

UTVÄRDERING AV FLÖDESCYTOMETRI SOM ALTERNATIV TILL PLATTMETOD VID ANALYS AV PROBIOTISKA PROVER: EN JÄMFÖRELSE

ZARAFSHAN EKHLAS

UTVÄRDERING AV FLÖDESCYTOMETRI SOM ALTERNATIV TILL PLATTMETOD VID ANALYS AV PROBIOTISKA PROVER: EN JÄMFÖRELSE

ZARAFSHAN EKHLAS

Ekhlash, Z. Utvärdering av flödescytometri som alternativ till plattmetod vid analys av probiotiska prover: en jämförelse. *Examensarbete 15 högskolepoäng*. Malmö universitet: Fakulteten för hälsa och samhälle, institutionen för biomedicinsk vetenskap, 2021.

Mjölksyrabakterier är mikroorganismer som bildar mjölksyra när de bryter ned socker. Dessa bakterier förekommer naturligt i människans kropp och tillhör tarmens normalflora. De hjälper dessutom till med att skydda människan från patogena mikroorganismer. Maten som intas idag innehåller mycket lite av mjölksyrabakterier och bör därför berikas på annat sätt. BioGaia som är ett svenskt bioteknikföretag, har forskat på mjölksyrabakterien *Limosilactobacillus reuteri* och substansen reuterin. BioGaias produkter innehåller mjölksyrabakterien *Limosilactobacillus reuteri* som bidrar till en balanserad tarmflora. Stabilitetsstudier är en viktig aspekt när en ny produkt utvecklas där produktens hållbarhet behöver undersökas under olika förhållanden. Haltbestämningen som är en del av stabilitetsstudien, görs idag på bakterier i de olika produkterna på BioGaia med plattmetoden, d.v.s. bakterieodlingar. Processen för plattmetoden tar cirka tre dagar tills att ett resultat kan fås. Syftet med studien var att jämföra plattmetoden med flödescytometri på probiotiska prover, för att se om resultatet av haltbestämningen av antalet levande bakterier blir samma med de olika metoderna och om det är möjligt att ersätta plattmetoden med flödescytometri för probiotiska prover. Studien har visat att skillnaden mellan resultatet från plattmetoden och flödescytometrin på probiotiska prover, är större än förväntat. Storleken på skillnaden varierar mellan prover. Resultatet har dock inte ett tydligt mönster som gör det möjligt att avgöra ifall det är möjligt att ersätta plattmetoden med flödescytometri.

Nyckelord: Flödescytometri, *Limosilactobacillus reuteri*, plattmetod, probiotika, propidiumjodid och SYTO24.

EVALUATION OF FLOW CYTOMETRY AS REPLACEMENT FOR THE PLATE METHOD IN THE ANALYSIS OF PROBIOTIC SAMPLES: A COMPARATIVE STUDY

ZARAFSHAN EKHLAS

Ekhlas, Z. Evaluation of flow cytometry as replacement for the plate method in the analysis of probiotic samples: a comparative study. *Degree project in Biomedical Laboratory Science 15 Credits*. Malmö University: Faculty of Health and Society, Department of Biomedical Science, 2021.

Lactic acid bacteria are microorganisms that form lactic acid when they break down sugar. These bacteria occur naturally in the human body and belong to the normal flora of the intestine. They also help protect humans from pathogenic microorganisms. The food consumed today contains very little of lactic acid bacteria and should therefore be enriched in other ways. BioGaia, which is a Swedish biotechnology company, has researched the lactic acid bacterium *Limosilactobacillus reuteri* and the substance reuterin. BioGaia's products contain the lactic acid bacterium *Limosilactobacillus reuteri*, which contributes to a balanced intestinal flora. Stability studies are an important aspect when developing a new product where the product's durability needs to be examined under different conditions. The content determination, which is part of the stability study, is made today on bacteria in the various products at BioGaia, using the plate method, i.e. bacterial cultures. The process for the plate method takes about three days until a result can be obtained. The purpose of the study was to compare the plate method with flow cytometric analysis on probiotic samples, to see if the result of the content determination of the number of living bacteria will be the same with the different methods. In addition, if it is possible to replace the plate method with flow cytometric analysis for probiotic samples. The study has shown that the difference in results between the plate method and flow cytometric analysis on probiotic samples differs more than expected. For some probiotic samples, it differs more and for others less. However, the result does not have a clear pattern that enables to determine if it is possible to replace the plate method with flow cytometric analysis.

Keywords: Flow cytometry, *Limosilactobacillus reuteri*, plate counting method, probiotics, propidium iodide and SYTO24.

FÖRORD

Jag vill tacka BioGaia och Henrik Lindblom för att jag fick möjlighet att utföra mitt examensarbete hos dem. Stort tack till min handledare Dietlind Adlercreutz, som har hjälpt mig med teorin, metodiken, sammanställning av resultat och mycket mer. Riktar även ett stort tack till dem andra på BioGaia som alltid har försökt lösa de små problem som jag har stött på under den praktiska delen av studien.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

BAKGRUND	5
<i>L. reuteri</i>	5
Stabilitetsstudier	5
Plattmetoden	6
Flödescytometri (FC)	6
Tidigare studier	7
Syfte.....	9
Frågeställning	9
Etiks bedömning	10
MATERIAL	10
Plattmetoden	10
Flödescytometri.....	10
METOD	10
Plattmetoden	11
Flödescytometri.....	11
RESULTAT	12
DISKUSSION	15
Metoddiskussion.....	15
Resultatdiskussion.....	16
<i>Tabletter</i>	16
<i>Droppar</i>	16
<i>Lozenger</i>	17
<i>Kapslar</i>	17
<i>Kultur</i>	18
<i>Olja</i>	18
SLUTSATS	19
REFERENSER	20
BILAGA 1: DATAINSAMLING	22

BAKGRUND

Mjölksyrabakterier är mikroorganismer som bildar mjölksyra när de bryter ned socker. Dessa bakterier förekommer naturligt i människans kropp och tillhör tarmens normalflora. De hjälper dessutom till med att skydda människan från patogena mikroorganismer [1]. Maten som intas idag innehåller mycket lite av mjölksyrabakterier och bör därför berikas på annat sätt. Probiotika kallas oftast för de "goda" bakterierna eftersom de är bakterier som hjälper till att stödja immunförsvaret och förbättra hälsan, genom att hålla de patogena bakterierna i matsmältningssystemet under kontroll. För en bra hälsa krävs det oftast att det finns en balans mellan de olika stammarna som befinner sig i tarmen [2]. Enligt WHO definieras probiotika som levande mikroorganismer som ger hälsofördelar hos de som intar dem i tillräckliga mängder [3].

Studien kommer att utföras på BioGaia som är ett svenskt bioteknikföretag. BioGaia säljer och utvecklar probiotiska produkter. Grundarna till företaget är Peter Rotschild och Jan Annwall. BioGaia har forskat på mjölksyrabakterien *Limosilactobacillus reuteri* (tidigare *Lactobacillus reuteri*) och substansen reuterin. BioGaias produkter innehåller mjölksyrabakterien *Limosilactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) som bidrar till en balanserad tarmflora [4].

L. reuteri

L. reuteri upptäcktes på 1980-talet och klassades som mjölksyrebakterie av Kandler et al. Arten hittades i många naturliga miljöer och den isolerades från många olika livsmedel - speciellt från mjölk och kött. Från början ökade intresset för *L. reuteri* då forskare hittade koloniserade *L. reuteri* hos friska djur, till exempel får, höns, gnogare och svin. *L. reuteri* isolerades även från humana tarmprover och fekala prover. Även om *L. reuteri* förekommer normalt och naturligt hos människor finns det individer som saknar arten. Dessa individer kan inta *L. reuteri* oralt, vilket kan påverka hälsan positivt, till exempel kan det hjälpa barn mot diarré [5–6]. *L. reuteri* har en tendens att hjälpa immunförsvaret och att hjälpa kroppen att bekämpa skadliga infektioner [6].

Stabilitetsstudier

Stabilitetsstudier är en viktig aspekt när en ny produkt utvecklas. Produktens hållbarhet behöver undersökas under olika förhållanden. FDA (Food and Drug Administration) som är USA:s livsmedels- och läkemedelsmyndighet med ansvar för bland annat mat, kosttillskott, läkemedel etc. rekommenderar att batcher tas fram och lagras under relevanta förhållanden, för att testa produktens hållbarhet. Målet är att testa och ta prov vid lämpliga tidpunkter för att kontrollera dess kvalitet mot specifikationerna. Analyserna kan exempelvis tas efter 0, 3, 6 och 12 månader. Slutmålet är att kunna motivera en hållbarhet för en specifik produkt under vissa förhållanden och tidpunkter [7].

Haltbestämningen av bakterier som är en del av stabilitetsstudien, utförs på alla typer av produkter för att kontrollera att produkterna innehåller en viss mängd levande bakterier. Produkterna utsätts för olika temperaturer till exempel -18, 5, 25, 30, 37 och 40 °C. Vid olika förbestämda tidpunkter, kontrolleras halten av *L. reuteri* i produkten. Den huvudsakliga anledningen till haltbestämning av bakterier är att säkerställa att produkterna klarar av inkubationsbetingelserna och de bäst-före-datum som rekommenderas [7].

Plattmetoden

Idag utförs haltbestämningen av bakterier i de olika produkterna på BioGaia med plattmetoden, d.v.s. bakterieodlingar. Plattmetoden går ut på att föröka bakterierna med hjälp av odling på agar-plattor. Detta kräver att bakterierna får ha rätt näring och rätt temperatur för att de ska växa. I denna studie befinner sig bakterierna i olika produkter i form av tabletter, droppar, lozenger, kapslar, kultur och olja. Processen för plattmetoden tar cirka tre dagar tills att ett resultat kan fås [8]. Det finns ett intresse av att kunna genomföra en haltbestämning på kortare tid. Detta skulle innebära att processen blir mer effektiv ur ett tids- och ekonomiskt perspektiv.

Flödescytometri (FC)

Flödescytometri är en metod för att kunna studera och analysera celler i lösningar. Det är viktigt att det som analyseras befinner sig i en vätskelösning och har en storlek mellan $1\mu\text{m}$ och $100\mu\text{m}$. Flödescytometri används i många olika områden såsom växtbiologi, marinbiologi, cell- & molekylärbiologi, proteinexpression och cellcykel-analys. En flödescytometer består av vätskeflöde, lasersystem, en optikdel, detektorer, elektronik och ett datorsystem. Vätskeflödet är två pumpar som pumpar vätskan med cellinnehållet genom detektionskammaren. Lasersystemet behövs för att de fluorokromer som används, behöver en viss typ av energi för att fluorescens ska avges. Optikdelen består av linser och speglar som behandlar ljuset från lasern. Detektorer är ljuskänsliga ytor som omvandlar ljus till en elektrisk puls när den träffas av ljuset, därefter kan detta tolkas av mjukvaran. Elektronik och datorsystem, sköter inställningarna på flödescytometern. Cellerna transporteras genom flödescytometern och fokuseras för att träffas av lasern, en cell åt gången. Detta kallas för hydrodynamisk fokusering [9]. Laserljuset som bryts rakt framifrån är proportionellt mot storleken på cellen och kallas forward scatter. Laserljuset som bryts i 90 graders vinkel mot cellen är proportionellt mot cellens komplexitet och kallas för side scatter. Ljus som bryts kan gå igenom olika filter som gör det möjligt att separera ljus av olika våglängder. Ljuset fångas upp av olika detektorer, s.k. fotometriska rör, som omvandlar ljuset till elektriska spänningsimpulser. Varje impuls ger upphov till en stapel i ett histogram i mjukvaran. Ju högre intensitet det är på ljuset, desto kraftigare puls. Det slutgiltiga histogrammet är resultatet av många olika celler som har gått genom flödescytometrin [10].

För att synliggöra ytterligare egenskaper hos cellerna, används olika fluorescerande molekyler som kan binda sig på olika sätt utanpå eller inuti cellerna. De fluorescerande molekylerna kallas för fluorokromer. Det finns många olika typer av fluorokromer. Två som kommer att användas i denna studie är SYTO24 och Propidiumjodid (PI). Det viktigaste är att fluorokromerna som används, har olika emissions våglängder för att det ska gå att skilja på dem [10].

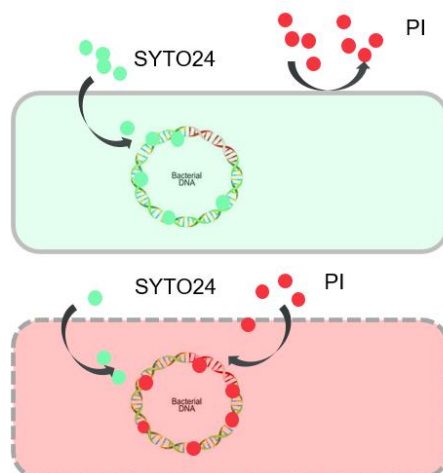
Fluorokromerna SYTO och PI, används inom medicin, miljöövervakningar och livsmedelsindustrin för att bedöma bakteriers livskraft [11].

SYTO är ett grön-fluorescerande färgämne som tränger sig in i celler och binder till nukleinsyror. Färgämnet kan användas för att färga in RNA och DNA i både levande och döda eukaryota celler, såväl som gramnegativa och grampositiva bakterier. Det finns olika typer av SYTO-färgämnen. De kan skilja sig åt med

avseende på cellpermeabilitet, excitations- och emissionspektra samt bindningsaffinitet till DNA och RNA [12]. Färgämnet SYTO är kompatibelt i många olika fluorescensbaserade instrument som använder sig av laser för excitation. Det finns dessutom många olika typer av SYTO. Några exempel är SYTO9, SYTO11, SYTO13, SYTO21 och SYTO24. I denna studie kommer SYTO24 att användas till att färga bakterierna. SYTO24 har ett absorptionsmaximum vid 490nm och ett emissionsmaximum vid 515nm vid bindning till DNA [13].

PI är ett rött fluorescerande färgämne som tränger igenom membranet till döda celler och binder därefter till DNA och RNA. Bindningen sker genom interaktion mellan baserna på DNA- och RNA-strängen. PI används oftast som en motfärgning för att kunna skilja på döda och levande celler. PI exciteras mellan 488 och 535nm beroende på om den är bunden till DNA eller RNA. Emissionen sker vid 617nm [14].

I studien kommer cellerna att färgas med både SYTO24 och PI. SYTO24 tar sig in i alla celler och binder till DNA. När SYTO24 har bundit till bakteriecellens DNA, kommer den att avge en grön fluorescens. PI kan endast ta sig in i de celler som har ett skadat cellmembran. När PI väl har trängt igenom de skadade respektive döda cellerna, kommer det att binda till DNA och dessutom tränga ut SYTO24, som inte binder lika hårt som PI. När PI har bundit till DNA avger den en röd fluorescens. På detta sätt kan levande och döda celler skiljas åt [12]. Se figur 1 för en illustration av infärgningen.



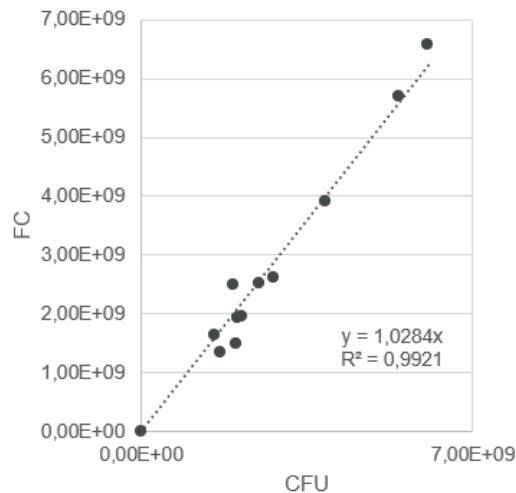
Figur 1. En illustration som visar infärgningsprocessen (Dietlind Adlercreutz, ej publicerad studie).

Tidigare studier

En tidigare studie av Necioni, Michelussi m.fl. utfördes med flödescytometri på probiotiska prover av *Lactobacillus* och *Bifidobacterium*-arter. Syftet med studien var att jämföra den traditionella plattmetoden med flödescytometri för kvantifiering av probiotiska bakterier. Studien jämförde metoderna genom att utföra plattmetoden och flödescytometri parallellt på specifika medier. Studien påvisade att flödescytometrin av probiotiska prover, kan bedöma viabilitet med statistiskt starkare resultat jämfört med den traditionella plattmetoden [15].

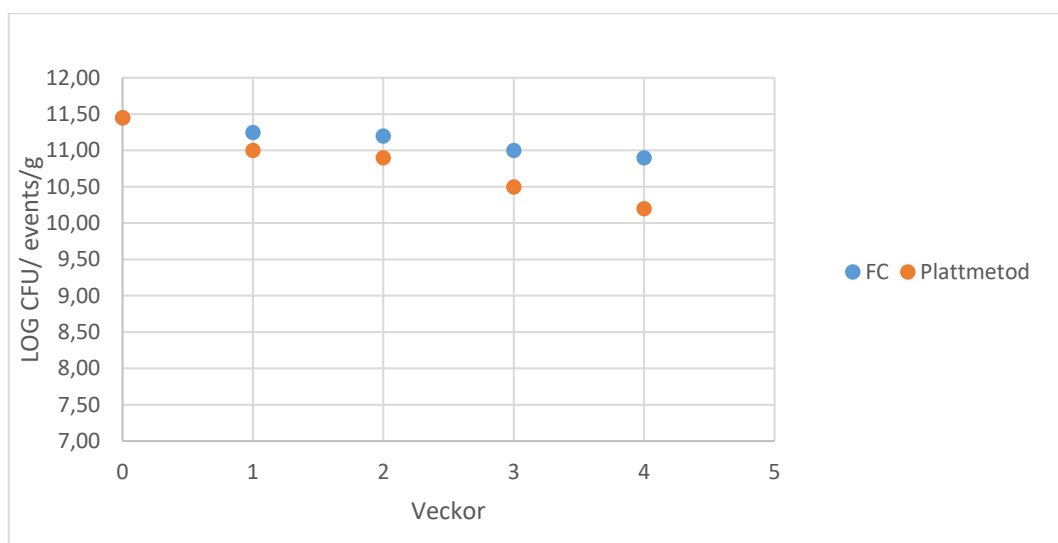
Slutsatsen från denna studie, ger förhoppningar om att detta examensarbete kan få positiva resultat gällande flödescytometrin.

Även en internstudie på ett begränsat antal produktprover från BioGaia (Adlercreutz och Pesjak, ej publicerat resultat) visade att antalet levande bakterier erhållet från plattmetoden, stämde väl med antalet levande bakterier erhållet från flödescytometrin. För resultat, se figur 2.



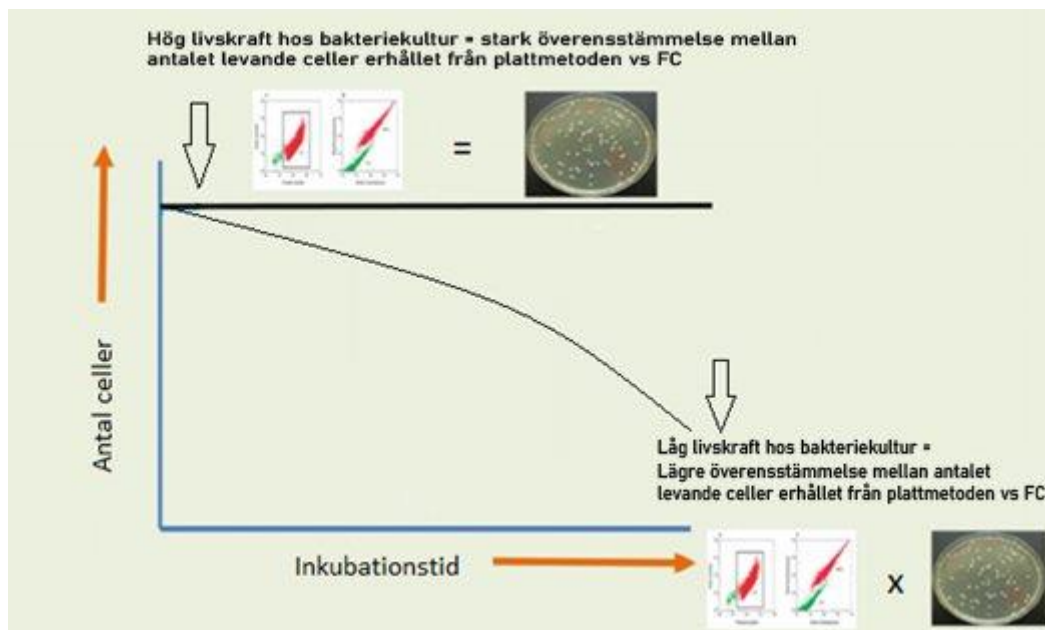
Figur 2. Resultatet på BioGaias tidigare studie där resultaten från ostressade levande bakterier, analyserades med både flödescytometri (events/g) och plattmetoden (CFU/g) jämfördes (Adlercreutz och Pesjak, ej publicerat resultat).

Resultaten var däremot inte lika överensstämmande när testet utfördes på stressade bakterier. Figur 3 visar hur antalet levande bakterier förändras i ett prov av frystorkad bakteriekultur som lagrats vid 43% luftfuktighet. Sådan luftfuktighet är mycket stressande för frystorkade bakterier. I denna studie stämde de båda jämförda metoderna överens i början av inkubationen men inte senare (Adlercreutz och Pesjak, ej publicerat resultat).



Figur 3: Jämförelse av flödescytometri och plattmetoden på stressade probiotiska prover.

En tidigare litteraturstudie av Wilkinson visar att den traditionella plattmetoden kräver att varje bakteriecell ska ha förmågan till att föröka sig. Dock har inte alla bakterieceller förmågan till att reproducera sig och växa under de givna förhållandena. Studien har kommit fram till att ju längre en produkt har varit lagrad, desto mer kommer den analyserade viabiliteten på den produkten att skilja sig mellan flödescytometri och plattmetoden. När produkten är ny, det vill säga när den inte har varit lagrad, är resultatet av antal levande bakterier lika mellan de båda metoderna. Däremot stämmer inte detta på lagrade produkter. Utifrån denna studie är det tydligt att inkubationstiden måste tas hänsyn till. Figur 4 visar en förklaring till detta [16].



Figur 4. Illustration av förhållandet mellan antalet levande celler erhållna med plattmetoden respektive med FC i probiotiska produkter med ökad inkubationstid. Figuren är inspirerad av en tidigare studie [16].

I förstudien till denna studie, testades endast några få prover med båda metoderna. Datainsamlingen i förstudien var otillräcklig för att kunna avgöra om flödescytometrin kunde ersätta plattmetoden för probiotiska prover. I denna studie kommer därför ett stort antal prover testas för att eventuellt kunna säkerställa ifall resultaten kan vara lika mellan flödescytometri och plattmetoden för alla typer av produkter och stammar av *L. reuteri*.

Syfte

Syftet med studien är att jämföra resultaten av antalet levande celler i probiotiska prover med plattmetoden och med flödescytometri, för att se om de blir likvärdiga.

Frågeställning

- Fungerar flödescytometri lika bra på alla typer av produkter?
- Spelar inkubationsbetingelser och inkubationstid någon roll i utfallet av den flödescytometriska analysen?
- Kan flödescytometri ersätta plattmetoden?

Etiks bedömning

En etisk prövning krävdes inte för studien eftersom den utförs på hälsoprodukter innehållande bakteriestammen *L. reuteri*, det vill säga varken människor eller djur ingick i studien.

MATERIAL

I denna del av rapporten presenteras material som behövs för att kunna utföra plattmetoden och flödescytometrin.

Plattmetoden

Material som krävdes till plattmetoden var följande: Smart diluter (IUL-instruments, Barcelona, Spanien), Invägningspåsar (VWR life science, Lund, Sverige), MRS buljong (tillverkas på BioGaia), smasher (Biomerieux, United States of America) , dilucups med 0,9 % natriumklorid (LabRobot, stenungsund, Sverige), glaskulor, MRS-agar-plattor (köps från sjukhuset i Lund, Sverige), inkubationsklockor (Thermo Scientific, Göteborg, Sverige), anareobpåsar (Thermo Scientific, Göteborg, Sverige), anaerobdticka (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland), 37-graders inkubator (Termaks, Bergen, Norge) och probiotiska prover (BioGaia, Eslöv, Sverige) i form av tabletter, droppar, lozenger , kapslar, kultur och oljor.

Flödescytometri

Material som krävdes till flödescytometri var följande: Cytoflex S flödescytometer (Beckman coulter life Sciences, United States), PI (Invitrogen by ThermoFisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA) , SYTO24 green fluorescent Nucleic Acid Stain 5mM solution in DMSO (Invitrogen by ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), Cytoflex daily QC fluospheres beads (Beckman coulter life Sciences, United States), flowclean cleaning agent (Beckman coulter life Sciences, United States), Cyto flex sheath lösning (Beckman coulter life Sciences, United States), PBS (phosphate buffered saline 1X, VWR life science, Lund, Sverige) 96-hålsplatta djup (Fisher Scientific, Göteborg, Sverige), provrör (Eppendorf tubes 3810X, Hamburg, Tyskland), pipetter (Invitrogen by ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), filterpåsar (Interscience, BagPage, Saint Nom, Frankrike), milli-Q-vatten (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland) och probiotiska prover (BioGaia, Sverige, Eslöv) i form av tabletter, droppar, lozenger, kapslar, kulturer och oljor.

METOD

Flödescytometri och plattmetoden på probiotiska prover jämfördes. Båda metoderna genomfördes på samma probiotiska prover. De probiotiska proverna innehåller olika stammar av *L. reuteri*. I en Excel-fil noterades resultat, produkttyp, stam, inkubationstemperatur och inkubationstid efter att analyserna var utförda, se bilaga 1 för Excel-fil med en detaljerad beskrivning av datainsamlingen. Plattmetoden var den första metod som påbörjades. Den

resterande upplösningen av provet som blev kvar från plattmetoden användes till flödescytometrin. Antalet prover som testades begränsades av tiden som var tillgängligt för denna studie.

Plattmetoden

Metoden baserar sig på ISO-7889-metoden. För upplösning späddes de olika produkterna tio gånger med MRS-buljong. Beroende på produkttyp valdes antingen varm ($42\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) eller kall ($22,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$) MRS-buljong, vilket framgår i tabell 1. Spädningen skedde i en invägningspåse, spädningstiden noterades. Påsen placerades därefter i en smasher för homogenisering av provet. Varje produkt har sin specifika tid och hastighet som den homogeniseras i, se tabell 1. Därefter sattes provet för att vila i cirka 10 minuter. Tiden kan variera beroende på produkt, vilket framgår i tabell 1.

Tabell 1. Sammanfattning av de temperaturer på MRS-buljongen som användes till respektive prov, provmängden som användes vid respektive invägning, homogeniserings-tiden samt vilotiden för plattmetoden.

Produkt	Temperatur MRS-buljong	Provmängd /invägning	Homogeniserings-tid och hastighet, tillfälle 1	Vilotid	Homogenisering-tid och hastighet, tillfälle 2
Tabletter	42 °C	10 tabletter	120 sek normal	10–60 min	60 sek normal
Droppar	42 °C	3 gram	60 sek normal	10–20 min	60 sek normal
Lozenger	42 °C	5 Lozenger	120 sek normal	10–60 min	60 sek normal
Kapslar	22,5 °C	3 gram	60 sek normal	10–20 min	60 sek normal
Kultur	22,5 °C	3 gram	300 sek långsam	10–20 min	300 sek långsam
Olja	42 °C	3 gram	60 sek normal	10–20 min	60 sek normal

Sedan homogeniserades provet återigen. Efter den andra homogeniseringen späddes provet ytterligare i fysiologisk koksaltlösning, spädningsgraden var beroende av förväntad bakteriehalt. Efter spädningen placerades provet på MRS-agar-plattor. Till varje invägningspåse användes tre MRS-agar plattor. För att få bakterierna jämnt växande på plattan fördelades provet med hjälp av små glaskulor, cirka 6–8 stycken i varje platta. Dessa glaskulor placerades på plattan innan provet och därefter skakades plattorna horisontellt för att få en jämn spridning över hela plattan. Glaskulorna plockades bort och plattan placerades upp och ned på arbetsbordet i minst 15 minuter. Därefter inkuberades plattorna i en anaerobklocka. För att få en anaerob miljö användes anaerobpåsar som placerades i anaerobklockan tillsammans med en anaerobsticka, som används för att säkerställa den anaeroba miljön. Inkubationen skedde i 37°C i två dygn. Därefter plockades plattorna ut för avläsning och resulterande antal kolonier noterades i Excel-filen, vilket framgår i bilaga 1 [10].

Flödescytometri

Flödescytometrin genomfördes enligt ISO-metod 19344, protokoll B. Inför varje arbetsdag genomfördes en uppstart och rengöring av flödescytometern. Även laserprestandan kontrollerades innan proverna analyserades. I detalj; Sheat-

lösningen fylldes på och slask dunken tömdes, injektions-läget placerades på P som står för platta. I cytexpert -mjukvara på datorn som är kopplad till flödescytometern, startades instrumentet upp. En "daily clean" genomfördes och för detta förbereddes två olika lösningar, milli-Q-vatten och "flowclean-lösning" som placerades i brunnar A1-A3 respektive A4-A5. 1ml utspädd "QC-beads" för kontroll av laserprestandan pipetterades i brunn A6. Därefter följdes instruktionerna i mjukvaran tills att "daily clean" och analysen av "QC-beads" var utförda. Om analysen av "QC-beads" blev godkänd var flödescytometern redo [17].

Provet som redan var spätt tio gånger inför plattmetoden, filtrerades och användes till denna metod också. Provet hölls över från invägningsspåsen till filtreringspåsen och blandades därefter i smashern i 15 sekunder. Efter att provet filtrerats, pipetterades 1 ml av provet till ett provrör. Sedan gjordes en seriespädning av provet enligt följande schema:

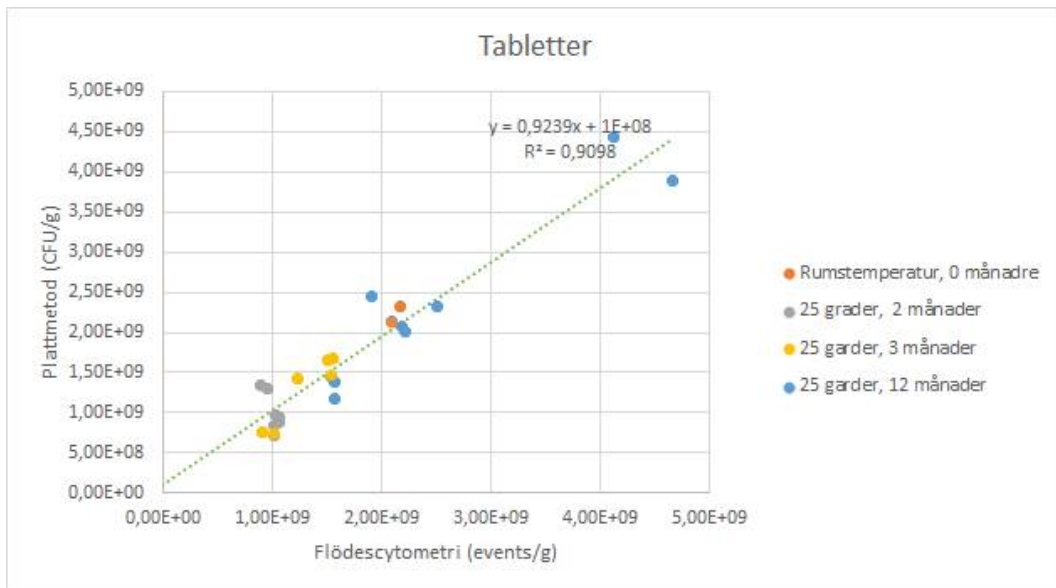
1. 50 µl filtrerat prov späddes med 450 µl PBS
2. 50 µl av spädning 1 späddes med ytterligare 450 µl PBS
3. 50 µl av spädning 2 späddes med ytterligare 540 µl PBS (x3)
4. 10 µl/brunn av 0,2 mM CYTO24- och 0,2mM PI-blandning sattes till i spädning 3.

Därefter inkuberades 96-hållsplattan i 15 minuter i mörker och analyserades sedan av flödescytometern. Resultatet noterades i Excel-filen, vilket framgår i bilaga 1 [17].

RESULTAT

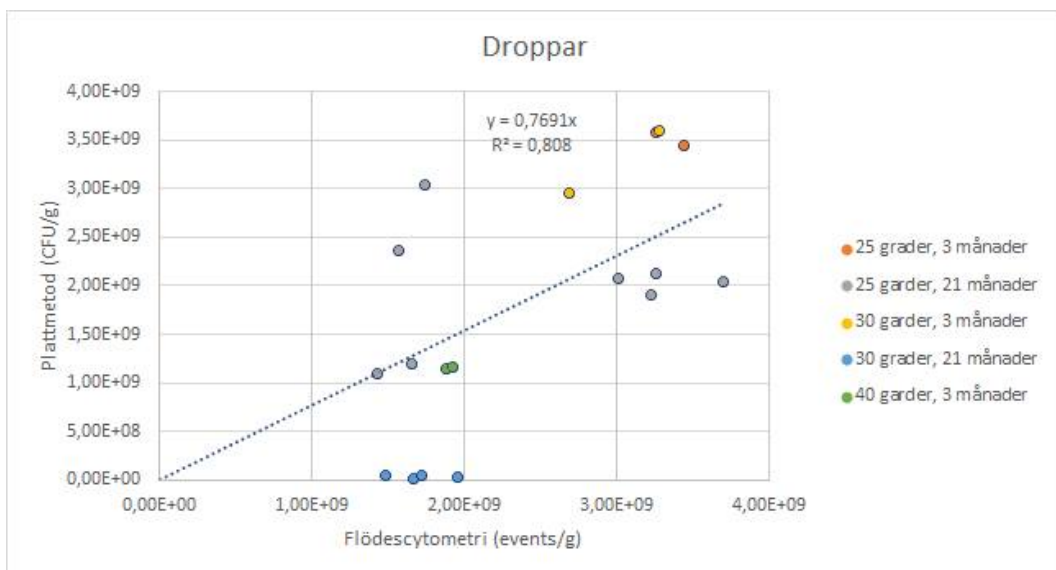
En jämförelse av den traditionella plattmetoden och flödescytometrin, utfördes på olika probiotiska prover innehållande olika stammar av bakterien *L. reuteri*. Figur 5–10 visar jämförelserna mellan resultaten från plattmetoden och flödescytometrin. Produkterna har varit inkuberade i olika temperaturer och vid varierande tid, detta presenteras i figurerna. Produkterna har visat varierande resultat vid jämförelserna av metoderna.

Resultaten från plattmetoden och flödescytometrin stämde väl överens vid analys av tablettorna, vilket framgår i figur 5. Endast ett prov som hade lagrats vid 25 °C i 12 månader avvek något.



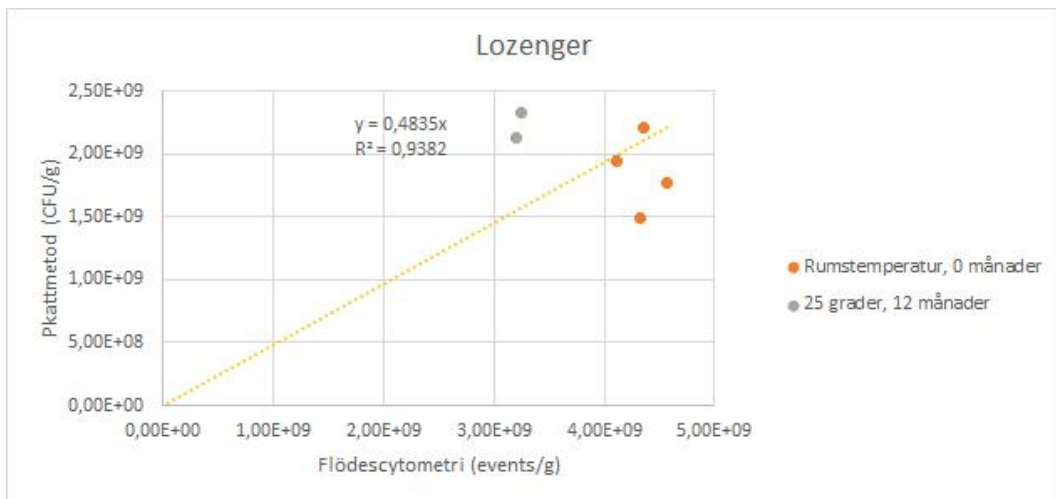
Figur 5. Resultatet vid jämförelserna av metoderna på probiotiska prover i form av tabletter vid olika inkubationstider.

Resultaten proverna i form av droppar visade sig också vara lika för några prover, däremot avvek resultaten för vissa temperaturer och inkubationstider. De prover som avvek mest bland dropparna var proverna som var inkuberade i 21 månader i 30 °C och proverna som var inkuberade i 21 månader i 25 °C. Detta framgår i figur 6.



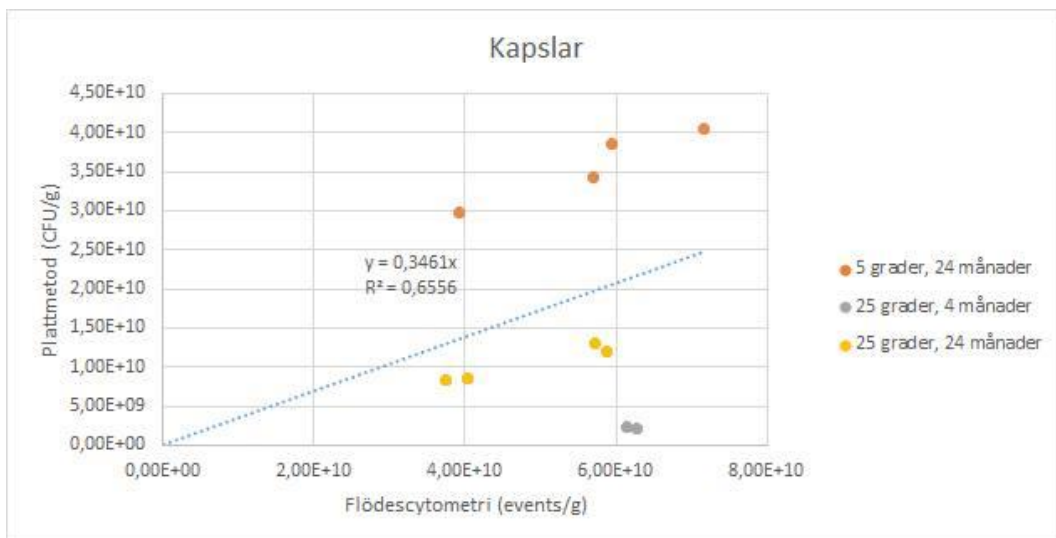
Figur 6. Skillnader respektive likheter mellan plattmetoden och flödescytometrin på produkter i form av droppar, för olika temperaturer och inkubationstider.

Resultatet för prover i form av lozenger avvek en hel del. Proverna med rumstemperatur och ingen inkubationstid avvek mest, se figur 7.

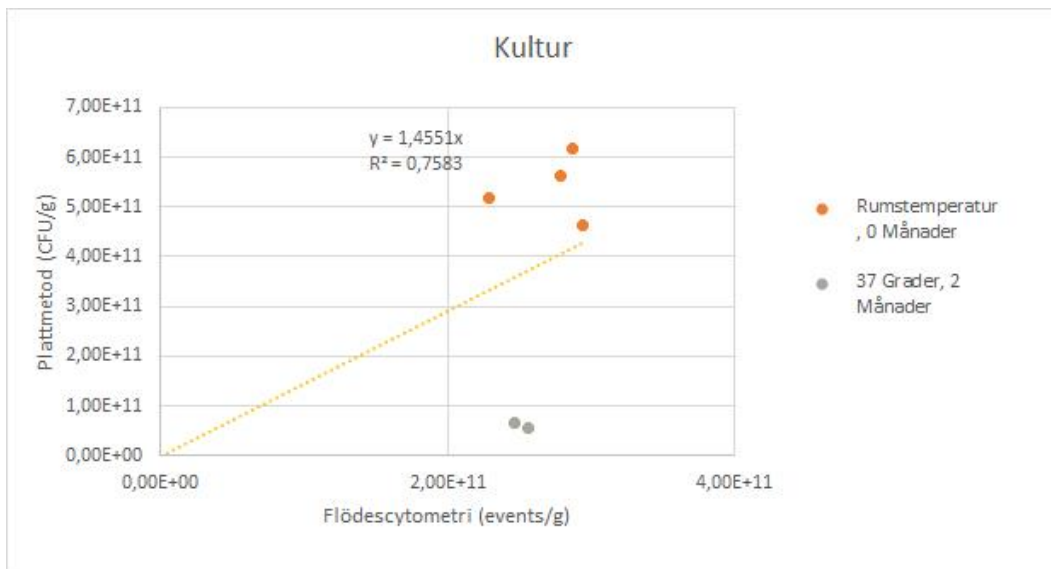


Figur 7. Visar skillnader och likheter i jämförelsen av metoderna på probiotiska prover i form av lozenger för olika temperaturer och inkubationstider.

De prover som avvek mest vid jämförelserna av metoderna var produkterna i form av kapslar och kultur, vilket framgår i figurerna 8 och 9. Detta kan tydligt ses vid jämförelserna på korrelationskoefficienten.

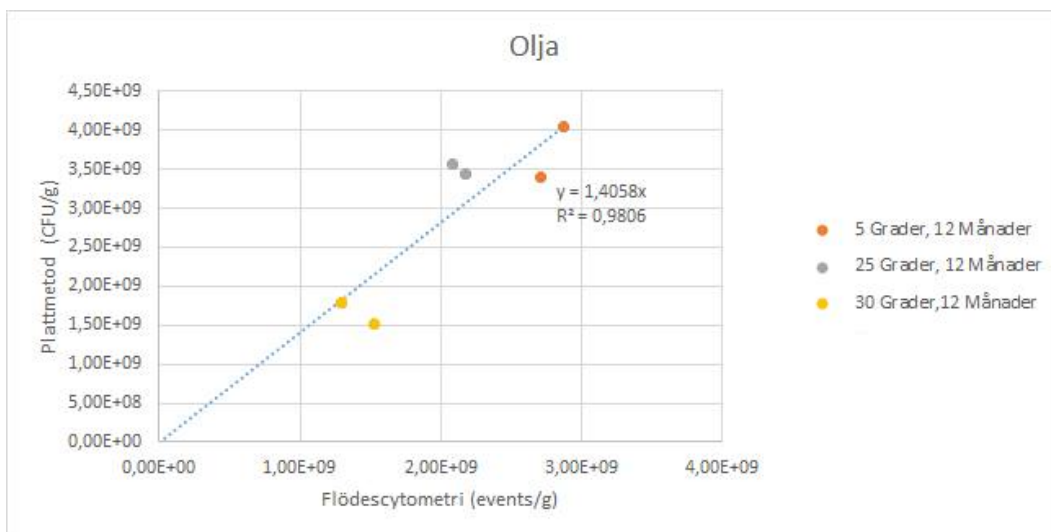


Figur 8. Jämförelsen av metoderna på probiotiska prover i form av kapslar för olika inkubationstider och temperaturer.



Figur 9. Jämförelse av plattmetoden och flödescytometrin på kulturpulver lagrade vid olika temperaturer och under olika inkubationstider.

Resultaten för produkten i form av olja, påvisade små skillnader vid jämförelsen av metoderna för prover som var inkuberade i 30 °C under 12 månader. För resterande olje-prover, hade resultaten större avvikelser, vilket framgår i figur 10.



Figur 10. Jämförelsen av plattmetoden och flödescytometrin på produkter i form av olja.

DISKUSSION

I denna del av rapporten kommer metoden och resultatet diskuteras. Det kommer dessutom diskuteras kring förbättringsmöjligheter för flödescytometrin.

Metoddiskussion

Metoden utfördes på 68 probiotiska prover i triplikat, det vill säga totalt jämfördes 204 probiotiska prover. Tiden var en begränsande faktor i antalet prover som kunde testas. De probiotiska proverna som jämfördes var i form av tabletter, oljor, kapslar, droppar, kultur och lozenger, innehållande olika stammar av *L. reuteri*.

Produkterna valdes utifrån vad som fanns tillgängligt på arbetsplatsen. Därför varierar antalet tester på de olika produkterna. Detta kan anses vara mindre bra eftersom de olika produkterna ger olika resultat vid jämförelsen av metoderna. Det som hade kunnat förbättras är om det kunde vara lika många test för respektive produkt. Detta kan göra att resultatet från vissa produkter kommer vara mer pålitliga än andra. Metoderna var enkla att lära sig och att utföra, dock var pipetteringen inför flödescytometrin mycket ansträngande. Eftersom hålen på 96-hållsplattan är små och proverna inte varierade i färg, blev urskiljningen under pipetteringen svår. Pipetteringen behövdes göras om flera gånger då det var enkelt att pipettera i fel brunn i 96-hållsplattan. Om pipetteringen istället hade utförts med en automatpipett eller en robot, hade det varit mer tidseffektivt och pipetteringsfelet hade minskat. Datainsamlingen till Excel-filen var enkel att utföra dock förbrukade det mycket av tiden, vilket inte var förväntat.

En annan faktor som det kunde ha tagits hänsyn till från början, var tiden proverna fick vänta efter att de var spädda med MRS-buljong, tills att de skulle analyseras i flödescytometern. För vissa prover tog det till exempel tre timmar efter att de var spädda i MRS-buljong tills att det kördes i flödescytometern. Detta för att det tog lång tid att genomföra plattmetoden. Det som hade kunnat utföras annorlunda är att man hade kunnat ta ett prov i taget, det vill säga utfört plattmetoden på ett prov först och sedan påbörjat flödescytometri direkt. Detta för att annars finns möjligheten att bakterierna i provet hamnar på botten av invägningspåsen med MRS-buljonglösningen. När prover tas inför flödescytometrin finns det risk för att lösningen inte är homogeniserad, vilket kan ha påverkat resultatet.

Resultatdiskussion

Resultatet vid jämförelsen av plattmetoden och flödescytometrin blev inte som förväntat på alla probiotiska prover. Det som förväntades var att alla prover som testades, skulle ge samma resultat av antalet levande bakterier med både plattmetoden och flödescytometrin. Att inkubationstiden har en negativ påverkan på jämförelsen av metoderna, framgick i en tidigare litteraturstudie [16]. Därav var det förväntat att prover med längre inkubationstid, skulle avvika. För vissa probiotiska prover, stämde hypotesen mycket bra medan för vissa andra stämde det inte alls.

Tabletter

Resultatet av probiotiska prover i form av tabletter var samma för levande bakterier i både plattmetoden och flödescytometrin, vilket framgår i figur 5. Majoriteten av tabletterna som testades var inkuberade i 25°C, med inkubationstider mellan 0 och 12 månader. Eftersom analysresultaten stämmer mycket väl överens på det flesta prover verkar det som att inkubationstiden inte har en större påverkan när det gäller tabletterna.

Droppar

Probiotiska prover i form av droppar avviker betydligt mer än tabletterna mellan de två jämförda metoderna. Dropparna var inkuberade i 25 °C, 30 °C och 40 °C. Figur 6 visar att just de prover som var inkuberade i 30 °C under 21 månader och i 40 °C under 3 månader avviker mest. Detta visar att den höga temperaturen som bakterierna var inkuberade i, har en påverkan på bakteriernas överlevnad och förökningsförmåga, som i sin tur gör att metodernas resultat inte stämmer överens med varandra. Varje stam har sin egen optimala temperatur som den trivs bäst i.

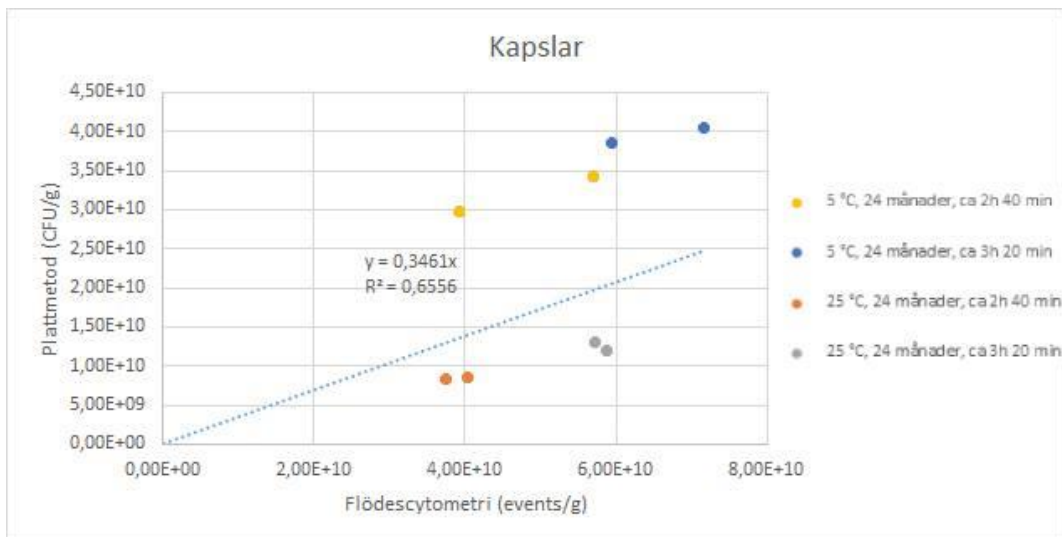
Vissa stammar kan fortfarande föröka sig utanför sin optimala temperatur. Det som hindrar bakterier från att föröka sig är antingen mycket låga temperaturer eller mycket höga temperaturer. Ökning av temperatur ökar bakteriernas metaboliska aktivitet, vilket kan öka tillväxten av bakterier till en punkt där proteinerna skadas och bakteriernas cellfunktion sjunker till noll [18]. Dessutom kan det ses i figur 6 att prover som var inkuberade vid 30°C i 21 månader, avviker mycket mer än prover som var inkuberade vid 30°C i 3 månader. Även prover som var lagrade vid 25°C i 21 månader, avviker mycket mer än prover som lagrades vid samma temperatur i 3 månader. Precis som slutsatsen i litteraturstudien av Martin Wilkinson, kan det även ses här att längre inkubationstider leder till sämre överensstämmelse mellan resultaten från flödescytometrin och plattmetoden [16].

Lozenger

Resultaten från flödescytometrin och plattmetoden avvek mycket för lozengproverna, vilket framgår i figur 7. De prover som befann sig i rumstemperatur, utan någon inkubationstid, uppnådd ett mer överensstämmande resultat än de prover som varit inkuberade i 12 månader i 25 °C. Tester för andra inkubationstider utelämnades på grund av tidsbrist. Om datainsamlingen hade kunnat utökas för fler temperaturer och fler inkubationstider, hade en mer säker slutsats kunnat dras. Resultatet visar att alla testade prover, visade på ett högre antal levande bakterier i flödescytometrin än i plattmetoden. Detta innebär att bakteriernas förmåga att föröka sig har minskat men att cellmembranet fortfarande är helt [18].

Kapslar

Resultaten vid jämförelsen av metoderna på probiotiska prover i form av kapslar, avvek mycket från varandra. Avvikelsen ser lite annorlunda ut än vad som sågs vid analysen av de tidigare produkterna. Prover som har varit inkuberade under kortare tid, d.v.s. i 4 månader, avviker mycket mer än de övriga kapselproverna. Ett mindre antal växande kolonier påvisades på platta medan antalet levande bakterier var väldigt högt på flödescytometri. Detta kan tyckas vara oväntat med tanke på att de har mindre inkubationstid än övriga prover. Figur 8 visar dubbelprov i samma färg. Prover som lagrades vid 5 °C i 24 månader visar relativt likt resultat. Detsamma gäller även för prover som var inkuberade i 25 °C under 24 månader. En anledning till detta kan vara tiden som proverna fick vänta i MRS-buljonglösningen tills att flödescytometrin skulle utföras [19]. I figur 11 visas en jämförelse av väntetidens påverkan. Det framgår tydligt att prover som har fått vänta kortare tid, avviker mindre från det förväntade resultatet och att prover som har fått vänta cirka en timme längre, har en större avvikelse.



Figur 11. En jämförelse av tidens påverkan visas, i figuren. Det framgår tydligt att prover med längre väntetid har en större avvikelse från det förväntade än förväntat.

Kultur

Alla prover i form av frystorkade kultur, avvek från det förväntade resultatet. Detta kan ses i figur 9. Startprover visade på fler levande bakterier med plattmetoden men mycket färre med flödescytometrin. Prover som var inkuberade i 2 månader i 37 °C, visade motsatt resultat. Det var fler levande bakterier med flödescytometrin än med plattmetoden. En anledning till detta kan vara att det har skett ett spädningsfel vid pipetteringen inför den flödescytometriska analysen. Det som tyder på att det kan ha skett ett pipetteringsfel, är att den totala mängden celler som passerade flödescytometern, verkar vara mindre än resultatet på antalet växande kolonier på plattmetoden, vilket är omöjligt. På ett av proven är det totala antalet celler i flödescytometern $2,59 \times 10^{11}$ medan antalet växande kolonier på plattmetoden är $4,54 \times 10^{11}$. Det kan inte växa fler kolonier än det totala antalet bakterieceller i provet.

Olja

Resultaten för probiotiska prover i form av olja ser intressanta ut, eftersom de inte liknar de andra proverna, vilket framgår i figur 10. Dessa avviker på ett annat sätt. Prover som har varit inkuberade i 5 °C och 25 °C avviker mycket mer än provet som var inkuberat i 30 °C. Till skillnad från de andra produkterna, avviker olje-proven mer för de prover som har varit inkuberade under lägre temperaturer.

De gemensamma resultaten för alla produkttyper tycktes stämma mycket bra överens för vissa produkter medan för andra produkter, avvek resultaten helt. För de prover där resultatet avvek mycket från det förväntade, var orsaken i det flesta fall de höga temperaturerna (> 25 °C) eller på grund av den långa inkubationstiden (> 3månader) [16,18]. Däremot finns det andra produkttyper som visade sig vara helt tvärtom. Detta visar att det inte finns ett tydligt mönster på vad som egentligen påverkar bakteriernas överlevnad, som i sin tur påverkar jämförelsen av metoderna. För att det skulle vara enklare att dra en slutsats om vilka faktorer som faktiskt påverkar, borde lika många tester av varje produkttyp testats. Testerna bör dessutom haft en konstant faktor och en dynamisk faktor för att det skulle vara lättare att avgöra vad som egentligen påverkar skillnaderna mellan metoderna.

Flödescytometern som användes skiljer levande, döda, respektive skadade bakterieceller efter deras membranintegritet medan plattmetoden skiljer döda respektive levande bakterier, genom deras förmåga att föröka sig på agar-platta [20]. Metoderna mäter alltså olika egenskaper hos bakteriecellerna. En alternativ jämförelse hade kunnat ske med en annan flödescytmetrisk analys som ger en bättre överstämmelse med plattmetoden. Resultaten visar att alla celler med intakt membran inte har förmåga att föröka sig, vilket gör att metoderna inte stämmer överens med varandra som det var förväntat [21]. ISO19344 föreslår förutom infärgning med SYTO24/PI, även infärgning med cFDA/PI, som mäter på bakteriernas esteras-aktivitet och membranintegritet. Förslagsvis kan DiOC2 också användas, som mäter bakteriernas membranpotential [22]. Möjligtvis kan dessa infärgningar ha en bättre överensstämmelse med plattmetoden [17].

SLUTSATS

Resultatet från studien har visat att jämförelsen av plattmetoden och flödescytmetrin på probiotiska prover, avviker mer än förväntat. För vissa probiotiska prover, avviker det mer och för vissa mindre. Resultaten följer dock inte ett mönster. I dagsläget är det därför omöjligt att dra slutsatsen ifall det är möjligt att ersätta plattmetoden med flödescytmetri. För framtida studier kan en annan infärgningsteknik användas inom flödescytmetrisk analys som möjligtvis kan ge ett mer överensstämmande resultat vid jämförelsen av metoderna. Det bör dessutom användas specifika testförhållanden som kan göra det enklare att dra slutsatser om vissa faktorer har inverkan eller inte [21, 22].

REFERENSER

1. Bruslik N L, Damshkaln L G, Ilinskaya P Å, Konovalova O A, Lozinsky C I, Yarullina D R, (2015) Towards effective and stable probiotics. *Int J Risk Saf Med*, 27, S6-65.
2. Bengmark S, (2006) Den bioekologiska medicinen har kommit för att stanna. *Läkartidningen nr 5, 103*, 293–297.
3. World Health Organization, (2002) *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. ><https://www.who.int/> < PDF (2021-03-08)
4. BioGaia, (2020) *BioGaias historik, viktiga egenskaper hos Lactobacillus reuteri*. ><https://www.biogaia.se> <(2021-01-29)
5. Kotodziej M, Szajewska H, (2018) Lactobacillus reuteri DSM 17938 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized clinical trial. *Clinical microbiology and infection*, 25, 699-704.
6. Sinkiewicz G, (2010) *Lactobacillus Reuteri in health and Disease*. Malmö, Malmö university.
7. FDA, (2003) *Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products* ><https://www.fda.gov> < PDF (2021-03-08)
8. The international Dairy federation (2003) ISO 7889 Yoghurt — Enumeration of characteristic microorganisms — Colony-count technique at 37 °C. *ISO, 1*, 1-11.
9. Givan A L, (2010) Flow Cytometry: An Introduction. *Springer Link*, 699, 1-29.
10. McKinnon K M, (2018) Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology*, 120, 5.1.1-5.1.11.
11. Chen Y, Deng Y, Long Y, Wang L, (2020) Optimization of staining with SYTO 9/propidium iodide: interplay, kinetics, and impact on Brevibacillus brevis. *BioTechniques*, 69, 86-99.
12. Atsumi T, Ishizu A, Masuda S, Shimizu S, Matsuo J, Nishibata Y, Kusunoki Y, Hattanda F, Shida H, Nakazawa D, Tomaru U, (2017) Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry. *Wiley Online Library*, 1, 822-829.
13. ThermoFisher Scientific, (2014) *SYTO® Green-Fluorescent Nucleic Acid Stains*. ><https://www.thermofisher.com>< PDF (2021-02-27)
14. Fujikura K, Higashiyama T, Takata T, Suzuki T, (1997) DNA Staining for Fluorescence and Laser Confocal Microscopy. *Sage journals*, 45, 49-53.

15. Michelutti L, Bulfoni M, Nencioni Emanuele, (2020) Anovel pharmaceutical approach for the analytical validation of probiotic bacterial count by flow cytometry. *Journal of microbiological methods*, 170, 1-10.
16. Wilkinson M, (2018) Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 2018,1-10.
17. The international Dairy federation, (2015) ISO 19344 Milk and milk products — Starter cultures, probiotics an fermented products — Quantification of lactic acid bacteria by flow cytometry. *ISO,1*, 1-25.
18. Madigan MT, Martinko JM, Parker J, (2003) *Brock Biology of Miroorganisms, 10th edition*, Carbondale, Pearson.
19. De Man J C, Sharpe M E, Rogosa M, (2008) A Medium the cultivation of lactobacilli. *Society for applied microbiology*,23, 130-135.
20. Buntof C J, (2002) *Flow cytometrym fluorescent probes, and flashing bacteria*. ><https://edepot.wur.nl/121280>< PDF (2021-03-24)
21. Ericsson E, Ericson T, (2018) *Klinisk mikrobiologi: infektioner, immunologi vårdhygien*, Stockholm, Liber.
22. ABEE T, Bunthof C J, Blomemen K, Breeuwer P, Rombouts F M, (2000) Flow Cytometric Assessment of Viability of Lactic Acid Bacteria. *Americn society for microbiology no 5, 67*, 2326-2334.

BILAGA 1: DATAINSAMLING

Tabellerna visar datainsamlingen för tabletter.

TABLETTER																
0 månader																
Study ID	Sample Name	Product type	Temperature	Study Duration	time (solubilisation)	time (staining)	time (FC analysis)	Time difference (solubilisation and FC analysis)	Live (events/g)	average	damaged (events/g)	dead (events/g)	Total (events/g)	Plate count (CFU/g)	average(CFU/g)	
S2020-081 IN USE 1	1	Tablet	Rumtemperatur	0m	09:02	10:51	11:11:06		02:09:06	2,24E+09	2,16E+09	9,38E+08	1,93E+09	6,54E+09	2,13E+09	2,33E+09
S2020-081 IN USE 1	1	Tablet	Rumtemperatur	0m	09:02	10:51	11:11:52		02:09:52	2,05E+09		8,95E+08	1,79E+09	5,97E+09	2,60E+09	
S2020-081 IN USE 1	1	Tablet	Rumtemperatur	0m	09:02	10:51	11:12:29		02:10:29	2,20E+09		8,16E+08	2,14E+09	6,33E+09	2,21E+09	
S2020-081 IN USE 2	2	Tablet	Rumtemperatur	0m	09:04	10:51	11:13:26		02:09:26	1,96E+09	2,10E+09	7,86E+08	1,80E+09	5,82E+09	2,13E+09	2,13E+09
S2020-081 IN USE 2	2	Tablet	Rumtemperatur	0m	09:04	10:51	11:14:14		02:10:14	2,21E+09		8,76E+08	1,99E+09	6,42E+09	2,25E+09	
S2020-081 IN USE 2	2	Tablet	Rumtemperatur	0m	09:04	10:51	11:14:59		02:10:59	2,12E+09		9,01E+08	1,88E+09	6,19E+09	2,02E+09	
25 grader																
Study ID	Sample Name	Product type	Temperature	Study Duration	time (solubilisation)	time (staining)	time (FC analysis)	Time difference (solubilisation and FC analysis)	Live (events/g)	average	damaged (events/g)	dead (events/g)	Total (events/g)	Plate count (CFU/g)	average(CFU/g)	
S2020-090 40:1	40:1	Tablet	40 ZM	40 ZM	10:00	12:56	13:19:20		03:19:20	1,10E+09	1,03E+09	6,41E+08	1,85E+09	5,19E+09	8,88E+08	9,76E+08
S2020-090 40:1	40:1	Tablet	40 ZM	40 ZM	10:00	12:56	13:20:09		03:20:09	1,10E+09		6,08E+08	1,70E+09	4,94E+09	1,03E+09	
S2020-090 40:1	40:1	Tablet	40 ZM	40 ZM	10:00	12:56	13:21:00		03:21:00	8,37E+08		4,65E+08	1,51E+09	3,98E+09	1,01E+09	
S2020-090 40:2	40:2	Tablet	40 ZM	40 ZM	10:02	12:56	13:21:56		03:19:56	1,09E+09	1,06E+09	5,72E+08	1,80E+09	5,03E+09	9,07E+08	9,48E+08
S2020-090 40:2	40:2	Tablet	40 ZM	40 ZM	10:02	12:56	13:22:46		03:20:46	1,08E+09		5,57E+08	1,85E+09	4,95E+09	8,88E+08	
S2020-090 40:2	40:2	Tablet	40 ZM	40 ZM	10:02	12:56	13:23:37		03:21:37	1,00E+09		5,55E+08	1,70E+09	4,70E+09	1,05E+09	
D53020-091 40:1	40:1	Tablet	40 ZM	40 ZM	11:03	12:05	12:28:41		01:25:41	1,03E+09	1,02E+09	7,53E+08	1,79E+09	4,94E+09	7,10E+08	8,42E+08
D53020-091 40:1	40:1	Tablet	40 ZM	40 ZM	11:03	12:05	12:26:59		01:23:59	1,06E+09		7,47E+08	1,87E+09	5,02E+09	8,88E+08	
D53020-091 40:1	40:1	Tablet	40 ZM	40 ZM	11:03	12:05	12:27:50		01:24:50	9,65E+08		6,98E+08	1,82E+09	4,81E+09	9,27E+08	
D53020-091 40:2	40:2	Tablet	40 ZM	40 ZM	11:05	12:05	12:29:32		01:24:32	9,99E+08	1,06E+09	7,18E+08	1,60E+09	4,61E+09	7,89E+08	8,75E+08
D53020-091 40:2	40:2	Tablet	40 ZM	40 ZM	11:05	12:05	12:30:24		01:25:24	1,08E+09		7,84E+08	1,83E+09	4,99E+09	8,89E+08	
D53020-091 40:2	40:2	Tablet	40 ZM	40 ZM	11:05	12:05	12:31:15		01:26:15	1,11E+09		7,11E+08	1,91E+09	5,05E+09	9,47E+08	
S2020-097 40:1	40:1	Tablet	40 ZM	40 ZM	11:00	12:35	12:55:14		01:55:14	8,79E+08	8,97E+08	6,45E+08	2,67E+09	5,31E+09	1,20E+09	1,34E+09
S2020-097 40:1	40:1	Tablet	40 ZM	40 ZM	11:00	12:35	12:56:03		01:56:03	9,07E+08		6,20E+08	2,85E+09	5,34E+09	1,50E+09	
S2020-097 40:1	40:1	Tablet	40 ZM	40 ZM	11:00	12:35	12:56:52		01:56:52	9,12E+08		7,52E+08	2,64E+09	5,48E+09	1,32E+09	
S2020-097 40:2	40:2	Tablet	40 ZM	40 ZM	11:02	12:35	12:57:41		01:55:41	9,39E+08	9,56E+08	5,00E+08	2,65E+09	5,15E+09	1,34E+09	1,31E+09
S2020-097 40:2	40:2	Tablet	40 ZM	40 ZM	11:02	12:35	12:58:31		01:56:31	9,97E+08		7,37E+08	2,91E+09	5,85E+09	1,47E+09	
S2020-097 40:2	40:2	Tablet	40 ZM	40 ZM	11:02	12:35	12:59:18		01:57:18	9,32E+08		6,39E+08	2,87E+09	5,41E+09	1,22E+09	
25 grader 3 månader																
Study ID	Sample Name	Product type	Temperature	Study Duration	time (solubilisation)	time (staining)	time (FC analysis)	Time difference (solubilisation and FC analysis)	Live (events/g)	average	damaged (events/g)	dead (events/g)	Total (events/g)	Plate count (CFU/g)	average(CFU/g)	
S2020-085 25:1	25:1	Tablet	25 3M	25 3M	09:39	10:52	11:07:10		01:28:10	1,53E+09	1,55E+09	7,63E+08	2,02E+09	5,82E+09	1,55E+09	1,67E+09
S2020-085 25:1	25:1	Tablet	25 3M	25 3M	09:39	10:52	11:07:57		01:28:57	1,57E+09		7,18E+08	1,89E+09	5,67E+09	1,51E+09	
S2020-085 25:1	25:1	Tablet	25 3M	25 3M	09:39	10:52	11:08:45		01:29:45	1,55E+09		6,42E+08	1,97E+09	5,48E+09	1,54E+09	
S2020-085 25:2	25:2	Tablet	25 3M	25 3M	09:37	10:52	11:09:34		01:32:34	1,41E+09	1,51E+09	5,60E+08	1,88E+09	5,23E+09	1,58E+09	1,65E+09
S2020-085 25:2	25:2	Tablet	25 3M	25 3M	09:37	10:52	11:10:24		01:33:24	1,56E+09		5,70E+08	1,98E+09	5,50E+09	1,82E+09	
S2020-085 25:2	25:2	Tablet	25 3M	25 3M	09:37	10:52	11:11:12		01:34:12	1,55E+09		5,94E+08	1,93E+09	5,38E+09	1,53E+09	
S2020-085 30:1	30:1	Tablet	30 3M	30 3M	09:41	10:52	11:12:01		01:31:01	1,60E+09	1,53E+09	7,30E+08	2,12E+09	5,85E+09	1,22E+09	1,45E+09
S2020-085 30:1	30:1	Tablet	30 3M	30 3M	09:41	10:52	11:12:49		01:31:49	1,51E+09		6,98E+08	1,99E+09	5,49E+09	1,71E+09	
S2020-085 30:1	30:1	Tablet	30 3M	30 3M	09:41	10:52	11:13:37		01:32:37	1,49E+09		5,72E+08	1,91E+09	5,28E+09	1,45E+09	
S2020-085 30:2	30:2	Tablet	30 3M	30 3M	09:44	10:52	11:14:27		01:30:27	1,26E+09	1,23E+09	5,18E+08	1,68E+09	4,70E+09	1,28E+09	1,44E+09
S2020-085 30:2	30:2	Tablet	30 3M	30 3M	09:44	10:52	11:15:19		01:31:19	1,20E+09		5,04E+08	1,61E+09	4,45E+09	1,71E+09	
S2020-085 30:2	30:2	Tablet	30 3M	30 3M	09:44	10:52	11:16:12		01:32:12	1,22E+09		5,32E+08	1,82E+09	4,72E+09	1,34E+09	
S2020-085 40:1	40:1	Tablet	40 3M	40 3M	09:46	10:52	11:17:04		01:31:04	9,70E+08	1,01E+09	7,21E+08	2,16E+09	5,29E+09	7,44E+08	7,25E+08
S2020-085 40:1	40:1	Tablet	40 3M	40 3M	09:46	10:52	11:17:53		01:31:53	1,04E+09		6,84E+08	2,37E+09	5,53E+09	7,00E+08	
S2020-085 40:1	40:1	Tablet	40 3M	40 3M	09:46	10:52	11:18:41		01:32:41	1,03E+09		7,14E+08	2,39E+09	5,54E+09	7,30E+08	
S2020-085 40:2	40:2	Tablet	40 3M	40 3M	09:49	10:52	11:19:30		01:30:30	8,85E+08	9,13E+08	6,02E+08	1,95E+09	4,60E+09	7,44E+08	7,52E+08
S2020-085 40:2	40:2	Tablet	40 3M	40 3M	09:49	10:52	11:20:22		01:31:22	9,38E+08		7,10E+08	2,14E+09	5,04E+09	7,54E+08	
S2020-085 40:2	40:2	Tablet	40 3M	40 3M	09:49	10:52	11:21:12		01:32:12	9,55E+08		5,80E+08	1,98E+09	4,68E+09	7,56E+08	
25 grader 12 månader																
Study ID	Sample Name	Product type	Temperature	Study Duration	time (solubilisation)	time (staining)	time (FC analysis)	Time difference (solubilisation and FC analysis)	Live (events/g)	average	damaged (events/g)	dead (events/g)	Total (events/g)	Plate count (CFU/g)	average(CFU/g)	
S2020-006 25:1	25:1	Tablet	25 12M	25 12M	11:12	02:36	12:50:58		01:38:58	2,38E+09	2,51E+09	9,15E+08	2,79E+09	6,68E+09	2,13E+09	2,32E+09
S2020-006 25:1	25:1	Tablet	25 12M	25 12M	11:12	02:36	12:51:44		01:39:44	2,39E+09		9,34E+08	2,55E+09	6,22E+09	2,40E+09	
S2020-006 25:1	25:1	Tablet	25 12M	25 12M	11:12	04:36	12:52:30		01:40:30	2,57E+09		8,59E+08	1,81E+09	6,59E+09	2,44E+09	
S2020-006 25:2	25:2	Tablet	25 12M	25 12M	11:23	05:36	12:53:16		01:30:16	1,90E+09	1,91E+09	8,38E+08	1,59E+09	5,67E+09	2,60E+09	2,46E+09
S2020-006 25:2	25:2	Tablet	25 12M	25 12M	11:23	06:36	12:54:04		01:31:04	1,89E+09		7,76E+08	1,70E+09	5,68E+09	2,44E+09	
S2020-006 25:2	25:2	Tablet	25 12M	25 12M	11:23	07:36	12:54:52		01:31:52	1,96E+09		7,64E+08	1,60E+09	5,71E+09	2,33E+09	
D53020-008 X04 25:1	25:1	Tablet	25 12M	25 12M	09:58	11:07	11:22:53		01:24:53	1,53E+09	1,58E+09	6,15E+08	1,43E+09	4,42E+09	1,34E+09	1,39E+09
D53020-008 X04 25:1	25:1	Tablet	25 12M	25 12M	09:58	11:07	11:23:46		01:25:46	1,58E+09		6,74E+08	1,33E+09	4,37E+09	1,36E+09	
D53020-008 X04 25:1	25:1	Tablet	25 12M	25 12M	09:58	11:07	11:24:39		01:26:39	1,61E+09		6,22E+08	1,32E+09	4,35E+09	1,48E+09	
D53020-008 X04 25:2	25:2	Tablet	25 12M	25 12M	09:40	11:07	11:25:33		01:45:33	1,61E+09	1,57E+09	5,24E+08	1,20E+09	4,04E+09	1,12E+09	1,18E+09
D53020-008 X04 25:2	25:2	Tablet	25 12M	25 12M	09:40	11:07	11:26:28		01:46:28	1,59E+09		5,62E+08	1,29E+09	4,29E+09	1,40E+09	
D53020-008 X04 25:2	25:2	Tablet	25 12M	25 12M	09:40	11:07	11:27:21		01:47:21	1,51E+09		6,23E+08	1,17E+09	4,01E+09	1,03E+09	
D53020-008 X05 25:1	25:1	Tablet	25 12M	25 12M	09:43	11:07	11:28:17		01:45:17	2,24E+09	2,21E+09	8,13E+08	1,58E+09	5,46E+09	2,02E+09	2,02E+09
D53020-008 X05 25:1	25:1	Tablet	25 12M	25 12M	09:43	11:07	11:29:05		01:46:0							

Tabellerna visar datainsamlingen för droppar.

Droppar																
25 grader 3 månader																
Study ID	Sample Name	Product type	Temperature	Study Duration	time (solubilisation)	time (staining)	time (FC analysis)	time difference	Time difference (solubilisation and FC analysis)	Live (events/g)	average	damaged (events/g)	dead (events/g)	Total (events/g)	Plate count	average(CFU/g)
S2020-076	25.1	Droppar	25	3M	09:50	10:26	10:45:08	00:27:30	02:09:50	3,27E+09	3,20E+09	1,46E+09	2,08E+09	8,82E+09	3,53E+09	3,58E+09
S2020-076	25.1	Droppar	25	3M	09:50	10:26	10:45:50	00:28:09	02:10:09	1,17E+09	1,58E+09	1,53E+09	2,04E+09	8,71E+09	3,61E+09	3,61E+09
S2020-076	25.1	Droppar	25	3M	09:50	10:26	10:46:32	01:00:38	01:37:38	3,29E+09	1,58E+09	1,58E+09	1,97E+09	8,82E+09	4,40E+09	4,40E+09
S2020-076	25.2	Droppar	25	3M	09:52	10:26	10:47:14	01:01:17	01:38:17	3,25E+09	3,45E+09	1,40E+09	1,96E+09	8,03E+09	3,68E+09	3,44E+09
S2020-076	25.2	Droppar	25	3M	09:52	10:26	10:47:57	01:01:56	01:38:56	3,52E+09	1,50E+09	1,50E+09	1,85E+09	8,93E+09	3,78E+09	3,78E+09
S2020-076	25.2	Droppar	25	3M	09:52	10:26	10:48:38	01:02:34	01:39:34	3,98E+09	1,45E+09	1,45E+09	1,86E+09	9,78E+09	3,90E+09	3,90E+09
25 grader 21 månader																
Study ID	Sample Name	Product type	Temperature	Study Duration	time (solubilisation)	time (staining)	time (FC analysis)	time difference	Time difference (solubilisation and FC analysis)	Live (events/g)	average	damaged (events/g)	dead (events/g)	Total (events/g)	Plate count	average(CFU/g)
S2019-035	8029.25.1	Droppar	25	21M	08:06	10:51	11:06:56	00:15:56	03:00:56	1,88E+09	1,74E+09	1,33E+09	2,35E+09	8,04E+09	3,06E+09	3,05E+09
S2019-035	8029.25.1	Droppar	25	21M	08:06	10:51	11:07:39	00:16:29	03:01:39	1,58E+09	1,17E+09	1,17E+09	1,58E+09	6,98E+09	2,98E+09	2,98E+09
S2019-035	8029.25.1	Droppar	25	21M	08:06	10:51	11:08:24	00:17:24	03:02:24	1,77E+09	1,77E+09	1,95E+09	2,18E+09	7,57E+09	2,98E+09	2,98E+09
S2019-035	8029.25.2	Droppar	25	21M	08:08	10:51:00	11:09:08	00:18:08	03:01:08	2,46E+09	1,57E+09	1,79E+09	2,03E+09	8,00E+09	2,56E+09	2,36E+09
S2019-035	8029.25.2	Droppar	25	21M	08:08	10:51	11:09:51	00:18:51	03:01:51	2,24E+09	1,65E+09	1,65E+09	2,18E+09	7,73E+09	2,17E+09	2,17E+09
S2019-035	8029.25.2	Droppar	25	21M	08:08	10:51	11:10:34	00:19:34	03:02:34	1,77E+09	1,77E+09	1,33E+09	1,66E+09	6,38E+09	2,36E+09	2,36E+09
S2019-035	8029.25.1	Droppar	25	21M	11:20	12:59	14:37:16	01:18:16	01:17:16	3,28E+09	3,23E+09	1,22E+09	8,25E+09	7,10E+09	1,87E+09	1,91E+09
S2019-035	8029.25.1	Droppar	25	21M	11:20	12:59	14:38:00	01:19:00	01:18:00	3,06E+09	3,06E+09	1,09E+09	7,24E+09	6,52E+09	2,05E+09	2,05E+09
S2019-035	8029.25.1	Droppar	25	21M	11:20	12:59	14:38:46	01:19:46	01:18:46	3,33E+09	3,33E+09	1,27E+09	8,09E+09	7,14E+09	2,02E+09	2,02E+09
S2019-035	8029.25.2	Droppar	25	21M	11:22	12:59	14:39:11	01:19:11	01:17:11	3,76E+09	3,70E+09	1,41E+09	7,78E+09	7,05E+09	1,78E+09	1,78E+09
S2019-035	8029.25.2	Droppar	25	21M	11:22	12:59	14:40:14	01:14:14	01:18:14	3,24E+09	3,24E+09	1,28E+09	8,62E+09	7,66E+09	2,33E+09	2,33E+09
S2019-035	8029.25.2	Droppar	25	21M	11:22	12:59	14:40:57	01:14:57	01:18:57	3,62E+09	3,62E+09	1,11E+09	7,93E+09	7,14E+09	2,02E+09	2,02E+09
S2019-035	8013.25.1	Droppar	25	21M	11:36	12:59	14:47:04	01:11:04	01:11:04	2,79E+09	3,01E+09	9,27E+08	5,08E+08	5,93E+09	2,05E+09	2,05E+09
S2019-035	8013.25.1	Droppar	25	21M	11:36	12:59	14:47:50	01:14:50	01:11:50	3,18E+09	3,18E+09	9,94E+08	5,88E+08	6,84E+09	1,98E+09	1,98E+09
S2019-035	8013.25.1	Droppar	25	21M	11:36	12:59	14:46:18	01:17:18	01:10:18	3,05E+09	3,05E+09	9,67E+08	7,08E+08	6,49E+09	1,78E+09	1,78E+09
S2019-035	8013.25.2	Droppar	25	21M	11:54	12:59	14:48:36	01:19:36	02:34:36	3,17E+09	3,26E+09	9,37E+08	7,95E+08	6,54E+09	2,29E+09	2,12E+09
S2019-035	8013.25.2	Droppar	25	21M	11:54	12:59	14:49:23	01:20:23	02:35:23	3,18E+09	3,18E+09	9,25E+08	6,19E+08	6,41E+09	2,05E+09	2,05E+09
S2019-035	8013.25.2	Droppar	25	21M	11:54	12:59	14:50:08	01:21:08	02:36:08	3,43E+09	3,43E+09	1,02E+09	8,61E+08	7,13E+09	2,05E+09	2,05E+09
S2019-035	8013.25.2	Droppar	25	21M	10:52	12:05	12:32:05	00:27:05	01:40:05	1,48E+09	1,43E+09	9,40E+08	1,41E+09	5,53E+09	1,05E+09	1,05E+09
S2019-035	8013.25.2	Droppar	25	21M	10:52	12:05	12:32:54	00:27:54	01:40:54	1,44E+09	1,44E+09	8,01E+08	1,47E+09	5,53E+09	1,24E+09	1,24E+09
S2019-035	8013.25.1	Droppar	25	21M	10:52	12:05	12:33:42	00:28:42	01:41:42	1,38E+09	1,38E+09	8,43E+08	1,45E+09	6,83E+09	3,26E+07	3,26E+07
S2019-035	8013.25.1	Droppar	25	21M	10:55	12:05	12:34:32	00:29:32	01:39:32	1,73E+09	1,66E+09	8,89E+08	1,49E+09	6,14E+09	1,20E+09	1,20E+09
S2019-035	8013.25.1	Droppar	25	21M	10:55	12:05	12:35:19	00:30:19	01:40:19	1,67E+09	1,67E+09	9,61E+08	1,46E+09	6,10E+09	9,67E+08	9,67E+08
S2019-035	8013.25.1	Droppar	25	21M	10:55	12:05	12:36:05	00:31:05	01:41:05	1,58E+09	1,58E+09	8,11E+08	1,45E+09	5,71E+09	1,43E+09	1,43E+09
30 grader 3 månader																
Study ID	Sample Name	Product type	Temperature	Study Duration	time (solubilisation)	time (staining)	time (FC analysis)	time difference	Time difference (solubilisation and FC analysis)	Live (events/g)	average	damaged (events/g)	dead (events/g)	Total (events/g)	Plate count	average(CFU/g)
S2020-076	30.1	Droppar	30	3M	09:55	10:26	10:49:20	00:23:20	00:54:20	2,64E+09	2,68E+09	1,88E+09	2,64E+09	7,73E+09	2,75E+09	2,75E+09
S2020-076	30.1	Droppar	30	3M	09:55	10:26	10:50:04	00:24:04	00:55:04	2,65E+09	2,65E+09	1,32E+09	1,52E+09	7,09E+09	3,37E+09	3,37E+09
S2020-076	30.1	Droppar	30	3M	09:57	11:45	12:01:32	00:16:32	02:04:32	1,72E+09	1,72E+09	1,26E+09	1,72E+09	6,11E+09	7,08E+09	7,08E+09
S2020-076	30.2	Droppar	30	3M	09:57	11:45	12:02:15	00:17:15	02:05:15	3,32E+09	1,29E+09	1,29E+09	1,70E+09	8,38E+09	3,80E+09	3,80E+09
S2020-076	30.2	Droppar	30	3M	09:57	11:45	12:02:57	00:17:57	02:05:57	3,30E+09	1,30E+09	1,30E+09	1,71E+09	8,42E+09	3,41E+09	3,41E+09
30 grader 21 månader																
Study ID	Sample Name	Product type	Temperature	Study Duration	time (solubilisation)	time (staining)	time (FC analysis)	time difference	Time difference (solubilisation and FC analysis)	Live (events/g)	average	damaged (events/g)	dead (events/g)	Total (events/g)	Plate count	average(CFU/g)
S2019-035	8029.30.1	Droppar	30	21M	11:25	12:59	14:41:42	01:16:42	03:16:42	1,78E+09	1,67E+09	1,32E+09	1,04E+09	6,65E+09	8,80E+06	7,47E+06
S2019-035	8029.30.1	Droppar	30	21M	11:25	12:59	14:42:28	01:17:28	03:17:28	1,66E+09	1,66E+09	1,35E+09	9,77E+08	6,49E+09	6,60E+06	6,60E+06
S2019-035	8029.30.2	Droppar	30	21M	11:25	12:59	14:43:13	01:18:13	03:18:13	1,56E+09	1,56E+09	1,24E+09	1,01E+09	6,11E+09	7,08E+06	7,08E+06
S2019-035	8029.30.2	Droppar	30	21M	11:31	12:59	14:44:00	01:14:00	03:13:00	1,88E+09	1,96E+09	1,40E+09	1,01E+09	6,33E+09	2,00E+07	2,99E+07
S2019-035	8029.30.2	Droppar	30	21M	11:31	12:59	14:44:47	01:14:47	03:13:47	1,97E+09	1,97E+09	1,48E+09	1,12E+09	6,62E+09	3,68E+07	3,68E+07
S2019-035	8029.30.2	Droppar	30	21M	11:31	12:59	14:45:32	01:15:32	03:14:32	2,02E+09	1,95E+09	1,45E+09	1,15E+09	6,83E+09	3,26E+07	3,26E+07
S2019-035	8013.30.1	Droppar	30	21M	12:25	12:59	14:50:52	01:25:52	02:25:52	1,38E+09	1,48E+09	8,72E+08	7,07E+08	6,50E+09	5,78E+07	4,77E+07
S2019-035	8013.30.1	Droppar	30	21M	12:25	12:59	14:51:38	01:26:38	02:26:38	1,47E+09	1,47E+09	9,53E+08	8,12E+08	5,39E+09	5,78E+07	5,78E+07
S2019-035	8013.30.1	Droppar	30	21M	12:25	12:59	14:52:27	01:27:27	02:27:27	1,39E+09	1,39E+09	9,53E+08	8,30E+08	6,05E+09	2,78E+07	2,78E+07
S2019-035	8013.30.2	Droppar	30	21M	12:27	12:59	14:53:14	01:26:14	02:26:14	1,68E+09	1,73E+09	1,13E+09	9,32E+08	5,41E+09	4,56E+07	4,93E+07
S2019-035	8013.30.2	Droppar	30	21M	12:27	12:59	14:54:03	01:27:03	02:27:03	1,86E+09	1,86E+09	1,13E+09	9,88E+08	5,74E+09	5,11E+07	5,11E+07
S2019-035	8013.30.2	Droppar	30	21M	12:27	12:59	14:54:51	01:27:51	02:27:51	1,63E+09	1,63E+09	1,13E+09	9,71E+08	5,32E+09	5,11E+07	5,11E+07
40 grader 3 månader																
Study ID	Sample Name	Product type	Temperature	Study Duration	time (solubilisation)	time (staining)	time (FC analysis)	time difference	Time difference (solubilisation and FC analysis)	Live (events/g)	average	damaged (events/g)	dead (events/g)	Total (events/g)	Plate count	average(CFU/g)
S2020-076	40.1	Droppar	40	3M	09:55	11:45	12:03:40	00:18:40	02:08:40	2,01E+09	1,88E+09	1,44E+09	2,55E+09	8,33E+09	1,01E+09	1,14E+09
S2020-076	40.1	Droppar	40	3M	09:55	11:45	12:04:22	00:19:22	02:09:22	2,01E+09	1,88E+09	1,44E+09	2,55E+09	7,29E+09	1,24E+09	1,24E+09
S2020-076	40.1	Droppar	40	3M	09:55	11:45	12:05:05	00:20:05	02:10:05	1,76E+09	1,76E+09	1,19E+09	2,42E+09	7,47E+09	1,18E+09	1,18E+09
S2020-076	40.2	Droppar	40	3M	10:01	11:45	11:56:39	00:11:39	01:55:39	1,86E+09	1,92E+09	1,23E+09	2,32E+09	7,70E+09	1,11E+09	1,16E+09
S2020-076	40.2	D														

Tabellerna visar datainsamlingen för Kultur.

Kultur																	
Rumstemperatur 0 Månader																	
Study ID	Sample Name	Product type	Temperature	Study Duration	time (solubilisation)	time (staining)	time (FC analysis)	time difference	Time difference (solubilisation and FC analysis)	Live (events/g)	average	damaged (events/g)	dead (events/g)	Total (events/g)	Plate count (CFU/g)	average(CFU/g)	
DS2021-002	CED01BIO-1	Kultur	Rumstemperatur	OM	10:15	13:27	13:43:52	00:16:52		03:28:52	2,29E+11	2,29E+11	1,53E+09	6,11E+09	2,59E+11	4,54E+11	5,20E+11
DS2021-002	CED01BIO-1	Kultur	Rumstemperatur	OM	10:15	13:27	13:45:01	00:18:01		03:30:01	2,40E+11	2,26E+09	7,73E+09	2,72E+11	4,85E+11		
DS2021-002	CED01BIO-1	Kultur	Rumstemperatur	OM	10:15	13:27	13:42:41	00:15:41		03:27:41	2,18E+11	1,19E+09	7,10E+09	2,47E+11	6,20E+11		
DS2021-002	CED01BIO-2	Kultur	Rumstemperatur	OM	10:15	13:27	13:46:09	00:19:09		03:31:09	2,95E+11	2,87E+11	8,66E+09	3,33E+11	6,30E+11	6,17E+11	
DS2021-002	CED01BIO-2	Kultur	Rumstemperatur	OM	10:15	13:27	13:47:09	00:20:09		03:32:09	2,86E+11	2,49E+09	6,36E+09	3,23E+11	6,20E+11		
DS2021-002	CED01BIO-2	Kultur	Rumstemperatur	OM	10:15	13:27	13:48:10	00:21:10		03:33:10	2,80E+11	3,96E+09	7,76E+09	3,18E+11	6,00E+11		
DS2021-002	CED01EURO-1	Kultur	Rumstemperatur	OM	10:18	13:27	13:49:12	00:22:12		03:31:12	2,79E+11	2,79E+11	3,88E+09	1,91E+10	3,24E+11	5,20E+11	5,64E+11
DS2021-002	CED01EURO-1	Kultur	Rumstemperatur	OM	10:18	13:27	13:50:13	00:23:13		03:32:13	2,82E+11	3,25E+09	1,82E+10	3,25E+11	5,62E+11		
DS2021-002	CED01EURO-1	Kultur	Rumstemperatur	OM	10:18	13:27	13:51:14	00:24:14		03:33:14	2,75E+11	4,65E+09	1,83E+10	3,19E+11	6,10E+11		
DS2021-002	CED01EURO-2	Kultur	Rumstemperatur	OM	10:18	13:27	13:52:17	00:25:17		03:34:17	2,99E+11	2,94E+11	5,79E+09	2,62E+10	3,55E+11	5,40E+11	4,62E+11
DS2021-002	CED01EURO-2	Kultur	Rumstemperatur	OM	10:18	13:27	13:53:15	00:26:15		03:35:15	3,06E+11	5,41E+09	2,67E+10	3,63E+11	4,9E+11		
DS2021-002	CED01EURO-2	Kultur	Rumstemperatur	OM	10:18	13:27	13:54:13	00:27:13		03:36:13	2,77E+11	5,05E+09	2,89E+10	3,37E+11	4,26E+11		
37 grader 2 månader																	
Study ID	Sample Name	Product type	Temperature	Study Duration	time (solubilisation)	time (staining)	time (FC analysis)	time difference	Time difference (solubilisation and FC analysis)	Live (events/g)	average	damaged (events/g)	dead (events/g)	Total (events/g)	Plate count (CFU/g)	average(CFU/g)	
DS2020-094	37-1	Kultur	37 2M		09:15	12:05	12:21:30	00:16:30		03:06:30	2,36E+11	2,47E+11	4,73E+10	9,10E+10	3,91E+11	6,33E+10	6,48E+10
DS2020-094	37-1	Kultur	37 2M		09:15	12:05	12:22:26	00:17:26		03:07:26	2,61E+11	3,49E+10	6,78E+10	4,20E+11	7,11E+10		
DS2020-094	37-1	Kultur	37 2M		09:15	12:05	12:23:20	00:18:20		03:08:20	2,44E+11	4,70E+10	9,12E+10	4,00E+11	6,90E+10		
DS2020-094	37-2	Kultur	37 2M		09:17	12:05	12:24:16	00:19:16		03:07:16	2,49E+11	2,57E+11	4,75E+10	9,06E+10	4,03E+11	5,11E+10	5,73E+10
DS2020-094	37-2	Kultur	37 2M		09:17	12:05	12:25:11	00:20:11		03:08:11	2,53E+11	5,24E+10	9,83E+10	4,22E+11	6,51E+10		
DS2020-094	37-2	Kultur	37 2M		09:17	12:05	12:26:05	00:21:05		03:09:05	2,69E+11	5,14E+10	6,80E+10	4,33E+11	5,56E+10		

Tabellerna visar datainsamlingen för Olja.

Olja																	
5 grader 12 månader																	
Study ID	Sample Name	Product type	Temperature	Study Duration	time (solubilisation)	time (staining)	time (FC analysis)	time difference	Time difference (solubilisation and FC analysis)	Live (events/g)	average	damaged (events/g)	dead (events/g)	Total (events/g)	Plate count (CFU/g)	average(CFU/g)	
DS2020-015-1	Olja	5 12M			10:08	12:35	12:41:11	00:06:11		02:33:11	2,80E+09	2,88E+09	8,76E+08	1,85E+09	6,90E+09	3,64E+09	4,05E+09
DS2020-015-1	Olja	5 12M			10:08	12:35	12:41:56	00:06:56		02:33:56	2,83E+09	8,36E+08	1,94E+09	7,05E+09	4,10E+09		
DS2020-015-1	Olja	5 12M			10:08	12:35	12:42:41	00:07:41		02:34:41	3,00E+09	5,91E+08	1,96E+09	7,32E+09	4,60E+09		
DS2020-015-2	Olja	5 12M			10:10	12:35	12:43:25	00:08:25		02:33:25	2,79E+09	2,71E+09	7,99E+08	1,65E+09	6,69E+09	2,90E+09	3,40E+09
DS2020-015-2	Olja	5 12M			10:10	12:35	12:44:10	00:09:10		02:34:10	2,64E+09	7,44E+08	1,59E+09	6,38E+09	3,30E+09		
DS2020-015-2	Olja	5 12M			10:10	12:35	12:44:56	00:09:56		02:34:56	2,69E+09	8,44E+08	1,78E+09	6,79E+09	4,00E+09		
25 grader 12 månader																	
Study ID	Sample Name	Product type	Temperature	Study Duration	time (solubilisation)	time (staining)	time (FC analysis)	time difference	Time difference (solubilisation and FC analysis)	Live (events/g)	average	damaged (events/g)	dead (events/g)	Total (events/g)	Plate count (CFU/g)	average(CFU/g)	
DS2020-0125-1	Olja	25 12M			10:16	12:35	12:45:42	00:10:42		02:29:42	1,95E+09	2,18E+09	9,02E+08	1,76E+09	5,99E+09	3,00E+09	3,44E+09
DS2020-0125-1	Olja	25 12M			10:16	12:35	12:46:29	00:11:29		02:30:29	2,23E+09	9,07E+08	1,94E+09	6,71E+09	4,10E+09		
DS2020-0125-1	Olja	25 12M			10:16	12:35	12:47:15	00:12:15		02:31:15	2,28E+09	1,05E+09	2,00E+09	6,87E+09	3,22E+09		
DS2020-0125-2	Olja	25 12M			10:18	12:35	12:48:00	00:13:00		02:30:00	1,99E+09	2,08E+09	9,00E+08	1,73E+09	6,01E+09	2,91E+09	3,56E+09
DS2020-0125-2	Olja	25 12M			10:18	12:35	12:48:47	00:13:47		02:30:47	2,11E+09	8,55E+08	1,84E+09	6,20E+09	4,60E+09		
DS2020-0125-2	Olja	25 12M			10:18	12:35	12:49:33	00:14:33		02:31:33	2,13E+09	9,51E+08	1,90E+09	6,49E+09	3,18E+09		
30 grader 12 månader																	
Study ID	Sample Name	Product type	Temperature	Study Duration	time (solubilisation)	time (staining)	time (FC analysis)	time difference	Time difference (solubilisation and FC analysis)	Live (events/g)	average	damaged (events/g)	dead (events/g)	Total (events/g)	Plate count (CFU/g)	average(CFU/g)	
DS2020-0130-1	Olja	30 12M			10:19	12:35	12:50:20	00:15:20		02:31:20	1,21E+09	1,30E+09	6,49E+08	1,37E+09	4,71E+09	1,51E+09	1,78E+09
DS2020-0130-1	Olja	30 12M			10:18	12:35	12:51:12	00:16:12		02:32:12	1,33E+09	6,92E+08	1,52E+09	5,10E+09	1,98E+09		
DS2020-0130-1	Olja	30 12M			10:19	12:35	12:52:01	00:17:01		02:33:01	1,35E+09	7,45E+08	1,61E+09	5,25E+09	1,88E+09		
DS2020-0130-2	Olja	30 12M			10:21	12:35	12:52:51	00:17:51		02:31:51	1,49E+09	1,53E+09	8,57E+08	1,91E+09	5,83E+09	1,18E+09	1,51E+09
DS2020-0130-2	Olja	30 12M			10:21	12:35	12:53:39	00:18:39		02:32:39	1,58E+09	8,78E+08	1,88E+09	5,99E+09	1,62E+09		
DS2020-0130-2	Olja	30 12M			10:21	12:35	12:54:26	00:19:26		02:33:26	1,52E+09	8,47E+08	1,95E+09	5,95E+09	1,74E+09		