementet opprettet Hermetikkindustriens Kontrollinstitutt ved kgl.res. av 20 mars 1953, og Departementet fastsatte i 1954 etter innstilling fra Instituttets Råd offentlige forskrifter for 1) fiskeråstoff til hermetikkindustrien og 2) generelle forskrifter for ferdigvarekontrollen samt produksjons- og ferdigvareforskrifter for fiskehermetikk m.v.

Ferdigvarekontrollen skulle utøves og administreres av hermetikkindustriens Kontrollinstitutt. Kontrolllaboratorium ble innredet i Hermetikkfagskolens bygg i Stavanger i 1952. Fiskeridepartementet oppnevnte et Råd som var styre for Instituttet og rådet fikk spesiell fullmakt til å fastsette standardkrav for de enkelte produkttyper. Kvalitetskontroll av hermetiske kjøttvarer ble gjennomført fra 1953 etter samme mønster som for hermetiske fiskevarer, men denne kontrollen var basert på en frivillig avtale mellom produsentene og Kontrollinstituttet.

Oppgavene var mange for det nye instituttet. Generelt kan man si at Kontrollinstituttet ble bygget opp som et samarbeidende organ mellom fiskerene, hermetikkindustrien, Fiskeridirektøren, Staten v/Fiskeridepartementet og forbrukerne både på eksportmarkedet og på hjemmemarkedet. Hovedoppgaven for instituttet var å bygge opp en faglig og teknisk-vitenskapelig høy standard for hermetikkproduksjon. De viktigste punktene kan summeres opp i punktene 1) kontroll av fabrikklegg og tekniske krav til produksjonsutstyr og hygiene i fabrikkene 2) produksjonskontroll for å øke sikkerheten ved produksjonsprosessene og 3) ferdigvarekontroll for kvalitet, helsemessig sikkerhet og produktenes holdbarhet.

Analyser som ble gjennomført ved kontrollaboratoriet i Stavanger omfattet bl.a.: 1) kvalitetsbedømmelse, 2) kjemiske analyser av produktenes sammensetning og næringsverdi, 3) bakteriologiske undersøkelser og 4) emballasjekontroll.

Fra 1967 ble det også gjennomført kvalitetskontroll av pasteuriserte fiskeprodukter i plastemballasje og fra 1975 er blandingsprodukter av kjøtt, fisk og proteinkonsentratet kommet med.

I 1994 ble all offentlig kontroll av næringsmidler lagt inn under de offentlige kommunale næringsmiddeltilsyn og Fiskeridirektoratets kontrollaboratorier. Fra samme tidspunkt ble Kontrollaboratoriet ved Hermetikkindustriens Laboratorium (som på dette tidspunkt hadde byttet navn til NORCONSERV) langt ned. Dette betydde at den kompetansen innen hermetikk som var opparbeidet og samlet på et sted gjennom 30 år ble nå spredt på mange laboratorier. Det ble opp til myndighetene å sørge for at kunnskap om kontroll av hermetikk fremdeles ble ivaretatt gjennom de offentlige laboratorier.

Etter nedleggelsen av Kontrollinstituttet i Stavanger har NORCONSERV arbeidet med å ivareta og videreutvikle både den spesielle kompetansen som Kontrollinstituttet opparbeidet og de generelle kunnskaper som Hermetikkindustriens Laboratorium hadde. Det har også vært et mål å spre informasjon og kunnskap om hermetikk, noe som er gjort gjennom seminarer, kursvirksomhet, rapporter og annet skriftlig materiell. Denne rapporten er et ledd i spredningen av informasjon om hermetiske produkter og den tar for seg mikrobiell sterilkontroll av helkonserver og tolkning av årsaksforhold av usterile bokser.



## 2 Innledning

Helkonserver har en holdbarhet på mange år ved romtemperatur. Forutsetningen er at maten i boksen er gjort steril ved varmebehandling og at boksen er tett slik at reinfeksjon ikke kan forekomme. I de fleste tilfeller vil helkonserver være synonymt med hermetikkbokser, men det finnes i dag også helkonserver i plastemballasje som er stiv eller halvstiv. I denne rapporten er hovedoppmerksomheten gitt hermetikkbokser av metall, men informasjonen kan også benyttes på andre emballasjetyper.

Både varmebehandlingen og lukkingen av boks (falsingen) er kritiske kontrollpunkter i produksjon av hermetikkbokser. For å sikre at de kritiske kontrollpunktene er i overensstemmelse med gjeldene krav og interne rutiner gjennomføres det kontinuerlig målinger og dokumentasjoner som ledd i bedriftens kvalitetssikringsystem. I tillegg til dette har offentlige myndigheter laget forskrifter med krav om at bedriften med jevne mellomrom skal teste at hermetikkboksene er sterile ved bruk av mikrobiologiske analyser (jfr. § 15, Kvalitetsforskrift for Fisk og Fiskevarer, Fiskeridept., 1996). Steriltesting skal gjøres på et godkjent mikrobiologisk laboratorium. I praksis betyr dette at laboratoriet skal være akkreditert. For tiden brukes standarden NS EN 45001 (Norges Standardiseringsforbund, 1989).

Hvis en har mistanke om usterile bokser er det viktig at en på et tidlig tidspunkt finner ut hvorfor boksen er usteril. I de fleste tilfeller vil usterile bokser ha en mikrobiell årsak, men det kan også forekomme ikke-mikrobielle årsaker. Hvis den er av mikrobiell art, er neste steg å finne ut om årsaken til usterilitet kan tilskrives forhold:

- 1) før varmebehandling
- 2) under varmebehandlingen
- 3) etter varmebehandlingen (re-infeksjon)

Boksens historie med all bakgrunnsinformasjon, både for mikrobielle og ikke-mikrobielle forhold, bør vurderes før laboratorietester utføres.

Det normale utseende av et produkt er kjent på forhånd av produsenten og det er derfor nyttig å undersøke normale sterile bokser fra samme parti. Boksen bør sjekkes utvendig, og spesielt må fals og sømsjekk utføres. Hvis nok prøver er tilgjengelige bør både noen få usterile og noen få normale bokser bli åpnet på benken og sammenlignes; f.eks. direkte mikroskopering, måling av pH i produktet, test av lukt, inntrykk av produktets/lakens utseende, test av korrosjon i boksens innside. Resultatene av en slik innledende undersøkelse vil i de fleste tilfeller lede mot et årsaksforhold og angi hvor en skal sette inn innsatsen for å klarlegge et årsaksforhold. I mange tilfeller vil erfaringen kunne diagnostisere feilen på et tidlig tidspunkt og eliminere tidkrevende og kostbare analyser. Unntatt fra dette er analysene som er nødvendig for å dokumentere årsaksforholdet som en er kommet fram til og eventuell dokumentasjon av at en har gjenvunnet kontroll over produksjonen (CFRA Microbiologically Panel in conjunction with the R.A., 1985).

### 3 Definisjoner

#### **Desinfeksjon**

Reduksjon av antall mikroorganismer, uten å påvirke matvaren i ugunstig retning - ved hjelp av hygienisk tilfredsstillende kjemiske virkemidler og/eller fysiske metoder, - til et nivå som ikke vil føre til en skadelig forurensing av matvaren.

#### **Drikkevannskvalitet**

Vann som er egnet til å inntas av mennesker. Drikkevannsstandardene er i dag harmonisert med EØS-standardene og de er spesifisert av Statens Næringsmiddeltilsyn.

#### **Fleksibel emballasje**

Den fylte og forseglede emballasjens form eller konturer blir påvirket av innholdet.

#### **Halvstiv emballasje**

Den fylte og forseglede emballasjens form eller konturer blir ikke påvirket av innholdet under normal atmosfærisk temperatur og trykk, men kan deformeres ved et ytre mekanisk trykk under 0,7 kg/cm<sup>2</sup> (10 psig), det vil si normalt fast fingertrykk.

#### **Hermetisert matvare**

Kommersielt steril matvare i hermetisk lukket emballasje. Både vegetative bakterier og sporer er drept eller inaktivert i løpet av produktets holdbarhetstid.

#### **Hermetisk lukket emballasje**

Emballasje utformet for å beskytte innholdet mot at mikroorganismer kommer inn under og etter varmebehandlingen.

#### **Kodeparti**

All vare produsert i løpet av en tidsperiode identifisert med et eget kodemerke på emballasjen.

#### **Kommersiell sterilitet i varmebehandlede matvarer**

Den tilstand som oppnåes ved hjelp av varme, alene eller i kombinasjon med annen hensiktsmessig behandling, tilstrekkelig til å gjøre matvaren fri for mikroorganismer som er i stand til å vokse ved den normale, ikke nedkjølt tilstand som matvaren sannsynligvis vil bli oppbevart under ved distribusjon og lagring.

#### **Likevekts-pH**

pH i den totalblandete og finhakkede, ferdig varmebehandlede matvaren.

#### **Oppvarmingskurve**

Et grafisk bilde av hastigheten i temperaturendring i matvaren under hele varmeprosessen. Denne bli vanligvis plottet på halvlogaritmisk, grafisk papir slik at temperaturen på en omvendt logaritmisk skala blir plottet mot tid på en lineær skala.

#### **Pasteurisering**

En varmebehandling valgt for å drepe vegetative mikroorganismer, hvor varens temperatur vanligvis ikke overstiger 100 °C. Sporer vil overleve pasteurisering og vil kunne spire til nye bakterier.

**Produktemballasje**

Emballasje utformet for å fylles med matvare og lukkes hermetisk.

**Steriliseringstemperatur**

Den temperatur som skal holdes gjennom hele varmebehandlingen slik som spesifisert i den fastlagte prosess.

**Steriliseringstid**

Tiden mellom det øyeblikk steriliseringstemperatur oppnås og det øyeblikk kjøling startes.

**Stiv emballasje**

Den fylte og forseglede emballasjens form eller konturer blir hverken påvirket av innholdet eller deformert ved ytre trykk opp til  $0,7 \text{ kg/cm}^2$  (10 psig), det vil si normalt fast fingertrykk.

**Sure matvarer**

Matvarer med naturlig pH på 4,5 eller lavere.

**Svakt sur matvare**

Enhver matvare, unntatt alkoholholdige drikker, der alle komponenter har en pH-verdi som er høyere enn 4,5 etter varmebehandling.

**Sveiseflater**

På halvstiv emballasje eller fleksibel emballasje, de flater som sveises sammen for å lukke emballasjen.

**Syrebehandlede, svakt sure matvarer**

Matvarer som er behandlet slik at de har nådd en pH-likevekt på 4,6 eller lavere etter varmebehandling.

**Termostatprøver**

Prøver av den varmebehandlede matvare som holdes ved en bestemt temperatur i en bestemt tid for å avgjøre om mikroorganismer vokser under disse forhold.

**Vannaktivitet ( $A_w$ )**

Forholdet mellom vandamptrykket i varens overflate og damptrykket over rent vann ved samme temperatur.

## 4 Metode til sterilkontroll

### 4.1 Metode til holdbarhetsprøving

Forut for steriltestingen skal det gjennomføres en inkubering av helkonserverne ved en temperatur som er høyere enn normal romtemperatur. Målet er å skape gode vekstforhold for mikroorganismer slik at disse vil vokse fortere og gjøre det mer sannsynlig å identifisere dem ved mikrobiell analyse. Metoden til holdbarhetstesting er beskrevet i NMKL nr. 47 (2.utg, 1994). I følge metoden skal svakt sure produkter (pH over 4,5) termostatprøves i 14 døgn ved 30 °C og 55 °C. Produkter med lavere pH (4,5 eller lavere) termostatprøves i 14 døgn ved 25 °C.

Norske forskrifter sier at helkonserver skal termostatprøves ved 37 °C i 7 dager eller 35 °C i 10 dager (Kvalitetsforskrift for fisk og fiskevarer, 1996). Dette er andre tider og temperaturer en det som er angitt i NMKL nr. 47. Se diskusjon av inkubasjonstemperatur i kapittel 5.1.

### 4.2 Steriltesting av helkonserver NMKL 59

For testing av sterilitet av helkonserver benyttes ved vårt laboratorium en modifisert utgave av NMKL nr. 59 (NMKL, 1991). I dette kapittel gjennomgås metoden trinn for trinn. Viktige deler av metoden blir vurdert og kommentert i kapittel 5 med referanse til dette kapittel.

#### 4.2.1 Anvendelsesområde

Metoden er en rutinemetode for mikrobiologisk undersøkelse av helkonserverte næringsmidler. Undersøkelsen gir opplysninger om innholdet i helkonserver er sterilt, eller om det inneholder mikroorganismer som følge av understerilisering eller rekontaminering.

#### 4.2.2 Definisjon

Ved helkonserver forstår vi næringsmidler som er pakket i emballasje og som beskytter mot inntrengning av mikroorganismer under og etter varmebehandling. Varmebehandlingen må være tilstrekkelig til å uskadeliggjøre helseskadelige mikroorganismer og forhindre at andre mikroorganismer formerer seg under de betingelser som næringsmiddelet normalt distribueres og lagres ved.

#### 4.2.3 Prinsipp

Undersøkelsen tar sikte på å konstatere om det kan påvises levende mikroorganismer av den typen som er beskrevet under definisjonen, ved uttak og dyrking av cirka 1 g store prøver på hvert av de nedenfor angitte næringssubstrater. Metoden er modifisert fra dyrking ved 30 °C i 14 dager til dyrking ved 37 °C i 7 dager. Forinkubering er beskrevet i NMKL nr. 47 (NMKL, 1994).

Som supplement til de mikrobiologiske dyrkinger foretas direkte mikroskopi av prøvematerialet, måling av pH, inspeksjon og undersøkelse av emballasjen og sensorisk bedømmelse av innholdet.

#### 4.2.4 Bakteriekulturer

Som kontrollstamme for aerob vekst benyttes stamme *E.coli* CCUG 17620, for anaerob vekst benyttes *Clostridium perfringens* ATCC 13124.

## 4.3 Medier og reagenser

Alle kjemiske reagenser er av analytisk kvalitet (p.a). Mediene lages, kontrolleres og oppbevares som beskrevet i Generell mikrobiologiske prosedyrer.

#### 4.3.1 Kjøtttekstraktbuljong (næringsrik)

<b>Pepton</b>	<b>10 g</b>
Kjøtttekstrakt	5 g
Natriumklorid (NaCl)	5 g
Destillert vann	1000 ml
Juster pH til cirka	7,2

Løs stoffene ved oppvarming. Fordel substratet på 20 ml kulturrør med cirka 10 ml i hvert og autoklaver ved 121 °C i 15 minutter

#### 4.3.2 Robertsons substrat

Hakk renskåret hjertemuskelatur av storfe, tilsett vann (1 liter til 500 g kjøtt) og kok i 30 minutter. Filtrer fra kokevannet. Trykk det meste av den ennå resterende væske fra kjøttet med filterpapir. Kjøttet kan pakkes i aluminiumsfolie og oppbevares dypfryst.

Ved fremstilling av substratet, fyll det hakkede, kokte kjøttet i 20 ml kulturrør i cirka 2 cm høyde og hell oppi 10 ml næringsrik kjøtttekstraktbuljong.

Løs tryptose og natriumklorid i kokevannet ved oppvarming. Autoklaver rørene med kjøtt og buljong ved 121 °C i 15 minutter.

Rørene oppbevares i en anaerobkolbe etter autoklaving. En kan alternativt umiddelbart før poding sette rørene i kokende vannbad i 15–20 minutter for å drive ut oksygen som er absorbert i væsken. En vanlig prosedyre er at rørene med kjøtt oppbevares i kjøleskap og kokes umiddelbart før bruk. Er en interessert i å iakttå om det er gassutvikling kan en benytte Durhamrør som står opp ned inni glassrørene.

#### 4.3.3 Maltekstraktbuljong

Merck 1.05 397. Dehydrert medium veies inn: 17 g/l i destillert vann. pH  $4,8 \pm 0,2$ . Fordel substratet cirka 10 ml på 20 ml kulturrør og steriliser ved 115 °C i 10 minutter.

#### 4.3.4 MRS-buljong

Merck 1.10661. Dehydrert medium veies inn: 52,2 g/l i destillert vann. pH  $5,2 \pm 0,2$ . Fordel substratet på 20 ml kulturrør og steriliser ved 121 °C i 15 minutter.

Ved undersøkelse av sterkt sure produkter (pH < 4,6) , senk pH i substratet ved hjelp av melkesyre til den karakteristiske pH i gjeldende vare.

#### 4.3.5 MRS-agar

Merck prod. nr. 1.10660. Dehydrert medium veies inn med 66,2 g/l destillert vann. Autoklaveres ved 115 °C i 15 minutter pH  $5,7 \pm 0,2$  ved 25 °C.

#### 4.3.6 Plate count agar

Merck 1.05463.0500. Dehydrert medium veies inn: 22,5 g til 1000 ml destillert vann. Løses under oppvarming. Autoklaveres ved 121 °C i 15 minutter, pH etter autoklaving skal være  $7,2 \pm 0,2$  ved 25 °C.

#### 4.3.7 Oxytetracyclin-Glucose-Gjærekstrakt agar

(OGYE-agar) Merck 10877. Løs opp 30 g til 1000 ml dest vann. Løs opp under oppvarming. Autoklaver ved 121 °C i 15 minutter. Når temperaturen er kommet ned i 50 °C tilsettes 0,1 g til 1000 ml av sterilfiltrert oxytetracyclin løsning. pH etter autoklaving skal være  $6,5 \pm 0,2$  ved 25 °C.

#### 4.4 Instrumenter og utstyr

For å åpne boksene brukes sterilt dor av stål. Den er cirka 25 cm lang og har en diameter på cirka 1 cm og er forsynt med håndtak. Den steriliseres ved sprit avbrenning umiddelbart før bruk. Med jevne mellomrom skal doret autoklaveres ved 121 °C i 15 minutter.

Skalpell og pinsett eller andre instrumenter, engangsutstyr eller av steriliserbart materiale, brukes til åpning av fleksibel emballasje.

Prøvemateriale tas ut med egnet utstyr beregnet på prøvens beskaffenhet. Hvis mulig brukes rør av glass til å ta ut prøvemateriale. Rørene skal ha en innvendig diameter på cirka 7 mm. Rørene proppes med bomull i den ene enden og steriliseres i et rørkogger i autoklav ved 121 °C i 15 minutter. Et enkeltrør tas ut sterilt og brukes for hver prøve. Hvis prøven er av fast materiale brukes steril metallspatel, engangs plast-spatel eller sterile plastøser.

For å dyrke anaerobt brukes anaerob kolber med indikator som viser at oksygen er fjernet i kolbens atmosfære.

Annet nødvendig utstyr:

- inkubator (30/37 °C)
- inkubator (55 °C)
- vekt til veiing av ingredienser til medier
- pH-meter til pH-kontroll av medier
- autoklav for sterilisering av medier og utstyr
- evt. tørrsterilisator for sterilisering av utstyr
- sterilbenk/LAF-benk

#### 4.5 Prøveuttak, opparbeidelse og analyse

Uttak av representativ prøve, fortynning og opparbeidelse utføres etter Generell mikrobiologisk praksis. Undersøk emballasjen for tydelige feil som for eksempel rust, utetthet (langs fals og svekksoner) eller deformering. For registrering av feil, skader eller annen informasjon om emballasjen og innhold kan det brukes et eget skjema. Et eksempel på slikt skjema er vist i Vedlegg 1.

Spesielt viktig er det å undersøke om det er noe unormalt ved falsene/ sveisene/ åpningsmekanismene (svekksoner). Det er utarbeidet egne skjema og rapporter som omhandler fals og hvordan denne skal undersøkes (Thorpe & Barker, 1984; Innstilling og kontroll av fals 1998). Anmerk eventuelle deformasjoner. Noter eventuelle feil sammen med emballasjens merking (fabrikat, produktbetegnelse, kode osv.) Rengjør emballasjen med såpe, vann og kost før undersøkelsen, dersom den er uren. Sett enden som skal åpnes i et bad av sprit, slik at hele endeflaten er dekket med sprit (ca. 10 min). Boksene settes i steril-benken og uttak av prøve foregår der. Det benyttes en sterilbenk med filtrert bakteriefri luft (Også kalt LAF-benk, Laminar Air Flow). En skal bruke engangs plasthansker ved åpning av bokser og uttak av prøve. Senk beskyttelsesglasset i laf-benken ned slik at en ikke kan puste på prøven. Desinfiser den siden av emballasjen som skal åpnes med 70 % sprit og flambér overflaten.

Dersom emballasjen ikke tåler flambering (papp, plast etc.) må en vaske omhyggelig med sprit. Åpne emballasjen ved å bore eller slå et sterilt dor gjennom den. Dersom det ikke er gjennomførlig å benytte dor ved åpningen desinfiseres og åpnes emballasjen på mest hensiktsmessig måte.

Bor ut eller sug opp representativ prøve av innholdet ved hjelp av sterile rør eller pipetter og pod straks over i substrater. Ta dessuten et utstryk eller en dråpe på et objektglass til direkte mikroskopisk undersøkelse ved fasekontrastmikroskop eller mikroskopi av fiksert, farget preparat.

Oppbevar emballasjen i kjølerom til den bakteriologiske undersøkelsen er avsluttet. Dekk til åpningen med steril bomull eller tape, eller overfør materialet sterilt til rør eller petriskåler.

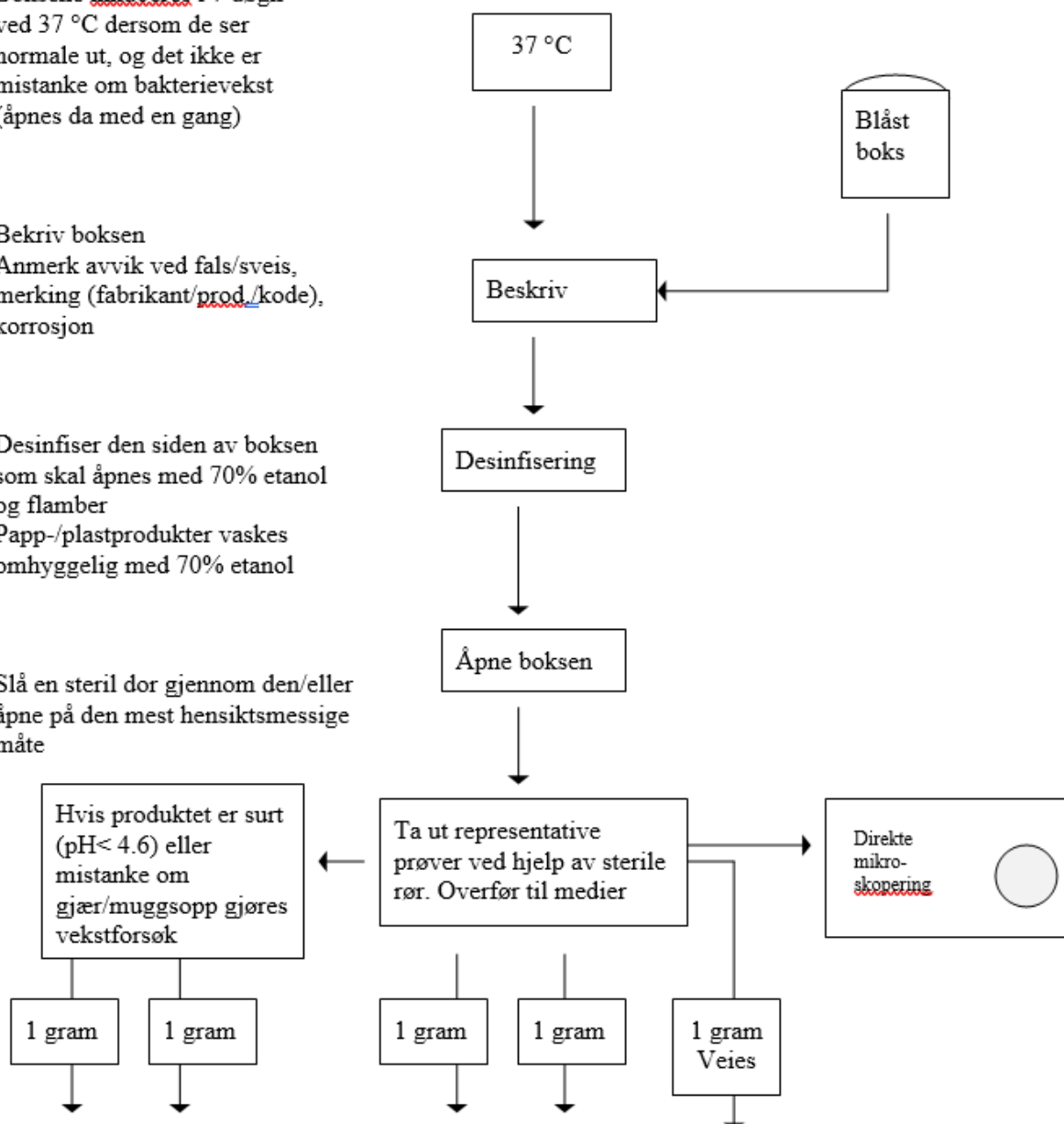
## 4.6 Utførelse

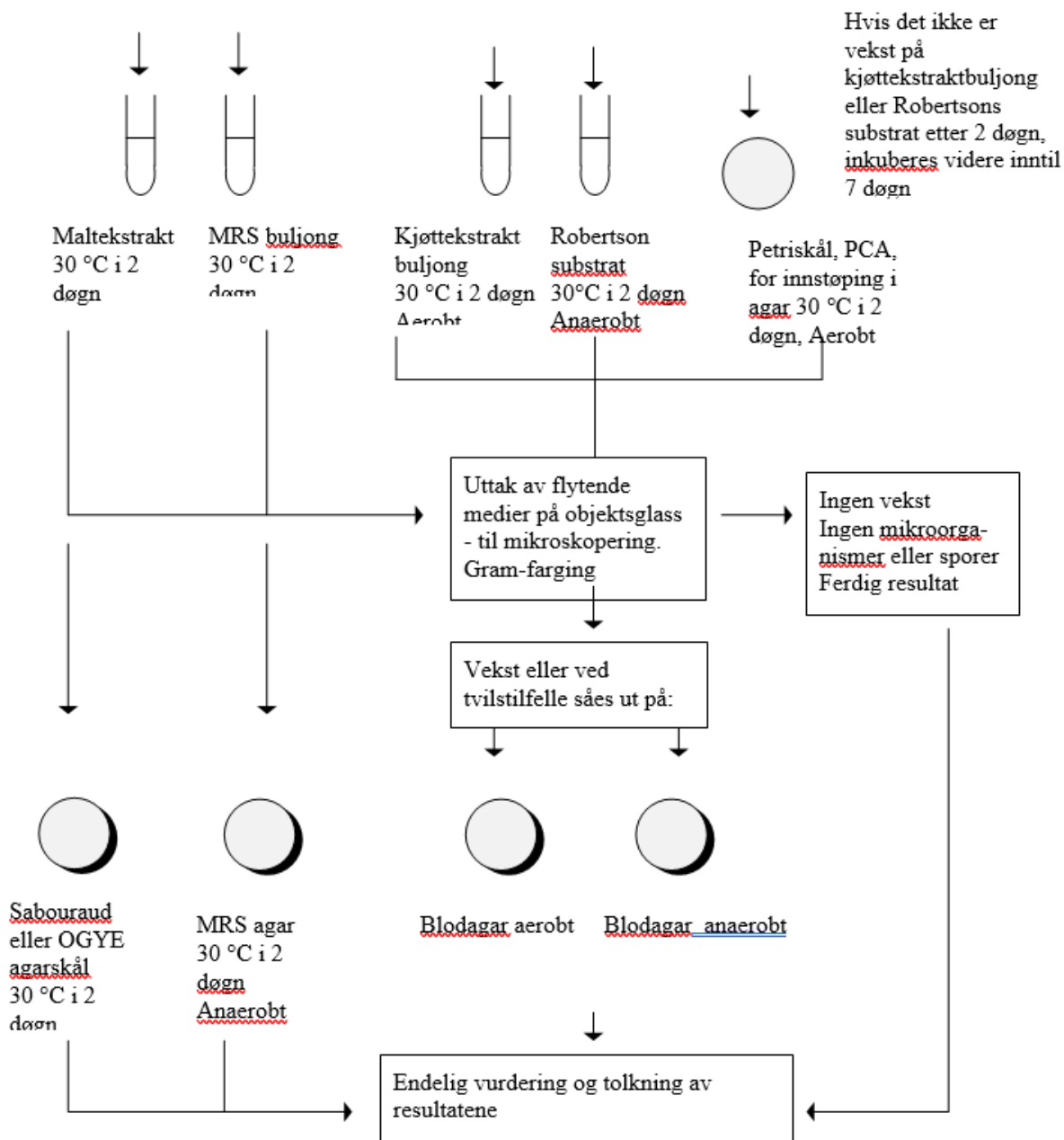
Boksene inkuberes i 7 døgn ved 37 °C dersom de ser normale ut, og det ikke er mistanke om bakterievekst (åpnes da med en gang)

Bekriv boksen  
Anmerk avvik ved fals/sveis, merking (fabrikant/prod./kode), korrosjon

Desinfiser den siden av boksen som skal åpnes med 70% etanol og flamber  
Papp-/plastprodukter vaskes omhyggelig med 70% etanol

Slå en steril dor gjennom den/eller åpne på den mest hensiktsmessige måte





#### 4.7 Supplerende undersøkelser

For registrering av observasjoner bruk med fordel eget skjema, for eksempel som Vedlegg 1.

Mål prøvens pH. Foreta en grundig sensorisk bedømmelse av innholdet; utseende, konsistens og lukt.

I tvilstilfelle eller dersom det er konstatert vekst i et eller flere flytende substrater, kan en ta ut fornyet prøve (fra den i kjøleskap oppbevarte prøve) for eventuell verifisering eller ytterligere undersøkelse. Forutsetningen for en ny prøve fra samme boks er at en har tatt ut en steril ekstra prøve for dette formål.

Etter at undersøkelsen er avsluttet åpnes emballasjen på hensiktsmessig måte uten å skade fals/sveis og lignende. Ta ut innholdet og inspiser emballasjens innside. Det kan være nødvendig med ytterligere tester av fals, sveis etc. for registrering av korrosjon og defekter. I tilfelle undersøkelsen gjelder konserver som skal være holdbare i tropiske klima skal materialet podes på et ekstra rør Robertsen medium for inkubering i 2-7 døgn ved 55 °C.



## 4.8 Tolking av resultatene

Årsakene til usterile helkonserver kan være mange, men i de fleste tilfeller vil en finne at grunnen er:

- enten en infeksjon gjennom utett emballasje (fals, svekk o.l.) under eller etter varmebehandling
- eller en mangelfull varmebehandling (understerilisering) som følge av at råstoffet har vært kraftig infisert eller at selve autoklavprosessen har medført svikt eller feil på et eller flere punkter (tekniske årsaker).

### Lekkasje/reinfeksjon

Ved nøytrale eller svakt sure produkter vil floraen i prøvene bestå av en blanding av ikke-sporedannende staver og kokker som hovedinnhold. Let derfor spesifikt etter en blandingskultur av både staver og kokker.

### Understerilisering

Floraen består oftest av Gram positive staver og sporer som vil kunne påvises, ofte også i det direkte utstryk. Ved svak understerilisering vil nesten alltid floraen bestå av staver og sporer uten levende kokker.

Valg av substrater og tolkning av resultater er også avhengig av hvilke produkttyper som foreligger, spesielt vil surhetsgraden spille inn på floraen i de usterile prøvene. Råstoffenes (ingrediensenes) ferskhetsgrad spiller også en meget stor rolle for sluttresultatet.

Som hjelpemiddel ved tolkning av resultatene brukes Recommended International Code of Hygienic Practice for low-acid and Acidified Low-acid canned foods. En oversiktlig tabell med tolkninger finnes i vedlegg 2.

## 4.9 Konfirmering

Det er ingen spesifikke konfirmeringstester til metoden. Ved forespørsel fra oppdragsgiver om å finne årsak til usterile bokser, kan det være nødvendig med konfirmering av hvilke bakteriearter som er til stede. Det kan brukes flere konfirmeringsmetoder, evt. innsending av renkulturer til konfirmeringslaboratorier.

## 4.10 Resultatangivelse

Analysesvar gir som prøve steril/usteril i innveid prøvemengde.

## 4.11 Metodens følsomhet

Metoden har en følsomhet på 1 cfu per 1 g prøvemateriale.

## 4.12 Arkivering

Rådata fra analysen oppbevares ved de fleste akkrediterte laboratorier i 5 år.

Dokumentasjon som tilkjennegir prøveidentitet, hvem som har utført analysen, dato for utførelse, og ferdig resultat oppbevares utilgjengelig for uvedkomne.

#### **4.13 Avfallsbehandling**

Ved funn av usterile bokser kan prøvemateriale og utstyr inneholde patogene mikroorganismer og skal autoklaveres før det kastes.

## 5 Resultater og diskusjon

### 5.1 Valg av metode (Ref 4.1)

De fleste mikrobiologiske laboratoriene i Norden benytter metode NMKL nr. 59 som grunnlag for sterilitetstesting av helkonserver. Dette fordi at NMKL metodene er godt dokumenterte, anerkjente og bygger på internasjonale standarder.

NORCONSERV har gjort noen små modifiseringer fra metode i NMKL nr. 59.

- 1) Metoden beskriver at boksene skal pre-inkuberes ved 30 °C i 14 dager, mens Kvalitetsforskrift for fisk og fiskevarer har som krav (Kap. 15, §15-2) at pre inkubasjon skal foretas ved 37 °C i 7 dager eller 35 °C i 10 dager (Fiskeridirektoratet, 1996).
- 2) Det er i mange tilfeller viktig å ta med inkubering ved 55 °C. Dette for å konstatere om det finnes overlevende termofile bakterier i boksen.

#### 5.1.1 Andre beskrevne metoder

Det finnes flere internasjonale metoder som beskriver sterilttesting og undersøkelser av hermetikk. Her nevnes de viktigste metodene og det vil bli referert til disse i den videre diskusjon.

##### 1. *Food and Drug Administration – "Examination of canned foods"*

Food and Drug Administration er en av de store tunge kontrollinstitusjoner innen hermetikk (Kautter et al. 1992) i USA.

##### 2. *Codex Alimentarius – "Recommended international code of hygienic practice for low-acid and acidified low-acid canned foods"*

Prosedyren ble påbegynt i Codex sammenheng i 1979. Den tar for seg svakt sure hermetiske produkter der produkter som trenger kjøling er utelatt (Codex Alimentarius, 1989).

##### 3. *American Organisation of Analytical Chemistry (AOAC) "Official Method 972.44. Sterility (commercial) of foods (canned, low acid)"*

Dette er den Amerikanske standardiseringsorganet sin metode for sterilttesting av matvarer (AOAC, 1995)

##### 4. *Campden Food Preservation Research Association. "Examination of suspect spoiled cans".*

En av de mest tradisjonstunge forskningstasjoner innen hermetisering er Campden Food Preservation research Association, Chipping Campden, i England. Dette forskningsinstituttet har utgitt en rekke tekniske manualer og rapporter innen hermetisering og kontroll av hermetikk (CFRA Microbiologically Panel in conjunction with the R.A., 1985)

## 5.2 Anvendelsesområde (4.1.1)

Metoden er en rutinemetode for mikrobiologisk undersøkelse av helkonserverte næringsmidler. Metoden er først og fremst tenkt benyttet til stiv emballasje, fortrinnsvis metallemballasje. Det finnes i dag på markedet også halstiv og fleksibel emballasje for helkonserver og det er mulig å benytte denne metode også for disse emballasjetyper.

Metode og utstyr for åpning av produktet for uttak av prøve vil variere med emballasjetypen. for eksempel vil en benytte steril skalpell eller steril kniv for åpning av fleksibel emballasje.

## 5.3 Bakteriekulturer (4.1.4)

NMKL nr. 59 angir ingen kontrollstammer av bakterier for å confirmere mediene. Mediekontroll er imidlertid et krav for akkrediterte laboratorier og det er derfor nødvendig å benytte bakteriestammer som vokser godt på de spesifiserte medier. Bakteriestammene kan kjøpes inn fra forskjellige stamme-samlinger (for eksempel Culture Collection University of Göteborg CCUG, NCTC, NCIMB, ATCC, PHLS). NORCONSERV benytter en *E.coli* stamme fra CCUG nr. 17620 for test av aerob vekst på agarskåler og aerob buljong. For anaerob vekst på agarskåler og Robertsons substrat benyttes *Clostridium perfringens* ATCC nr. 13124.

For sure produkter (pH < 4,5) kan det brukes *Saccharomyces cerevisiae* NCTC nr. 505 og melkesyrebakterien *Lactobacillus gasseri* NCIMB nr. 13081.

Vedlikehold og bruk av referansestammer er beskrevet av European for Accreditation of Laboratories EAL-G18 (EAL and EURACHEM, 1995), som supplerer akkrediteringsstandarden NS EN 45001.

## 5.4 Robertsons substrat (4.2.2)

Til anaerob vekst av bakterier brukes renskåret hjertemuskel av storfe. Tidligere benyttet Hermetikklaboratoriet i Stavanger storfehjerter som var skåret i små terninger. Disse ble gjort sterile ved hermetisering og lagret på små hermetikkbokser i flere år. I følge prosedyren skal det nå benyttes hjertemuskel som dypfryses.

### Anaerobe forhold – Oksidasjons-Reduksjonspotensiale (Eh)

Det er viktig at mediet er anaerobt når det benyttes. Det er best å lage anaerobt medium like før det skal benyttes. Ved autoklaving kokes nesten alt oksygenet ut av mediet og rørene skal derfor settes i anaerobkolbe før de er helt nedkjølte. På denne måten unngår en at mediet tar opp igjen oksygen og det er mulig og oppbevare mediet anaerobt over en viss tid.

Oksygenrikt væskemedium som settes i en anaerobkolbe blir ikke anaerobt før etter en dag eller to. Sannsynligvis vil indikatoren i anaerobkolben indikere at det er anaerobe forhold, men det er på grunn av at denne er plassert i luftfasen. Diffusjonen fra nederst i reagensrøret til væskens overflate vil foregå langsomt over tid.

Det finnes dokumentasjon på at enkelte *Clostridium* arter kan vokse ved relativt høye reduksjonspotensialer. (Ando and Iida, 1970) viste at sporer av *C.botulinum* Type E kan starte spiring ved Eh på +414 mV. For å få bakterievekst måtte potensialet reduseres til +200 mV.



Figur 1 Anaerob boks for inkubasjon av Robinsons substrat og anaerobe agarskåler

Det er forsøkt benyttet reduksjonsmidler i mediet, slik som Na-thioglykollat og cysteine. Resultatene fra slike forsøk viser at disse både kan stimulere spiring og hemme spiring ((Barker & Wolf, 1971), (Holland et al. 1969), (Rowley & Feeherry, 1970).

For å være sikker på å gi anaerobe bakterier et godt vekstgrunnlag bør en tilstrebe anaerobt medium med  $Eh \leq 0,0$ .

## 5.5 Instrumenter og utstyr (4.3)

### 5.5.1 Sterilisering av overflaten

Boksen må være steril før en slår hull i overflaten. Hvis det har vært blåste bokser i partiet som prøvene er hentet fra kan de være tilgriset med matrester, som er flytende eller har størknet som en hard hinne utenpå boksen. Bruk børste eller oppvaskekost og vask boksen godt før sterilisering. Pass på at merking ikke går tapt.



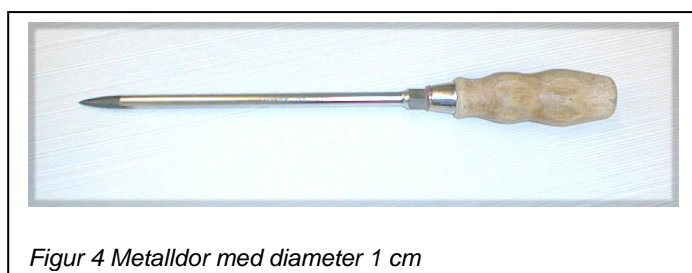
Sett boksene i sprit i 2–5 minutter slik at spriten står 2–3 mm over falsekanten. Til dette kan det brukes et anvendelig kar eller en bolle (Figur 3).

Umiddelbart før det stikkes hull i boksen, flamberes overflaten som skal gjennomhulles. Hvis det ikke er fast benkegassbluss kan en bruke et enkeltstående bluss (campingbrenner) som vist i Figur 2.



### 5.5.2 Hull i boksen

Hvis boksen er blåst/svellet må det utvises spesielle sikkerhetstiltak. *Clostridium botulinum* kan danne gass og blåste bokser kan derfor inneholde store mengder bakterier og farlige toksiner. Boksene må eventuelt åpnes ned i en plastbøtte inne i et egnet avtrekkskap. Det må benyttes beskyttelsesutstyr mot personaler (engangsklær) for å unngå kontaminering i laboratoriet og spredning av toksiner.



Det er vanskelig å åpne normale bokser sterilt, uten å reinfisere innholdet. I de fleste tilfeller benyttes en dor som avbildet på Figur 4. Med jevne mellomrom skal hele doren autoklaveres. Mellom hver prøve vaskes doren ren med sprit og brennes av. Den må få tid til avkjøling slik at den ikke dreper bakterier i nærheten til

hullet. Hold doren vinkelrett mot boksens bunn (der det ikke er datomerking eller pregning av informasjon) og slå med den andre hånden forsiktig. Etter at doren er gått gjennom boksen bøyes doren forsiktig fra side til side for å øke størrelsen på hullet.

### Alternative redskap for å lage hull i boksen

#### 1. Vanlig boksåpner

Laboratoriet har prøvd å bruke vanlig boksåpner, men dette har gitt et dårlig resultat. Det er vanskelig å sterilisere store flater og det er spesielt vanskelig å få alle deler av den ytre fals steril. Etter gjentagne forsøk med det resultat at boksene ble infisert er metoden gitt opp.



Figur 5 Redskap for å lage stort sirkelhull i boksen

## 2. Dor med sirkelsnitt

Figur 5 viser en dor laget på NORCONSERVs maskinavdeling. I tuppen av aksepinnen under håndtaket er det en pigg som settes ned i lokket. På tvers er det satt inn et skjæreblad, som ved å snu på håndtaket skjærer ut en sirkel med diameter 3 cm. Fordelen er at redskapet er lett å bruke og at det skjærer ut et større hull der en kan ut prøver. Ulempen er at det er vanskelig å få alle deler sterile mellom hver prøve. Hvis en har mange prøver kan det lett samle seg eller brenne seg fast matrester i piggen eller skjærebladet.

## 5.6 Uttak av prøve



Figur 6 Glasskoger med sterile glassrør som har bomull i den ene enden. Glassrørene er smeltet igjen i den ene enden

Ved uttak av prøvematerialet benyttes et sterilt glassrør. Glassrøret bør ha en diameter på cirka 7 mm. For en del faste og halvfaste prøver kan det være vanskelig å få med seg en representativ prøve med glassrør (for eksempel fiskeboller, lapskaus).

Det er også en del matvarer som er vanskelig å få ut av røret igjen (for eksempel krabbepostei, leverpostei).

En bør ikke bruke munnen for å blåse ut prøven da bakterier i pusten lett kan trenge igjennom bomullsproppen og følge med ned i prøven.

### 5.6.1 Alternative redskap for å ta ut prøve fra boksen

En kan benytte flere alternative redskapet til å ta ut representativ prøve fra boksen, for eksempel engangsspatel. En forutsetning er at utstyret og uttaket foregår sterilt.

## 5.7 Prøveuttak

Det skal tas ut 1 g prøvemateriale til både buljong og agarskåler. På grunn av faren for rekontaminering ved gjentatte uttak av boksen kan det være en fordel å trene seg i å vurdere hvor mye prøve som kreves for å utgjøre 1 g, og heller unngå selve veieprosessen.

Et alternativ er å ta ut et stort prøvevolum, for eksempel 10–20 g og overføre dette sterilt til sterile stomacker-poser. Her gjøres det en 10x fortykning før en overfører til buljong og agar.

Erfaringene vi har gjort er at faren for reinfeksjon er stor og derfor bør mest mulig ekstra mekanisk arbeid unngås.

### 5.7.1 Forskjellige arbeidsteknikker ved prøveuttak

Det er en utfordring å ta ut prøvemateriale fra boksen uten at det tilføres en eneste bakterie. I dette tilfellet vil en bakterie utgjøre forskjellen på et positivt og et negativt svar, noe som gir store konsekvenser for produsenten av hermetikk. Forskjellige arbeidsteknikker kan anvendes med tilsvarende forskjeller i risiko for kontaminering. Laboratoriet har prøvd ut 4 hovedteknikker for prøveuttak:



### 1. På laboratoriebank uten spesielle hygienetiltak

Her ble boksene åpnet med vanlig sterilteknikk uten at det ble benyttet hansker, munnbind, mansjetter eller lignende.

### 2. På laboratoriebank med spesielle hygienetiltak som hansker, mansjetter, munnbind, etc.

Her ble det benyttet ekstra hygienetiltak som er rettet mot prøvetakeren, men ikke beskyttelse mot forurensing fra luft og omgivelsene.

### 3. I sterilbank uten spesielle hygienetiltak

Her tok en ut prøver i sterilbank (LAF-benk) uten at prøvetaker gjør spesielle hygienetiltak.

### 4. I sterilbank med hansker, mansjetter, munnbind, sprit etc.

Her ble det benyttet høyeste grad av hygienetiltak, med både beskyttelse fra luften og fra prøvetaker. Laboratoriet har prøvd teknikkene med to trenete analytikere som gjennomførte steriluttak på produktet "Hermetisk makrell i olje". Det ble gjennomført parallelle 6 uttak for hver teknikk. Resultatene viste at arbeidsteknikk 4 var den klart beste teknikken for å unngå reinfeksjon fra ytre omgivelser under alalysearbeidet. Selv i laboratorier med svært ren luft vil en analyse av lufta normalt avsløre at et lavt antall bakterier og eventuelt mugg finnes i selve lufta. På arbeidsstasjoner der personalet arbeider, vil andelen mikroorgansimer som virvles opp øke og det er derfor viktig å ta ut prøvene i tilnærmet sterile omgivelser, slik som en finner i et sterilkabinett med filtret luft (Laminar Air Flow – LAF- benk). Arbeidsteknikk 1 og 2 gav begge enkelte infiserte bokser, noe som tyder på at arbeidsmiljøet på vanlig laboratoriumsbenk ofte ikke er tilstrekkelig for steril uttak.

## 5.8 Mikroskopering



Figur 7 Arbeidsteknikk i sterilbank med hansker, mansjetter, munnbind og hårnett bør anvendes for å unngå infeksjon av helkonserver

Det skal tas direkte utstryk på et objekts-glass fra boksene med påfølgende mikroskopering. Utstryket kan enten mikroskoperes direkte eller fikseres og farges. I mange tilfeller vil det forekomme mye matrester og fettpartikler som kan mistolkes som bakterier eller sporer. En mulig måte å fjerne fettpartikler er å dryppe en dråpe xylene med en dråpeteller på et varmfiksert objekts-glass, med påfølgende forsiktig skylning og deretter farging.

Det er ikke uvanlig at en kan se bakterier i direkteutstryket, men en skal da huske på at disse bakteriene kan være døde, det vil si varmedrept men fremdeles intakte ved direkte mikroskopering. Varmebehandlete bakterier kan også bli

Gram-variable og en må tolke eventuell Gram-farging i sammenheng med utstryk fra dyrkede kulturer.

## 5.9 Sporefarging

For å confirmere at det er sporer tilstede i preparatet er det en fordel å lage et preparat med spesifikk sporefarging. Dette kan gjøres enkelt med følgende prosedyre:

- 1) Fixer det lufttørkede objektglasset ved å dra det 6–8 ganger gjennom flammen.
- 2) Dekk objektglasset helt med Malankittgrønn farge (Merck cat.no. 15942). Bring til kokepunktet og la det koke i 20 sekunder. La stå i 30 sekunder - om nødvendig litt lenger.
- 3) Skyll i 30 sekunder med rennende vann.
- 4) Kontrastfarging i 1 minutt med Eosin løsning (Merck cat.no 15935) eller 30 sekunder med safranin (Merck cat.no 15948).
- 5) Skyll og tørk.



## 6 Tolkning av resultater

Når en skal tolke resultatene fra sterilttestingen må all informasjon og alle resultater settes i sammenheng. Forenklete tolkningskjema er gjengitt i Vedlegg 2 og 3 og kan brukes som et hjelpeverktøy i kartlegging av årsaken til en usteril boks. Tolkningsskjemaene må brukes med en viss forsiktighet da enkelte sporedannende bakterier som har gjennomgått varmebehandling kan være varmeskadet og vil da bare vokse under bestemte forhold.

Bakterier som vokser på agar eller buljong kan også rendyrkes og artsbestemmes ved bruk av for eksempel API, serologiske eller genetiske tester. I enkelte tilfeller kan det være hensiktsmessig å sammenlikne bakterier som er funnet i sluttproduktet med bakterier som finnes i råvarene eller tilsetningsstoffer. Ikke-bestrålt krydder er for eksempel kjent for å ha et meget høyt antall sporedannende bakterier. Kryddere er ofte importert fra varme land og kan inneholde mange termofile bakterier.

## 7 Referanser

- Ando, Y. and Iida, H. 1970. Factors affecting the germination of spores of *Clostridium botulinum* type E. *Jpn. J. Microbiol* 14: 361
- AOAC 1995. Sterility (commercial) of foods (canned, low acid). In *AOAC Official Methods Of Analysis*, 16 edn. W.H. Andrews, (Ed.) pp. 41-42. AOAC International, Virginia, USA
- Barker, A.N. and Wolf, J. 1971. Effects of thioglycollate on the germination and growth of some clostridia. In *Spoer research*, F.N. Abad, G.W. Gould and J. Wolf, (Eds.) pp. 95. Academic Press, New York
- CFRA Microbiologically Panel in conjunction with the R.A. Easton, S., (Ed.) (1985) Examination of suspect spoiled cans. Technical Manual No. 9, pp. 1-44. Chipping Campden, Gloucestershire: The Campden Food Preservation Research Association, England.
- Codex Alimentarius (1989) *Recommended International Code of Hygienic Practice for Low and Acidified Low Acid Canned Foods*, 1 edn. CAC/RCP 23-1979.
- EAL and EURACHEM (May, 1995) EAL-G18 - Accreditation for Laboratories Performing Microbiological Testing. *European cooperation for Accreditation of Laboratories 1* 1-28.
- Fiskeridirektoratet (1996) *Kvalitetsforskrift for fisk og fiskevarer*, Oslo: Fiskeridepartementet.
- Holland, D., Barker, A.N. and Wolf, J. 1969. Factors affecting germination of clostridia. In *Spores IV*, L.L. Campbell, (Ed.) pp. 317. American Society Microbiol., Betts, MD
- Innstillinger & kontroll av fals. 1998. Faktaark utarbeidet av NORCONSERV, Skanem AS og Trio AS. Kan skaffes ved henvendelse til NORCONSERV, Skanem AS eller Trio AS.
- Kautter, D.A., Landry, W.L., Swab, A.H. and Lancette, G. 1992. Examination of Canned Foods. In *Bacteriological Analytical Manual*, 7 edn. Anonymous pp. 259-280. Food and Drug Administration,
- NMKL (1991) Mikrobiologiske undersøkelser av helkonserver. No. 59. 3 edn, Finland: Nordisk Metodikkomite for Levnedsmidler.
- NMKL (1994) Helkonserver. Metode til holdbarhetsprøving. No. 47. 3 edn, Finland: Nordisk Metodikkomite for Levnedsmidler.
- Norges Standardiseringsforbund (1989) NS-EN 45001 Generelle krav til drift av prøvingslaboratorier. 1 edn, Oslo: Norges Standardiseringsforbund (NSF).
- Rowley, D.B. and Feeherry, F. 1970. Conditions affecting germination of *Clostridium botulinum* 62A spores in a chemically defined medium. *J. Bacteriol.* 104: 1151.
- Thorpe, R.H. and Barker, P.M. 1984. Visual can defects. The Campden food preservation research association Chipping Campden, Gloucestershire. GL55 6LD, England.

## 8 Vedlegg

### 8.1 Vedlegg 1 - Tolknings skjema - Sterilkontroll av helkonserver

Registreringsnr:

**Produktets emballasje:**

Produkt (Navn, vol): \_\_\_\_\_

Merking (Lot nr., dato.): \_\_\_\_\_

Emballasjens utside: Normal • Blåst • Blaff • Bulk/hull •

Kommentar:

Emballasjens innside: Normal • Korrodert • Lakkskader • Misfarging •

Kommentar:

Fals/sveis: Normal • Skadet •

Kommentar:

**Produktets innhold:**

Lukt: Normal • Sur • Råtten •

Kommentar:

Utsende:

Normal • Skummende • Nedbrudt • Oppløst •

Kommentar:

#### Dyrkning og mikroskopering

Test nr.	Analyse	Vekst	Dato/ sign.	Gram farging	Dato/ sign.	Mikroskopering	Dato/ sign.
1	Mikroskopi direkte fra boks						
2	Aerob PCA						
3	Kjøtttekstrakt aerobt						
4	Robertson anaerobt						
5	Blodagar aerobt						
6	Blodagar anaerobt						
7	Aerobt malt-ekstrakt (pH<4.6)						
8	MRS anaerobt (pH<4.6)						
9	Saouraud aerobt						
10	MRS anaerobt						

Kommentarer:

## 8.2 Vedlegg 2 - Feilsøkingsskjema for usterile bokser, Del 1

Boksens utseende	Karakteristikk av produktet i boksen				Nøkkel fra bakterie- dyrking	Mulig årsak
	Lukt	Utseende av væskefase	pH	Mikroskopi		
Svellet	Sur	Skummet, mulig slimet lake	Under normal	Kokker og/ eller staver	Positive aerobe og/ anaerobe ved 30°C og 37 °C	Lekkasje etter varmebehandling
Svellet	Svakt sur (av og til ammoniakk)	Normal til skummet	Svakt til fullstendig anormal- kan være høyere	Staver, av og til sporer	Positive aerobe og / eller anaerobe ved 30 °C og/ eller 37 °C	Lekkasje etter varmebehandling eller underprosessering
Svellet	Sur	Skummet, mulig slimet lake. Prod. fast og ukokt	Under normal	Blandet populasjon, ofte sporer	Positive aerobe og/ anaerobe ved 30 °C, 37 °C og ofte 55 °C	Ingen varmebehandling foretatt
Svellet	Normal til sur til ostelukt	Svak til sterk fargeforandring. Skummet	Svakt til klart under normal	Medium til lange staver, ofte kornete. Sjeldent sporer	Positive anaerobe ved 55 °C. Ingen vekst ved 30 °C. Mulig ved 37 °C.	Termofile anaerobe. Ufullstendig kjøling eller lagret ved høy temp. Clostridium spp.
Svellet	Normal til ostelukt til rått	Vanligvis skummet med oppløsning av fast materiale	Svakt til klart under normal	Staver. Sporer kan av og til observeres	Vekst og gass i anaerobe kulturer ved 37 °C og/eller 30 °C, men ikke vekst i aerobe kulturer	Underprosesseringsring. Mesofile anaerobe. <b>HØY RISK</b> Overvei overlevelse av <i>Clostridium botulinum</i>
Svellet	Normal	Normal	Normal	Normal	Negativ	Ufullstendig fylling av boks. Overfylling eller hydrogensvelling
Svellet	Lite eller ingen gass ved åpning	Normal	Normal til under normal	Stort antall jevnt farget kokker og/eller staver	Negativ	Produkt spolert før varmebehandling

## Forts. Feilsøking i usterile hermetikkbokser, Del II.

Boksens utseende	Karakteristikk av produktet i boksen				Bakterie dyrking	Mulig årsak
	Lukt	Væskefase	pH	Mikroskopi		
Svellet	Sur eller ostelukt	Skummet	Ofte under normal	Svakt fargete kokker og/eller staver	Negativ	Lekkasje fulgt av autosterilisering
Tilsynelatende god	Svovellukt	Innholdet er sort	Normal til under normal	Staver	Anaerob vekst uten gass ved 55 °C	Termofile svovel stinker. Underprosessering
Tilsynelatende god	Normal til sur	Normal til blakket saltlake	Normal til under normal	Kokker og/eller staver	Positive aerobe og/eller anaerobe ved 30 °C og vanligvis 37 °C	Post prosess lekkasje
Tilsynelatende god	Normal til sur	Normal til blakket saltlake	Under normal	Staver (ofte granulerte)	Ingen vekst under 37 °C. Aerob vekst uten gass ved 55 °C. Mulig veksthemning ved gaml. boks	Termofile aerobe (flat sur). <i>Bacillus</i> spp. Ufullstendig kjøling eller lagring ved høye temperaturer
Tilsynelatende god	Normal til sur	Normal til blakket	Under normal	Staver, sporer kan observeres	Positive aerobe ved 37 °C og 30 °C	Under prosessering eller lekkasje. Mesofile aerobe sporedannere. <i>Bacillus</i> spp.
Tilsynelatende god	Normal til sur	Normal til blakket saltlake	Under normal	Granulære staver	Negativ	Underprosessering med auto-sterilisering av termofile aerobe
Tilsynelatende god	Normal til sur	Normal	Normal til under normal	Stort antall fargete kokker og/eller staver i hvert felt	Negativt	Spolert før varmeprosessen
Tilsynelatende god	Normal	Normal	Normal	Negativ - av og til staver og / eller kokker; dvs. normal	Negativ	Ingen mikrobielle problemer

### 8.3 Vedlegg 3 Tolkningskjema for usterile bokser. Kun for renkulturer.

Aerob flytende kultur (°C) 30 37 55	Aerob agarplate (°C) 30 37 55	Anaerob flytende kultur (°C) 30 37 55	Anaerob agarplate (°C) 30 37 55	Resultat
+ + - + + - + + -	+ + - + - - - + -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	Mesofile strikt aerobe bakterier. Lekkasje eller underprosessering.
+ + - + - - + + -	+ + - + - - - + -	+ + - + + - - + -	+ + - + - - - + -	Mesofile fakultativt anaerobe bakterier. Lekkasje eller underprosessering.
- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	+ + - + - - + + -	+ + - + - - - + -	Mesofile strikt anaerobe bakterier. Lekkasje eller underprosessering.
- - + - - + - - +	- - + - - + - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	Strikt termofile aerobe bakterier Vanligvis underprosessering eller problemer med lake/ råmateriale.
- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- + + - - + - + +	- + + - + + - - +	Termofile strikt anaerobe bakterier. Vanligvis underprosessering eller problemer med lake/ råmateriale.
- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	- - - - - - - - -	Bakteriene har dødt ut. Steril boks. Kan være spolering før varmebehandling eller bruk av feil dyrkningsbetingelser.