

Arbejdsrapport fra Miljøstyrelsen

Nr. 49 1993

Miljøstyrelsens 15. mikrobiologiske interkalibrering

**Arbejdsrapport fra Miljøstyrelsen
Nr. 49 1993**

**Miljøstyrelsens
15. mikrobiologiske
interkalibrering**

Miljø- og Levnedsmiddelkontrollenheden,
Odense

Indholdsfortegnelse.

1. Formål med 15. interkalibrering.	1
2. Gennemførelse af 15. interkalibrering.	2
2.1. Generelt.	2
2.2. Koncentraternes kodenumre og indhold.	2
2.3. Testkulturer.	2
2.4. Prøvernes sammensætning.	4
2.5. Homogenitet.	4
3. Resultater.	6
3.1. Ændringer af afleverede eller indtastede resul- tater.	6
3.2. Statistik.	7
3.3. Laboratoriernes bemærkninger til DS 2217 og DS 268.	7
3.4. Laboratoriernes bemærkninger til egne resul- tater.	11
3.5. Generel vurdering.	25
4. Konklusioner.	27
4.1. Totale kimtal efter DS 2217.	27
4.2. Hæmolytiske kolonier efter DS 2217.	28
4.3. Pseudomonas aeruginosa efter DS 268.	29
4.4. DS 2217 og DS 268.	31
5. Referencer.	32
6. Bilagsfortegnelse.	33

1. Formål med 15. interkalibrering.

Analysekvalitet

Formålet med Miljøstyrelsens 15. mikrobiologiske interkalibrering er at vurdere laboratoriernes analysekvalitet i forbindelse med bestemmelse af det totale kimtallet efter "DS 2217. Vandundersøgelse. Bestemmelse af 37°C kimtallet i svømmebassin vand ved membranfiltrering".

Laboratorierne blev anmodet om ved samme lejlighed at bestemme antallet af hæmolytiske bakterier og identificere disse i henhold til DS 2217, ligesom laboratorierne blev bedt om at bestemme antallet af *Pseudomonas aeruginosa* efter "DS 268. Vandundersøgelse. Bestemmelse af *Pseudomonas aeruginosa* i vand ved membranfiltrering".

2. Gennemførelse af 15. interkalibrering.

2.1. Generelt.

Dato for interkalibrering

Miljøstyrelsen meddelte i brev af 23. september 1992 gennemførelsen af 15. mikrobiologiske interkalibrering på simulerede vandprøver i uge 48 i 1992, og der blev tillige givet kodenumre.

Modtagelse af prøvemateriale

Den 02. november 1992 fremsendte Referencelaboratoriet vejledningen, mens prøvematerialet blev afsendt den 23. november 1992 som ekspres og rekommanderet forsendelse til forventet modtagelse på samtlige deltagende laboratorier den 24. november 1992.

Deltagende laboratorier

I interkalibreringen deltog 47 laboratorier, nemlig 38 miljø- og levnedsmiddelkontrolenheder og 9 private laboratorier (bilag 4).

2.2. Koncentraternes kodenumre og indhold.

Prøvemateriale

Prøvematerialet bestod af 4 nedkølede koncentrat, benævnt 1, 2, 3 og 4, der hver indeholdt 5 ml transportmedium tilsat testkulturer. Endvidere medsendtes til temperaturregistrering et rør, der indeholdt fortyndingsvæske og var mærket med rød tape.

2.3. Testkulturer.

3 bakteriearter

Som testkulturer blev der i de identiske koncentrat 1 og 3 anvendt 3 bakteriearter, nemlig *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* og *Bacillus cereus*, mens de identiske koncentrat 2 og 4 indeholdt *Pseudomonas aeruginosa* og *Staphylococcus aureus*.

2.3.1. *Pseudomonas aeruginosa*.

Identifikation

Den anvendte *Pseudomonas aeruginosa*, der er en gram negativ stav, er identificeret under anvendelse af API 20 NE.

Undersøgelse efter DS 268

Den er katalase positiv, oxidase positiv, nedbryder glukose oxidativt i Hugh & Leifsons medium og hydrolyserer kasein i mælkeagar. Bakterien udviser fluorescens i varierende grad, og fluorescensen er tydeligere på cetrimid-nalidixinsyre-agar end på mælkeagar. Pigmenteringen varierer og er gul og grøn på cetrimid-nalidixinsyre-agar og mælkeagar.

Ved to på hinanden følgende membranfiltreringer af samme prøvemængde fra samme prøve veksler forholdet mellem antallet af gule og grønne kolonier på de to filtre. Under anvendelse af Gelman filtre,

prod. 66068, lot 2080208, sterile, GN-6 grid, 0.45 µm, 47 mm varierer kolonistørrelsen ligeledes, idet kolonierne på ceftrimid-nalidixinsyre-agar kan både være små og velafgrænsede og derfor lette at tælle eller store og sammenflydende og dermed vanskelige at tælle. Ved to på hinanden følgende membranfiltreringer af samme prøvemængde fra samme prøve er forholdet mellem antallet af store og små kolonier således forskelligt på de 2 filtre, ligesom forholdet mellem store og små kolonier kan variere uafhængig af antallet af kolonier på filtrene.

*Undersøgelse
efter DS 2217*

På filteret på blodagaren fremtræder kolonierne af den anvendte *P. aeruginosa* ligeledes meget varieret med hensyn til størrelse og form, men især pigmenteringen er forskellig fra koloni til koloni, idet kolonierne kan være grå-, grøn-, rød-, brun- og gulpigmenterede samt have nuancer af disse farver. Der kan optræde en grønfarvning omkring kolonien eller en svag grønlig opklaring af blodet efter 24-48 timer, men fænomenet er inkonstant, idet antallet af kolonier, der viser opklaring eller grønfarvning i løbet af dette tidsrum ved to på hinanden følgende membranfiltreringer af samme mængde fra samme prøve varierer på de to filtre.

Identifikation

2.3.2. Staphylococcus aureus.

Den anvendte *Staphylococcus aureus* er en gram positiv coc, der er identificeret under anvendelse af API Staph.

*Undersøgelse
efter DS 268*

Den er katalase positiv, oxidase negativ, nedbryder glukose fermentativt i Hugh & Leifsons medium, hydrolyserer ikke kasein i mælkeagar og er ikke fluorescerende.

*Undersøgelse
efter DS 2217*

På filteret på blodagaren fremtræder kolonierne små og flade samt beige eller brunlige. Der kan optræde hæmolyse efter 24-48 timer, men dette er inkonstant, og antallet af fremkomne hæmolytiske kolonier på filtrene i løbet af dette tidsrum varierer ved to på hinanden følgende membranfiltreringer af samme mængde fra samme prøve.

Identifikation

2.3.3. Bacillus cereus.

Den anvendte *Bacillus cereus* er en gram positiv stav, der er identificeret under anvendelse af API 50 CHB.

*Undersøgelse
efter DS 268*

Den er katalase positiv, oxidase positiv, nedbryder glukose fermentativt i Hugh & Leifsons medium, hydrolyserer kasein i mælkeagar men er ikke fluorescerende.

Betydning (DS 268)

Da *Bacillus cereus* er i stand til at vokse på ceftrimid-nalidixinsyre-agar, når den er til stede i en vis størrelsesorden, kan den være af differentialdiagnostisk betydning ved identifikation af *Pseudomonas aeruginosa*. Som det ses af ovenstående, er reaktionerne ens for disse 2 bakterier med undtagelse af reaktion i Hugh & Leifsons medium og

evnen til at fluorescere.

*Undersøgelse
efter DS 2217*

På filteret på blodagaren fremtræder kolonierne lysebrune og hammer-
slæde og altid med tydelig hæmolyse efter 24 timer.

2.4. Prøvernes sammensætning.

2.4.1. Fremstilling.

Koncentrat 1 og 3

Koncentraterne 1 og 3 blev fremstillet med henblik på, at der i de færdige prøver 1 og 3 ville være et kimindhold på ca. 200 kim pr. 100 ml ved 37°C på blodagar samt ca. 40 *Pseudomonas aeruginosa* pr. 100 ml på ceftrimid-nalidixinsyre-agar ved 42°C. Prøve 1 og 3 indeholdt således:

ca. 50 *Bacillus cereus* pr. 100 ml,
ca. 60 *Pseudomonas aeruginosa* pr. 100 ml,
ca. 90 *Staphylococcus aureus* pr. 100 ml.

Koncentrat 2 og 4

Koncentraterne 2 og 4 blev fremstillet med henblik på, at der i de færdige prøver 2 og 4 ville være et kimindhold på ca. 2000 kim pr. 100 ml ved 37°C på blodagar samt ca. 400 *Pseudomonas aeruginosa* pr. 100 ml på ceftrimid-nalidixinsyre-agar ved 42°C. Prøve 2 og 4 indeholdt således:

ca. 600 *Pseudomonas aeruginosa* pr. 100 ml,
ca. 1400 *Staphylococcus aureus* pr. 100 ml.

2.4.2. Antal *Pseudomonas aeruginosa*.

CN-agar/blodagar

Forberedelserne til udsendelse af prøverne viste, at *Pseudomonas aeruginosa* er talrigere forekommende på blodagar end på ceftrimid-nalidixinsyre-agar, idet udsæd af samme mængde fra samme prøve på de 2 nævnte substrater gav ca. 25-50 % flere *P. aeruginosa* på blodagar end på ceftrimid-nalidixinsyre-agar, dog afhængig af arten af de øvrige tilsatte testkulturer og disses antal. Forholdet mellem antal *P. aeruginosa* på de 2 substrater manifesterer sig desværre ikke tydeligt ved iagttagelse af homogenitetsresultaterne (bilag 5), idet ikke alle *P. aeruginosa* kolonier, som nævnt i punkt 2.5.2, udviste hæmolyse.

2.5. Homogenitet.

2.5.1. Undersøgelse.

Ad bilag 5

Prøvematerialets homogenitet blev undersøgt, og resultatet af homogenitetsundersøgelsen fremgår af bilag 5. Der blev pr. prøvepar udtaget 10 koncentrat, og udtagningen af disse fordeltes jævnt over hele af-tapningsperioden. Koncentraterne blev opbevaret i termocontainer ved 0-5°C i 24 timer, hvorefter prøverne blev fremstillet som beskrevet i

vejledningen og dernæst undersøgt i henhold til DS 2217 og DS 268. Den statistiske bearbejdning af homogenitetsresultaterne, hvis konklusion fremgår af bilag 2, viser, at der ikke er fundet signifikante standardafvigelser mellem prøverne, vurderet på baggrund af standardafvigelser for repeterbarhed.

2.5.2. Hæmolytiske bakterier.

B. cereus hæmolyse

De anvendte testkulturer er alle til en vis grad hæmolytiske på filteret, men kun *Bacillus cereus* fremkalder en tydelig hæmolyse efter 24 timer. Antallet af *Bacillus cereus* er aflæst på 10 ml filteret, idet dens store hæmolyse gør det meget vanskeligt og dermed unøjagtigt, at aflæse mere end ca. 20 hæmolytiske kolonier af den størrelse på et filter, og tilstedeværelsen af andre hæmolytiske bakterier vanskeliggør yderligere aflæsningen. Det bør dog bemærkes, at et tælleinterval på 0-20 hæmolytiske kolonier naturligvis giver en større statistisk usikkerhed end det normalt anvendte tælleinterval på 20-200 kolonier.

Øvrige hæmolyser

P. aeruginosa og *S. aureus* kan i nogle tilfælde fremkalde hæmolyse efter 24 timers inkubation, mens de i andre tilfælde først fremkalder hæmolyse efter 48 timers inkubation. Hæmolyser udviklet efter 48 timer utydeliggør imidlertid ofte hæmolyser, der er udviklet efter 24 timer. Der er dog ikke altid udviklet hæmolyse efter 48 timer, og evnen til at fremkalde hæmolyse hos disse 2 bakterier er således inkonstant, når de befinder sig på et membranfilter. Efter længere tids inkubation, d.v.s. mere end 48 timer, er hæmolyseformerne uhyre vanskelige at skelne fra hinanden, ligesom det er vanskeligt at afgøre, hvorvidt alle kolonierne udviser hæmolyse. På grund af disse meget vanskelige aflæsningsforhold er hæmolytiske kolonier af *P. aeruginosa* og *S. aureus* i prøve 1 og 3 ligesom *Bacillus cereus* aflæst på 10 ml filteret, mens hæmolytiske kolonier af *P. aeruginosa* og *S. aureus* i prøve 2 og 4 er aflæst på 1 ml filteret. De hæmolytiske kolonier af *P. aeruginosa* og *S. aureus* er således også aflæst under anvendelse af tælleintervallet 0-20 for hver kolonitype. Som følge af ovennævnte forhold kan der ikke opstilles en eksakt referenceværdi (jf. bilag 5) for antallet af hæmolytiske *S. aureus* og hæmolytiske *P. aeruginosa* i prøverne, hverken efter 24 timer, 48 timer eller senere.

3. Resultater.

3.1. Ændringer af afleverede eller indtastede resultater.

Afleveringsdato

Laboratoriernes analyseresultater skulle være Miljøstyrelsen i hænde senest den 04. december 1992.

Rådata til statistik

Udskrift af de modtagne rådata, der skulle bearbejdes statistisk og således anvendes til vurdering af laboratoriernes analysekvalitet, blev fremsendt til laboratorierne den 14. december 1992. Disse rådata fremgår af bilag 1, d.v.s. totale kimtal pr. 100 ml ved 37°C i 24 timer på blodagar.

Øvrige rådata

På grund af den mangelfulde beskrivelse i DS 2217 vedrørende identifikation af hæmolytiske bakterier, og problemer vedrørende aflæsning af fluorescens i DS 268, blev det besluttet, at de øvrige rådata ikke skulle anvendes til statistisk bearbejdning. Udskrift af disse modtagne rådata fremgår af bilag 3, og blev fremsendt til laboratorierne den 28. december 1992. Disse rådata, d.v.s. identifikation og aflæsning af antallet af hæmolytiske bakterier efter DS 2217 og bestemmelse af *Pseudomonas aeruginosa* efter DS 268, den anvendte metodik eller andet, som laboratorierne har benyttet til at opnå disse resultater, *må ikke og kan ikke i nogen henseende anvendes til bedømmelse af laboratorierne.*

Rettelser

De indtastede rådata blev således fremsendt til alle deltagende laboratorier, og det enkelte laboratorium havde på denne måde mulighed for at sikre, at de afsendte resultater var såvel korrekt afleverede som indtastede. Følgende resultater blev ændret af laboratorierne:

Antallet af *Pseudomonas aeruginosa* pr. 100 ml ved 37°C i 24-48 timer på blodagar:

- Lab.nr. 17, prøve 1: 50 blev tilføjet.
- Lab.nr. 17, prøve 2: 700 blev tilføjet.
- Lab.nr. 17, prøve 3: 40 blev tilføjet.
- Lab.nr. 17, prøve 4: 600 blev tilføjet.
- Lab.nr. 23, prøve 3: (Pseud.) blev slettet.
- Lab.nr. 23, prøve 4: (Pseud.) blev slettet.

Antallet af *Pseudomonas aeruginosa* pr. 100 ml ved 42°C i 48 timer på ceftrimid-nalidixinsyre-agar:

- Lab.nr. 22, prøve 1: 3500 blev rettet til 35.
- Lab.nr. 22, prøve 3: 3500 blev rettet til 35.

3.2. Statistik.

3.2.1. Statistisk afvigende resultater.

Totale kimtal

Vandkvalitetsinstituttet foretog herefter den statistiske bearbejdning af resultaterne for totale kimtal pr. 100 ml ved 37°C i 24 timer på blodagar, og konklusionerne fremgår af bilag 2.

3.3. Laboratoriernes bemærkninger til DS 2217 og DS 268.

Kursiv

Af dette afsnit fremgår laboratoriernes bemærkninger til DS 2217 og DS 268. Marginbemærkningerne (kursiv) angiver Referencelaboratoriets oplysninger, der er tilføjet for at anskueliggøre, hvilke emner laboratoriernes bemærkninger omhandler.

Lab.nr. 0.

DS 2217

DS 2217: 6.2. Dyrkningsmedium, der skal anvendes blodagar (BA), men denne sammensætning findes beklageligvis ikke som kommerciel tilgængelig, hverken hos Oxoid, Difco eller Merck.

DS 268

DS 268: Samtlige kolonier var meget udflydende på filtrene, og dette gjorde aflæsningen meget vanskelig.

Hugh & Leifsons viste ikke en overbevisende reaktion (forsøgt 2 gange med reference).

Lab.nr. 1.

DS 2217

DS 2217 mangler anvisning på resultatberegning for tal < 20 og > 100.

Lab.nr. 5.

DS 268

Bemærkninger: Hugh Leifsons Medium.

På alle rørene fra mælkeagarpladerne er de oxidative rør gule på overfladen og har svagt ændret farve langs stikket samt i den øverste del af røret.

På de fermentative rør er der ikke farveændring på overfladen men ganske svag ændring langs med stikket.

Den samme reaktion udviser vores egen stamme af *Pseudomonas aeruginosa*.

Vi har derfor konkluderet at bakterierne var *Pseudomonas*, på trods af den afvigende reaktion.

Lab.nr. 7.

DS 268

Efter dyrkning af subkultur på mælkeagar (24 timer ved 42°+0,5°C) blev petriskålene sat i køleskab (2 døgn 5°C) for senere aflæsning af fluorescens. Det viste sig at være meget svært med sikkerhed at afgøre, om der var fluorescens.

Ved fluorescensundersøgelse på mælkeagar petriskåle taget direkte fra

42°C var der ikke dette problem. Det bør nævnes i forskrift, at fluorescens kan nedsættes/forsvinde efter opbevaring i køleskab, og at aflæsning derfor bør ske på petriskåle taget direkte fra 42°C.

Lab.nr. 8.

DS 2217

DS 2217:

- 1) Undersøgelse for hæmolytiske bakterier bør beskrives nærmere.
- 2) Fortyndingsvæske: Nærmere forskrift om hvordan pH kan blive 7,0.
- 3) Altid inkubation i 48 timer.
- 4) Udregning: Mangler beskrivelse af visse tilfælde.

DS 268

DS 268:

- 1) Fortyndingsvæske: Se ovenfor.
- 2) Aflæsning af Cefrimid-nalidixinsyre-agar: Ved tælling bør man om muligt skelne kolonimorfologisk. Max. antal kolonier pr. filter skal angives.
- 3) Nærmere beskrivelse af fluorescensen mangler.

Lab.nr. 11.

DS 268

Vedr. DS 268: Adskillelse mellem aeruginosa og cepacia biotype C har i hvert fald ved interkalibreringen været vanskelig, da fluorescens har været svag og atypisk, men dog erkendelig for nogle af de udvalgte kolonier. Kriteriet forekommer usikkert. (Til "daglig" er der set bedre overensstemmelse mellem prøve og referencestamme).

Lab.nr. 12.

DS 2217

1. Vedr. aflæsning i henhold til anvisningen for DS 2217.

Som det fremgår af medsendte resultatskema for prøve nr. 4 kunne der ikke konstateres vækst af hæmolytiske kolonier efter 24 timer, jfr. DS 2217 punkt 4: definition.

Laboratoriet ville ved en normal prøve herefter have registreret resultatet og afsluttet undersøgelsen, da der ikke kunne konstateres "små og usikre hæmolyseformer", jfr. DS 2217 pkt 8.2: behandling - sidste afsnit.

Petriskålene blev dog fortsat inkuberet i ca. 48 timer; efter ca. 24 timer konstateredes en begyndende β -(?)toksinpåvirkning af substratet, og efter yderligere 24 timer (d.v.s. efter i alt 72 timers inkubation) en begyndende hæmolyse.

Ved isolation konstateredes, at der formentlig var tale om *Staphylococcus*-species, dog sandsynligvis ikke *S. aureus*.

Yderligere identifikation blev ikke foretaget, da det dels blev skønnet, at de isolerede bakterier ikke opfyldte kriterierne, som er beskrevet i DS 2217, og dels ville have beslaglagt personale i et omfang, som der grundet deltagelse i Miljøstyrelsens samtidig forløbende metodeafprøving ikke var til rådighed.

Rådata blev dog registreret på laboratoriet og vil kunne stilles til disposition, såfremt dette ønskes.

Såfremt "ingen hæmolyse" - efter 24 timer - skal sidestilles med "små

og usikre hæmolyseformer" bør dette præciseres ved en fremtidig revision af DS 2217.

DS 268

2. Vedr. anvendelsen af DS 268:

Laboratoriet skal fortsat udtrykke en mild forbavselse over den påbudte anvendelse af mælkeagar (jfr. DS 268, pkt. 6.3.1); substratet er ikke særligt hensigtsmæssigt, da der sker en dårlig udvikling af fluorescens og pigmenter.

DS 268 bør revideres på dette punkt.

Lab.nr. 16.

DS 2217

I DS 2217 står der under aflæsning og identifikation, at der skal regnes med filtre med < 100 kolonier, hvilket vi har gjort ved interkalibreringen. Vi anser det dog for mere sikkert at tælle op til 200 kolonier på et filter afhængig af kolonitæthed til kimtal og så tælle hæmolytiske bakterier på et filter med max. 100 bakterier.

Lab.nr. 17.

Danske Standarder

Indledende skal det anbefales, at DS's metoder samt andre metoder foreskrevet af Miljøstyrelsen gennemgås kritisk med henblik på konsekvens i metodernes angivelser, herunder udregning og angivelse af resultater.

DS 2217/DS 268

Fx. synes det ikke logisk, at der i en metode som DS 2217, hvor der anbefales spring i udsæd på faktor 10, angives aflæsning i et interval, hvor forskellen i ydergrænse er faktor-5 (20-100)!

Da der med hensyn til udregning og angivelse af resultater i vejledningen til interkalibreringen er henvist til:

- Orientering fra Miljøstyrelsen, nr. 7, 1986, der vedrører pladespredning (dybde- eller overfladeudsæd),
- DS 2217, jfr. førnævnte problematik,
- DS 268, der ikke angiver grænser for acceptable kolonital pr. membranfilter,

har laboratoriet baseret sine resultatangivelser på en faglig vurdering af de enkelte prøvers "udseende" på membranfiltrene.

Det er velkendt, at beregning af kimtal på basis af et lille kolonital er behæftet med relativ stor usikkerhed.

Til gengæld fandt vi, at en øvre grænse på 100 (som anbefalet i DS 2217) var for lav, idet der ved kolonital i området 100-200 stadig var tale om distinkte, lettællelige kolonier på membranfiltrene.

Lab.nr. 24.

DS 2217/DS 268

At skulle angive et kvantitativt resultat ved hjælp af en vilkårlig opprikning virker forkert. For *Pseudomonas*' vedkommende, hvor der ikke er støtte at finde altid i kolonimorfologien, og hvor indholdet måske er så lavt, at forekomsten kan være skjult ved iøvrigt højt kimtal, er der tvivl om, at undersøgelsens udførelse er god nok.

Den forsinkede fremkomst af hæmolyse fra *Staphylokokkerne* "snød" laboranten i aflæsningen. Det var først under isolationsforsøg, at den

uklare hæmolyse blev synlig.
Se også bemærkningerne til de enkelte prøver.

Lab.nr. 25.

DS 2217

DS 2217: 24 timers inkubering er utilstrækkelig til at foretage en pålidelig kimtælling.

DS 268

DS 268: Mælkeagar synes uegnet til vurdering af fluorescens og pigment.

Lab.nr. 26.

DS 268

DS 268 Pseudomonas: Fluorescens på mælkeagar fremkommer ikke tydeligt efter kun 24 timer.

Lab.nr. 27.

DS 268

Der er lavet API-test på 4 repræsentative kolonier. Efter disse er alle 4 kolonier Pseudomonas aeruginosa. Der er ikke fundet nogen rigtig fluorescerende kolonier.

Lab.nr. 31.

DS 2217

Laboratoriet foretager normalt ikke identifikation af hæmolytiske bakterier, men sender disse til videre identifikation. Hvorfor vi ikke har kunnet afsætte ressourcer til denne del af interkalibreringen.

Lab.nr. 33.

DS 2217

DS 2217: Det er generelt meget svært at aflæse hæmolysen på Staphylococcus efter 24 timer, da hæmolysen er meget svag. Men efter 48 timer har Staphylococcus en fin delvis opklaret hæmolyse. Her kan aflæsningen dog vanskeliggøres af anden vækst, især hvis der er andre hæmolytiske bakterier tilstede samtidig. Af hensyn til standardisering kunne det i DS 2217 angives som eksempel hvilke tests der skal udføres ved forekomst af forskellige hæmolytiske bakterier.

Lab.nr. 36.

DS 2217

1. Aflæsning af evt. hæmolytiske bakterier bør ske efter 1 døgn og 2-3 døgn's inkubering.

DS 268

2. Mælkeagar er måske ikke så velegnet til aflæsning af evt. farve og fluorescens. Evt. andet substrat kan anvendes til disse aflæsninger f. eks. ved overfladeudsæd på Kings B.

Lab.nr. 37.

DS 268

DS 268: Der har ikke været entydige resultater mht. fluorescens og pigmentering ved udstrykning på mælkeagar og inkubation ved 42°C i 1 døgn. Den konstaterede pigmentering fremkom først efter henstand ved stuetemperatur.

DS 2217

DS 2217: Flere af hæmolytterne kunne slet ikke ses efter 1 døgn. De blev først tydelige og lette at skelne fra hinanden senere. Visse har endda henstået ved stuetemp. efter 2 døgn ved 37°C.

- Lab.nr. 42.**
DS 2217 Kommentar til DS 2217: Antallet af hæmolytiske bakterier er vanskeligt at tælle på filteret, hvis der er flere kolonityper i en prøve, og specielt hvis flere hæmolyseformer fremkommer. Efter 48 timer var det yderst vanskeligt at sammenholde koloni og hæmolyse, og efter 24 timer er mange hæmolyseformer ikke fremtrædende nok til at en aflæsning kan foretages.
- DS 268* Kommentar til DS 268: Kriteriet fluorescens virker ikke brugbart og er meget subjektivt. *Pseudomonas aeruginosa* kan tilsyneladende variere betydeligt med hensyn til fluorescens og pigmentering.
- Lab.nr. 44.**
DS 2217 Afvigelse fra D.S.
 Vi blander henholdsvis 10 ml og 1 ml prøve med 100 ml buffer i en sovirelflaske. Efter grundig blanding filtreres prøverne.
 Alle vore substrater autoklaveres ved 110°C i 20 minutter.
- DS 268* Vedrørende: *Pseudomonas aeruginosa*.
 Ikke skarp fluorescens ved prøverne, som ved vores kontrol.
- Lab.nr. 45.**
DS 2217 Kommentarer til DS 2217: Under filtreringen suges der så lidt luft igennem som muligt.
 Til blodagaren anvendes 5 cm petriskåle med 5 ml substrat.
 Hæmolyserende kolonier over 50 kan ikke aflæses. Hæmolyserende kolonier aflæses altid efter 2 døgn og ses på efter 1 døgn.
 Vi synes at intervallet for aflæsning af totale kim, burde være > 20 til < 200, da det er muligt at aflæse i området 100-200.
- DS 268* Kommentarer til DS 268:
 Det bemærkes, at der i standarden ikke er oplyst, indenfor hvilket interval pladerne skal tælles.
 I standarden er der oplyst, at antallet af *Ps. aeruginosa* skal udregnes som %. I stedet for burde der stå, at antallet udregnes som et forholdstal.
- Lab.nr. 48.**
DS 2217 DS 2217: De *Staph. aureus*, der er påvist, har først vist toxinzoner efter 48 timer. Der bør derfor stå i forskriften, at alle plader inkuberes yderligere 24 timer.

3.4. Laboratoriernes bemærkninger til egne resultater.

Kursiv

Af dette afsnit fremgår laboratoriernes bemærkninger til egne resultater. Kursivskriften angiver Referencelaboratoriets oplysninger, der er tilføjet for at anskueliggøre, hvilke prøver, parametre etc. laboratoriernes bemærkninger omhandler.

Lab.nr. 0.

Pseudomonas aeruginosa

- Prøve 2 Da der ikke i DS 268 står, hvad der normalt mindst og højst kan tælles mellem har vi valgt > 150 kolonier som øvre grænse.
- Prøve 4 Totalt umuligt at aflæse på filter med 100 ml.

Lab.nr. 1.

Totale kimtal ved 37°C

- Prøve 1 Resultatet er beregnet som eks. A i DS 2217 (idet kolonitallene ligger uden for intervallet 20 - 100).
- Prøve 2 Resultatet er beregnet som eks. A i DS 2217 (idet kolonitallene ligger uden for intervallet 20 - 100).
- Prøve 3 Resultatet er beregnet som eks. A i DS 2217 (idet kolonitallene ligger uden for intervallet 20 - 100).
- Prøve 4 Anvendes samme beregningsmåde som ved prøverne 1 - 3 fås resultatet $1200 \left(\frac{(21 + 115) \times 100}{11} \right)$

Lab.nr. 2.

Totale kimtal ved 37°C

- Prøve 1 Laboratoriet havde fået leveret blod som ved dyrkningen viste sig at være inficeret med en renkultur af ikke-hæmolytisk bakterie. Det medsendte Totale kimtal kan derfor ikke indgå i interkalibreringen. Dette gælder for alle de fire tilsendte prøver.
- Prøve 2 Se prøve 1
- Prøve 3 Se prøve 1
- Prøve 4 Se prøve 1

Pseudomonas aeruginosa

- Prøve 1 Fluorescens + = grønlig farve lysende
% = blålig farve ikke-lysende.
- Prøve 2 Fluorescens + = grønlig farve lysende
% = blålig farve ikke-lysende.
- Det usandsynlige resultat efter filtrering af 100 ml prøve (0 kolonier) udløste, at der den 30/11 blev foretaget filtrering igen. Resultatet her blev:
100 ml - 0 kolonier 10 ml - 23 kolonier 1 ml - 0 kolonier.
- Prøve 3 Fluorescens + = grønlig farve lysende
% = blålig farve ikke-lysende.
- Prøve 4 Fluorescens + = grønlig farve lysende
% = blålig farve ikke-lysende
(100 ml prøve = 0 kolonier) Se kommentar til prøve 2. Ved filtrering 30/11 konstateredes
100 ml - 0 kolonier 10 ml - 15 kolonier 1 ml - 0 kolonier.

Lab.nr. 3.*Totale kimtal ved 37°C*

Prøve 1

Kontrolplade viste 0 kim.

 χ^2 -test viser der er overensstemmelse mellem 21 og 144 (*antal kolonier på henholdsvis 10 ml og 100 ml filter*).

Prøve 2

Kontrolplade viste 0 kim.

 χ^2 -test viser der er overensstemmelse mellem 21 og 172 (*antal kolonier på henholdsvis 1 ml og 10 ml filter*).

Prøve 3

Kontrolplade viste 0 kim.

Prøve 4

Kontrolplade viste 0 kim.

Lab.nr. 4.*Hæmolytiske kolonier ved 37°C*

Prøve 1

Kol. 7, 8 og 9 (*P. aeruginosa*) undersøgt for fluorescens og pigmentering:

Resultat:	Kol. nr.	Fluorescens	Pigment
	7	+	+
	8	+	+
	9	+	+

Prøve 3

Koloni 7 og 8 (*P. aeruginosa*) undersøgt for fluorescens og pigmentering:

Resultat:	Kol. nr.	Fluorescens	Pigment
	7	+	+
	8	+	+

Lab.nr. 6.*Pseudomonas aeruginosa*

Prøve 1

Mælkeagaren er inkuberet ved 30°C på grund af manglende vækst ved 42°C.

Prøve 2

Mælkeagaren er inkuberet ved 30°C på grund af manglende vækst ved 42°C.

Prøve 3

Mælkeagaren er inkuberet ved 30°C på grund af manglende vækst ved 42°C.

Lab.nr. 7.*Hæmolytiske kolonier ved 37°C*

Prøve 2

Ved forskriftsmæssig aflæsning efter 24+2 timer ved 37°+0,5°C observeredes ingen tegn på hæmolyse. Efter endnu 24+2 timer fremkom der stadig ingen hæmolyse. Fra cetrimid-nalidixinsyre agar blev der på mælkeagar påvist *Pseudomonas*. Derfor kontrolleredes blodagarpladerne, der på det tidspunkt havde stået flere dage i køleskab, og der var fremkommet hæmolysezone omkring nogle af kolonierne.

Prøve 4

Ved forskriftsmæssig aflæsning efter 24+2 timer ved 37°+0,5°C observeredes ingen tegn på hæmolyse. Efter endnu 24+2 timer fremkom der stadig ingen hæmolyse. Fra cetrimid-nalidixinsyre agar blev der på mælkeagar påvist *Pseudomonas*. Derfor kontrolleredes blodagarpladerne, der på det tidspunkt havde stået flere dage i køleskab, og der

var fremkommet hæmolysezone omkring nogle af kolonierne.

Pseudomonas aeruginosa

Prøve 1

Ved undersøgelse for fluorescens, hvor pladerne efter inkubering ved 42°C var opbevaret 2 døgn ved 5°C i køleskab, var det vanskeligt med sikkerhed at afgøre, om der var fluorescens. Der foretoges derfor udstrykning igen på mælkeagar, og pladerne blev uden problemer undersøgt for fluorescens efter inkubation ved 42°C.

Lab.nr. 8.

Totale kimtal ved 37°C

Prøve 1

Udregningen er ikke omtalt under punkt 10 i DS 2217. 10 ml-pladen er anvendt til identifikation af hæmolytiske kim.

Hæmolytiske kolonier ved 37°C

Prøve 1

Pladerne inkuberet i 24 timer.

Prøve 2

Pladerne inkuberet i 24 timer.

Prøve 3

Pladerne inkuberet i 24 timer. Ved rendyrkning af staphylokokkerne på blodagarplader skete også fremvækst af pseudomonasbakterier på flere af pladerne.

Prøve 4

Pladerne inkuberet i 24 timer.

Pseudomonas aeruginosa

Prøve 1

Fluorescens-kriteriet meget usikkert. Fluorescens er udviklet senere end 2 dages inkubation.

Prøve 2

Bemærkning vedr. Fluorescens: Se prøve 1.

Prøve 3

Se prøve 1.

Prøve 4

Se prøve 1.

Lab.nr. 10B.

Hæmolytiske kolonier ved 37°C

Prøve 1

Hæmolyse efter 1 døgn var udelukkende *B. cereus*. Hæmolyse af andre bakterier sås først efter 2 dage.

Prøve 2

Hæmolyse først efter 2 døgn.

Prøve 3

Hæmolyse efter 1 døgn var udelukkende *B. cereus*. Hæmolyse af andre bakterier sås først efter 2 dage.

Prøve 4

Hæmolyse først efter 2 døgn.

Pseudomonas aeruginosa

Prøve 1

Pigmentering fremkom hos nogle først efter 2 døgn. Reaktion i Hugh og Leifson kom hos nogle først efter 3 døgn.

Prøve 2

Pigmentering fremkom hos nogle først efter 2 døgn. Reaktion i Hugh og Leifson kom hos nogle først efter 3 døgn.

Prøve 3

Pigmentering fremkom hos nogle først efter 2 døgn. Reaktion i Hugh og Leifson kom hos nogle først efter 3 døgn.

Prøve 4

Pigmentering fremkom hos nogle først efter 2 døgn. Reaktion i Hugh og Leifson kom hos nogle først efter 3 døgn.

Lab.nr. 11.*Hæmolytiske kolonier ved 37°C*

Prøve 1 Diagnosen *Ps. aeruginosa* skal ses i sammenhæng med resultaterne ved dyrkningen på CN-agar. De gr+ stave var i øvrigt svagt rødt pigmenterede på blodagar, modsat på mælkeagar og CN-agar, hvor kolonierne var farveløse. (Bemærkningen gælder alle 4 prøver). *Staf. aureus* gav kun meget svag "hæmolyse" efter 1 døgn, men tilsyneladende bliver hæmolysen helt klar og skarprandet efter nogle få timers ekstra opbevaring i køleskab, hvilket er prøvet ved rendyrkningen.

Prøve 3

Pseudomonas aeruginosa

Prøve 1 Differentiering mellem *Ps. aeruginosa* og *Ps. cepacia* er usikker, da fluorescens er utydelig, og pigmentering mangler. (Bemærkningen gælder alle 4 prøver).

Prøve 3

(som 1).

Lab.nr. 13.*Totale kimaltal ved 37°C*

Prøve 1 Desuden undersøgt for Coliforme ved 37°C: < 1 pr. 100 ml.

Prøve 2 Desuden undersøgt for Coliforme ved 37°C: < 1 pr. 100 ml.

Prøve 3 Desuden undersøgt for Coliforme ved 37°C: < 1 pr. 100 ml.

Prøve 4 Desuden undersøgt for Coliforme ved 37°C: < 1 pr. 100 ml.

Lab.nr. 15.*Hæmolytiske kolonier ved 37°C*

Prøve 1 Samtlige isolater er indledningsvis undersøgt ved mikroskopi (fasekontrast mikroskopi x 400).

Prøve 2 Samtlige isolater er indledningsvis undersøgt ved mikroskopi (fasekontrast mikroskop x 400).

Prøve 3 Samtlige isolater er indledningsvis undersøgt ved mikroskopi (fasekontrast mikroskop x 400).

Prøve 4 Samtlige isolater er indledningsvis undersøgt ved mikroskopi (fasekontrast mikroskop x 400).

Pseudomonas aeruginosa

Prøve 1 Vi er opmærksomme på forskellen i fund af *P. aeruginosa* ved de to metoder.

Lab.nr. 16.*Pseudomonas aeruginosa*

Prøve 1 Ved differential-tælling er der talt ialt 27 kolonier i 100 ml. Ved verifikationen faldt type B og C negativt ud (*henholdsvis ved OF-test og fluorescenstest*), hvorfor de er udeladt ved beregningen.

Prøve 2 Ved differentialtælling er der talt ialt 41 kolonier i 10 ml. Ved verifikationen faldt type C negativt ud (*ved fluorescenstest*), hvorfor de er udeladt ved beregningen.

Prøve 3 Ved differentieltælling er der talt ialt 31 kolonier i 100 ml. Ved verifikation er faldt type A og C negativt ud (ved fluorescenstest), hvorfor de er udeladt ved beregningen.

Prøve 4 Der er ved differentieltælling talt ialt 46 kolonier i 10 ml. Ved verifikation er faldt type C negativt ud, (ved fluorescenstest), hvorfor de er udeladt ved beregningen.

Lab.nr. 18.

Hæmolytiske kolonier ved 37°C

Prøve 1 Koloni art 1: 8

Koloni art 2: 2

Koloni art 3: 2

Prøve 2 Koloni art 1: 2

Koloni art 2: 6

Koloni art 3: 10

Prøve 3 Koloni nr. 7, 9 og 10 undersøgt på Api 20 E (*P. aeruginosa*)

Koloni art 1: 4

Koloni art 2: 3

Koloni art 3: 3

Prøve 4 Koloni art 1: 13

Koloni art 2: 3

Koloni art 3: 3

Lab.nr. 20A.

Hæmolytiske kolonier ved 37°C

Prøve 1 Koloni nr. 3 angives som *Ps. aeruginosa*, idet 42°C vækst er vist ved dyrkning på mælkeagar og CNA af det andet filter.

Prøve 2 Som til prøve 1.

Prøve 3 Som prøve 1.

Prøve 4 Som prøve 1.

Lab.nr. 20B.

Totale kimtal ved 37°C

Prøve 1 Udregning jvf. vejledning fra Miljøstyrelsen nr. 3 1988.

Prøve 3 Udregning jvf. vejledning fra Miljøstyrelsen nr. 3 1988.

Lab.nr. 24.

Hæmolytiske kolonier ved 37°C

Prøve 1 På 1. og 2. dagen var der kun tydelig hæmolyse omkring *B. cereus*-kolonierne. Fra sidst på 2. dagen var der desuden hæmolyse om *Pseudomonas*-bakterierne. Denne hæmolytiske evne bibeholdt de, tilmed efter 1 døgn inkubation, hvilket blev konstateret ved gentagne dyrkninger. Der er foretaget flere identifikationsanalyser end nævnt i skemaet (det dobbelte) P.g.a. tydelig forskel i kolonimorfologien og på hæmolysetidspunktet, blev der foretaget en differentieret optælling. Den repræsentative fordeling fremgår derfor af øverste tabel (100 ml filter med 76 *coccer* og 28 *stave*). Skemaet er ikke søgt tilrettet.

Prøve 2

ad *Pseudomonas*-bakterier: samme som til prøve 1

Staph. aureus: 1) udviste kun uklar, stor hæmolyse, først tydelig efter 2. dag.

2) opklaret zone manglede på Baird-Parker-agar

3) koagulasereaktionen var positiv < 4 timer

P.g.a. de langsomme hæmolysereaktioner, var der sket nogen sammen-
voksning af kolonier.

Fordelingen fremgår af øverste tabel (10 ml filter med 50 coccer og 38
stave) og ikke af nederste alene.

Der er foretaget flere identifikationer end nævnt i skemaet.

Der kan evt. være tale om at Staph. aureus = Staph. epidermidis
(yderligere ident. nødvendig).

Prøve 3

Som til prøve 1 (100 ml filter med 80 store stave + 30).

Prøve 4

Som til prøve 2 (100 ml filter med 50 coccer + = 90).

Pseudomonas aeruginosa

Prøve 1

Pigmentdannelsen var sent indtrædende. Der var tilsyneladende flere
kolonier med grønt pigment på CN-agar end på mælkeagar. Iøvrigt var
fluorescensvirkningen på CN-agar kraftigere end på mælkeagar.

Forklaring til fluorescensrækken: + for blå fluorescens (6 kolonier)
- for grønfarvning (mørk og lys) (4 kolonier), da styrke og skarpheden
ikke var stor.

Prøve 2

Som til prøve 1 (6 blå fluorescerende kolonier, 3 grønfarvede kolo-
nier, 1 blandet).

Prøve 3

bem. som til prøve 1 (5 blå fluorescerende kolonier, 5 grønfarvede
kolonier).

Prøve 4

Som til prøve 2 (7 blå fluorescerende kolonier, 3 grønfarvede kolo-
nier).

Lab.nr. 25.

Hæmolytiske kolonier ved 37°C

Prøve 1

Efter 48 timers inkubering observeredes yderligere nogle kolonier med
en utydelig hæmolysezone. Eftersom disse bakterier ikke udviklede
hæmolyse på 24 timer, blev de ikke kvantiteret. Bakterierne blev
slægtsbestemt til *Pseudomonas* spp.

Prøve 4

Efter 24 timers inkubering observeredes dels kolonier med en utydelig
hæmolysezone, dels kolonier med en ufuldstændig hæmolyse. Eftersom
disse bakterier ikke udviklede hæmolyse på 24 timer, blev de ikke
kvantiteret. Bakterierne med den ufuldstændige hæmolyse blev slægts-
bestemt til *Staphylococcus* spp. (betatoxisk). Bakterierne med den
svage og utydelige hæmolyse blev slægtsbestemt til *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas aeruginosa

Prøve 1

Fluorescens og pigment var kun ufuldstændigt udviklet. Fremkomst af
pigment blev derfor bedømt på CN-agar, og udvikling af fluoresce-
rende farvestoffer blev vurderet på Kings agar B.

Prøve 2

Fluorescens og pigment var kun ufuldstændigt udviklet. Fremkomst af

Prøve 3

pigment blev derfor bedømt på CN-agar, og udvikling af fluorescerende farvestoffer blev vurderet på Kings agar B.

Fluorescens og pigment var kun ufuldstændigt udviklet. Fremkomst af pigment blev derfor bedømt på CN-agar, og udvikling af fluorescerende farvestoffer blev vurderet på Kings agar B.

Lab.nr. 26.

Hæmolytiske kolonier ved 37°C

Prøve 3

Type C (*P. aeruginosa*) kunne ikke skelnes fra øvrige hæmolytiske bakterier på 100 ml filteret.

Pseudomonas aeruginosa

Prøve 1

Der synes at være tale om to forskellige *Ps. aeruginosa*-stammer med forskellig farve fluorescens (hhv. blålig og gulgrøn). De blåligt fluorescerende svarer stort set til de grønpigmenterede på blodagar og de kraftigt gulgrønfluorescerende svarer til kolonier med rødligt pigment på blodagar.

Prøve 2

Som prøve 1.

Prøve 3

Som prøve 1.

Prøve 4

Som prøve 1.

Lab.nr. 27.

Pseudomonas aeruginosa

Prøve 1

Fluorescens: Der findes ingen kraftigt lysende kolonier (+) (2 kolonier) er grønne under UV-lys (-) (8 kolonier) er blå lysende.

Pigmentering: Kolonier betegnet (+) er gule (2 kolonier). Øvrige kolonier er grønne (8 kolonier).

Prøve 2

Se prøve 1 (Fluorescens: 3 grønne kolonier, 7 blå lysende. Pigment: 5 gule kolonier, 5 grønne kolonier).

Prøve 3

Se prøve 1 (Fluorescens: 3 grønne kolonier, 7 kolonier blå lysende. Pigment: 3 gule kolonier, 7 grønne kolonier).

Prøve 4

Se prøve 1 (Fluorescens: 1 grøn koloni, 9 blå lysende. Pigment: 1 gul koloni og 9 grønne kolonier).

Lab.nr. 28.

Pseudomonas aeruginosa

Prøve 1

Koloni 1,3,4,7 og 9 er undersøgt for gramfarvning (angivet under OF-test) (*grampositiv*). Fluorescens og pigmentering er ikke tydelig efter 1 døgn ved 37°C, men efter 3 døgn yderligere ved stuetemperatur er aflæsning let.

Prøve 2

Fluorescens og pigmentering er ikke tydelig efter 1 døgn ved 37°C, men efter 3 døgn yderligere ved stuetemperatur er aflæsning let.

Prøve 3

Koloni 8 er undersøgt for gramfarvning (angivet under OF-test) (*grampositiv*). Fluorescens og pigmentering er ikke tydelig efter 1 døgn ved 37°C, men efter 3 døgn yderligere ved stuetemperatur er aflæsning let.

Prøve 4

Fluorescens og pigmentering er ikke tydelig efter 1 døgn ved 37°C, men efter 3 døgn yderligere ved stuetemperatur er aflæsning let.

Lab.nr. 30.*Totale kimtal ved 37°C*

Prøve 1

Fordelingen af kimtallet falder uden for de i DS 2217 angivne eksempler. Det er uklart, om 10 ml eller 100 ml bruges. - vi har valgt 10 ml.

Hæmolytiske kolonier ved 37°C

Prøve 1

Isolering og identifikation ud fra 10 ml filter.

Prøve 2

Fluorescens på mælkeagar meget svag (koloni 4 og 5) (*P. aeruginosa*)

Prøve 3

Isolering og identifikation ud fra 1 ml filter.

Fluorescens på mælkeagar meget svag (koloni 1-2-3) (*P. aeruginosa*)

Prøve 4

Isolering og identifikation ud fra 10 ml filtre.

Fluorescens på mælkeagar meget svag. (*P. aeruginosa*)

Isolering og identifikation ud fra 1 ml filtre.

Fluorescens på mælkeagar meget svag (*P. aeruginosa*)

Pseudomonas aeruginosa

Prøve 1

Fluorescens på mælkeagar i flere tilfælde meget svag.

Prøve 2

Fluorescens på mælkeagar i flere tilfælde meget svag.

Prøve 3

Fluorescens på mælkeagar i flere tilfælde meget svag.

Fluorescens på mælkeagar i flere tilfælde meget svag.

Lab.nr. 34.*Totale kimtal ved 37°C*

Prøve 1

Umuligt at tælle nøjagtigt (*Antal kolonier på 100 ml filter*)

Hæmolytiske kolonier ved 37°C

Prøve 1

Bac. cereus Agar. Merck 5267 (*til lecithinasereaktionen*).

På 10 ml filtret var der: 6 Bacillus kolonier + 8 Staph. kolonier. Der er iagttaget både Alfa og Betahæmolyse v/de fleste Staph. kolonier, enkelte kun Betahæmolyse.

Prøve 3

Bac. Cereus agar. Merck 5267 (*til lecithinasereaktionen*).

På 10 ml filtret var der: 5 Bac. kolonier + 6 Staph. kolonier.

Pseudomonas aeruginosa

Prøve 2

30 kolonier grønlig pigment.

17 " brunlig pigment. (*antal kolonier på 10 ml filter*)

Lab.nr. 35.*Totale kimtal ved 37°C*

Prøve 1

Udregning af kimtal og hæmolytiske bakt. Pkt. 10A i DS 2217: "Antallet af kolonier divideret med den totale udsædsmængde x 100". Dette tolker vi som alle læselige kolonier og den tilsvarende udsædsmængde.

Hæmolytiske kolonier ved 37°C

Prøve 2

Hæmolytiske kolonier opgives samlet. Blandt disse er der påvist flere arter uden at talforholdet mellem dem er regnet ud.

Prøve 3

Se side 19. (*prøve 2*)

Prøve 4 Se side 19. (prøve 2)

Prøve 1 *Pseudomonas aeruginosa*
Fluorescensen er aflæst på KAB efter 24 t. i 30°C. Bølgelængden er 254 nm (KEBO UVG-54). Vi finder aflæsningen på mælkeagar vanskelig.

Lab.nr. 36.

Totale kimtal ved 37°C

Prøve 1 Det foreslås at man overvejer at aflæse på filtre med kolonital ≥ 10 og ≤ 100 .

Prøve 2 Se prøve nr. 1.

Prøve 3 Se skema 1.

Prøve 4 Se skema 1.

Hæmolytiske kolonier ved 37°C

Prøve 1 Det var kun *B. cereus* som var tydeligt hæmolytisk efter 24 t. Metoden bør derfor ændres så der sker aflæsning efter 1-3 døgn!. ? = ikke aflæselig (38+? på 100 ml filter). "tal" er aflæst efter 2-3 døgn (3+ "6" = 9 på 10 ml filter).

Prøve 2 Se prøve nr. 1. ? (100 ml filter) = kan ikke aflæses.

Prøve 3 "Tal" ("6" + 6 på 10 ml filter) er aflæst efter 2-3 døgn i inkubering".

Prøve 4 "Tal" (20 på 1 ml filter) aflæsningen er foretaget efter 2-3 døgn, idet β -hæmolysen ikke var tydelig efter 1 døgn. ? (100 ml filter og 10 ml filter) = ikke aflæselig.

Pseudomonas aeruginosa

Prøve 1 Fluorescens ikke tydelig på mælkeagar. Dette samme gælder pigmenteringen. Mælkeagar derfor næppe velegnet! Antal Ps. derfor underestimeret.

Prøve 2 Se skema prøve 1.

Prøve 3 Se prøve 1.

Lab.nr. 37.

Hæmolytiske kolonier ved 37°C

Prøve 1 Der var ikke plads i skemaet, men det er underforstået, at kolonimorfologi og hæmolyseform indgår som kriterier.

Prøve 2 Der var ikke plads i skemaet, men det forudsættes, at også kolonimorfologi og hæmolyseform indgår som kriterier.

Prøve 3 Der var ikke plads i skemaet, men det er underforstået, at kolonimorfologi og hæmolyseform indgår som kriterier.

Prøve 4 Der var ikke plads i skemaet, men det er underforstået, at kolonimorfologi og hæmolyseform indgår som kriterier.

Pseudomonas aeruginosa

Prøve 1 Fluorescens manglede. Positiv kontrolstamme havde derimod fin fluorescens. Afsluttende identifikation udført med API 20E.

- Prøve 2 Fluorescens manglede. Positiv kontrolstamme havde derimod fin fluorescens. Videre identifikation udført med API 20E.
- Prøve 3 Fluorescens manglede. Positiv kontrolstamme havde fin fluorescens. Videre identifikation udført med API 20E.
- Prøve 4 Fluorescens manglede. Positiv kontrolstamme havde fin fluorescens. Videre identifikation foretaget med API 20E.

Lab.nr. 38.

Hæmolytiske kolonier ved 37°C

- Prøve 1 Ang. hæmolytiske bakterier: Øverste tal: Hæmolyse 1. dag (65 på 100 ml filter). Nederste tal: Beta hæmolyse 2. dag (40 på 100 ml filter).
- Prøve 2 Ang. hæmolytiske bakterier: Øverste tal: Hæmolyse 1. dag (0 på 10 ml filter). Nederste tal: Beta-hæmolyse 2. dag (180 på 10 ml filter). Beta-hæmolyse: 10 tilfældige kolonier testet (*S. aureus*).
- Prøve 3 Ang. hæmolytiske bakterier: Øverste tal: Hæmolyse 1. dag (41 på 100 ml filter). Nederste tal: Beta hæmolyse 2. dag (50 på 100 ml filter).
- Prøve 4 Ang. hæmolytiske bakterier: Øverste tal: Hæmolyse 1. dag (0 på 10 ml filter). Nederste tal: B-hæmolyse 2. dag (25 på 10 ml filter).

Lab.nr. 39.

Hæmolytiske kolonier ved 37°C

- Prøve 1 Der er aflæst 56 *Bacillus cereus* og 53 *Staf. aureus* (på 100 ml filter).
- Prøve 3 Der er aflæst 50 *Bacillus*arter og 46 *Staf. aureus* (på 100 ml filter).

Pseudomonas aeruginosa

- Prøve 1 Der er ikke taget hensyn til den manglende pigmentering af koloni 6 og 8, jfr. DS 268.
- Prøve 2 Der er ikke taget hensyn til den manglende pigmentering i koloni 6, 7 og 8, jfr. DS 268.
- Prøve 3 Der er ikke taget hensyn til manglende pigmentering af koloni 6, 7, 8, 9 og 10, jfr. DS 268.
- Prøve 4 Der er ikke taget hensyn til manglende pigmentering af koloni 7, 9 og 10, jfr. DS 268.

Lab.nr. 40.

Pseudomonas aeruginosa

- Prøve 1 Kaseinhydrolyse senere end 26 timer for nogle stammer. Fluorescens også afprøvet på Kings Agar B - med negativt resultat. Kendt stamme viste fluorescens på begge substrater (mælkeagar og Kings Agar B).
- Prøve 2 Se prøve 1 side 17 (*P. aeruginosa*).
- Prøve 3 Se prøve 1 side 17 (*P. aeruginosa*).
- Prøve 4 Se prøve 1 side 17 (*P. aeruginosa*).

Lab.nr. 42.

Totale kimental ved 37°C

- Prøve 1 3 kolonytyper er observeret på 10 ml filteret:

I: 5 kolonier (gullig/brune og tørre, ca. 5-7 mm). Med tydelig klar hæmolyse.

3 kolonier (1-3 på næste side) (*gram positiv stav*) udtages til identifikation.

II: 9 kolonier (hvid/gullig, ca. 2 mm). Efter 48 timer ses tegn på hæmolyse (uden fuldstændig opklaring), dog kan mistanken til hæmolyse kun fås hos de forholdsvis enkeltliggende kolonier af denne type.

4 kolonier (4-7 på næste side) (*gram positiv coc*) udtages til identifikation. Alle 4 subkulturer udviser som renkultur på BA hæmolyse.

III: 5 kolonier. Mistanke om hæmolyse efter 48 timer på filteret.

3 kolonier (8-10 på næste side) (*gram negativ stav*) udtages til identifikation. Alle 3 subkulturer udviser som renkultur på BA hæmolyse. Skønt de 5 kolonier er samlet under en gruppe indledningsvis, udviser de forskellig morfologi på filteret og bibeholder denne forskellighed ved rendyrkning på BA. Forskelligheden består i, at 80% er rødbrune med ret tør overflade, mens 20% er mere grønlig og med våd overflade. Alle er store (ca. 5 mm) efter 48 timer.

Prøve 2

2 kolonityper er observeret på 1 ml filteret:

- 12 kolonier, som ligner type II i prøve 1. 4 kolonier (1-4 på næste side) (*gram positiv coc*) udtages til identifikation.

- 7 kolonier, som ligner type III i prøve 1. 3 kolonier (5-7 på næste side) (*gram negativ stav*) udtages til identifikation.

Jvf. bemærkninger beskrevet for kolonierne type II og III på side 15 (*prøve 1*), for denne prøve 2 er hovedparten af type III kolonierne dog grønlig og med våd overflade.

Prøve 3

3 kolonityper er observeret på 10 ml filteret:

- 5 kolonier, som ligner type I i prøve 1. 3 kolonier (1-3 på næste side) (*gram positiv stav*) udtages til identifikation.

- 9 kolonier, som ligner type II i prøve 1. 4 kolonier (4-7 på næste side) (*gram positiv coc*) udtages til identifikation.

- 8 kolonier, som ligner type III i prøve 1. 3 kolonier (8-10 på næste side) (*gram negativ stav*) udtages til identifikation. Her ses ligeledes hovedparten af kolonierne med grønlig pigmentering.

Jvf. iøvrigt bemærkninger side 15 (*prøve 1*).

Prøve 4

2 kolonityper er observeret på 1 ml filteret:

- 14 kolonier, som ligner type II i prøve 1. 4 kolonier (1-4 på næste side) (*gram positiv coc*) udtages til identifikation.

- 6 kolonier, som ligner type III i prøve 1. 3 kolonier (5-7 på næste side) (*gram negativ stav*) udtages til identifikation.

Jvf. iøvrigt bemærkninger side 15. (*prøve 1*).

Hæmolytiske kolonier ved 37°C

Prøve 1

Resultatet med angivelse af antal hæmolytiske kolonier på 10 ml filteret er ikke fremkommet som direkte tælling af filteret, idet det efter 24 timer kun var muligt at tælle 5 kolonier (type I), men mistanke om hæmolyse fra andre kolonier opstod efter 48 timer, det var dog ikke muligt at adskille og sammenholde hæmolyse/koloni. Resultatet er der-

for fremkommet som en efter-rationalisering på baggrund af den videre rendyrkning og identifikation.

På trods af at type III kolonierne udviser forskellig kolonimorfologi specielt med hensyn til pigmentering, samt mangelfuld til ingen fluorescens, konkluderes det, at der i alle tilfælde er tale om *P. aeruginosa*. Dette underbygges af det opnåede resultatet efter gennemløbning af DS 268 på prøven, samt at 2 kolonier med forskellig pigmentering efter gennemkørsel på API 20 E begge giver *P. aeruginosa* som absolut sandsynligste resultat.

Prøve 2

Jvf. bemærkninger på side 16 og side 16 fortsat (prøve 1):

Prøve 3

Jvf. bemærkninger side 16 og side 16 fortsat (prøve 1). Koloni 10 er ikke medtaget i beregningen (ikke kaseinhydrolyse), men det antages med stor sandsynlighed at det ligeledes er *P. aeruginosa*, idet en medtaget *P. aeruginosa* stamme viste meget svag kaseinhydrolyse.

Prøve 4

Jvf. iøvrigt bemærkninger side 16 og side 16 fortsat (prøve 1).

Pseudomonas aeruginosa

Prøve 1

Konklusionen *Ps. aeruginosa* er truffet på trods af at fluorescenskriteriet ikke er opfyldt for alle kolonierne. Fluorescens er faktisk bedst observeret på filterne, mens det var yderst vanskeligt at observere på mælkeagaren. Til underbyggelse af konklusionen henvises til det beskrevne på side 16. (prøve 1, hæmolytiske kolonier ved 37°C).

Pigmenteringen varierer fra grøn til svag gul.

Prøve 2

Jvf. bemærkninger side 17 (prøve 1).

Prøve 3

Jvf. bemærkninger side 17 (prøve 1).

Prøve 4

Jvf. iøvrigt bemærkningerne side 17 (prøve 1).

Lab.nr. 44.

Totale kimtal ved 37°C

Prøve 1

Mange kolonier på 100 ml filter er sammenvokset.

Hæmolytiske kolonier ved 37°C

Prøve 1

10 ml filter anvendt, da en del kolonier på 100 ml filter er sammenvokset.

Lab.nr. 45.

Totale kimtal ved 37°C

Prøve 1

Da begge resultater ligger udenfor det angivne interval, anvendes gennemsnittet fra de to resultater.

Pseudomonas aeruginosa

Prøve 1

Fluorescens og pigmentering var tydelig på cetrimidagar. På mælkeagar var der ingen pigmentering og fluorescensen var meget svær at se.

Prøve 2

Samme bemærkninger som ved prøve 1.

Prøve 3

Samme bemærkninger som ved prøve 1.

Prøve 4

Samme bemærkninger som ved prøve 1.

Lab.nr. 46.

Totale kimtal ved 37°C

Prøve 2 ad 0,1 ml filter: Kraftig renkultur, der ikke går igen i de øvrige fortyndinger. Årsagen ikke fundet. Resultatet udeladt.

Prøve 4 ad 100 ml filter: Overvokset.

100 ml filter overvokset.

Hæmolytiske kolonier ved 37°C

Prøve 1 ad koloni 1: Skarp α hæmolyse. Desuden undersøgt for forgæring af adonitol. Reaktion negativ. Kolonimorfologi typisk for *Bacillus cereus*.

ad koloni 2: Svag hæmolyse under kolonierne. Svag β hæmolytisk zone omkring kolonierne.

ad 100 ml filter: Sammenflydende hæmolyse under filteret. Uanvendeligt til nærmere undersøgelse.

Prøve 2 Sammenflydende hæmolyse på 10 ml og 100 ml filter. Kan ikke anvendes til identifikation.

AD kolonitype 1: Svagt lysebrunt pigmenterede. Skarp opklaret hæmolysezone ved overførsel til BA. Fluorescens (11).

AD kolonitype 2: Grønt pigment. Ingen fluorescens (8).

Prøve 3 Ad 100 ml filter: Sammenflydende hæmolyse.

Ad 10 ml filter: En type med skarp α hæmolyse (9) og en type med lidt svagere α hæmolyse (9).

Det må antages, at *Ps. Aeruginosa* også er forekommet i prøven, da den er påvist i samme prøve på Cetrimidnalidixinsyreagar.

Prøve 4 Ad 10 og 100 ml filtre. Resultatet anslået grundet sammenflydende hæmolyse.

Koloni type 1: Grønt pigment (8).

Koloni type 2: Lyst, brunt pigment (12). Begge typer vokser ved 42°C.

Pseudomonas aeruginosa

Prøve 1 Kulturen på 100 ml pladen ligner en renkultur. Evt. pigmentering på primærpladen svær at afgøre, evt. let lysegrønt pigment. Ingen pigmentering på mælkeagar, men 3 kolonier med fluorescensen nøje svarende til MLK's referencestamme anskaffet på VD's laboratorium.

Prøve 2 Kolonitype 1 og 2: Grønt pigment (6).

Kolonitype 3 og 4: Lysebrunt pigment (30). Pigmentering kun på Cetrimidnalidixin syreagar.

Lab.nr. 48.

Totale kimtal ved 37°C

Prøve 1 100 ml kunne ikke tælles med sikkerhed pga for tæt liggende kolonier.

Hæmolytiske kolonier ved 37°C

Prøve 1 ID er foretaget fra 10 ml filter, fordi kolonier på 100 ml filter ikke var enkeltliggende. - det giver så en usikkerhed på antallet.

Prøve 2 S.a. (*S. aureus*) var ikke tydelige efter 24 h. iu (koagulasetest for *B. cereus* og reaktion på æggeblommeagar for *S. aureus*)=ikke undersøgt.

Prøve 3 iu (koagulasetest for *B. cereus* og reaktion på æggeblommeagar for *S. aureus*) = ikke undersøgt.

Lab.nr. 50.

Pseudomonas aeruginosa

Prøve 1 Overfladevæksten er rendyrket på CN-agar. Mikroskopi af rene kolonier viser, at prøven indeholder *Pseudomonas*.

Prøve 2 Overfladevæksten er rendyrket på CN-agar. Mikroskopi af rene kolonier viser, at prøven indeholder *Pseudomonas*.

Prøve 3 Overfladevæksten er rendyrket på CN-agar. Mikroskopi af rene kolonier viser, at prøven indeholder *Pseudomonas*.

3.5. Generel vurdering.

3.5.1. Totale kimalt efter DS 2217.

Genfindelse I samtlige prøver genfinder laboratorierne med ganske få undtagelser niveauerne for det totale kimalt uden problemer, jf. den statistiske vurdering. Laboratoriernes bemærkninger giver endvidere ikke anledning til store ændringer af denne del af DS 2217, men præciseringer på baggrund af disse bemærkninger vil blive indarbejdet ved en kommende revision.

3.5.2. Hæmolytiske kolonier efter DS 2217.

Fundne hæmolytiske bakterier Mange laboratorier har haft problemer med at identificere de i prøverne værende hæmolytiske bakterier, d.v.s. *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Staphylococcus aureus*. 23 laboratorier har fundet *P. aeruginosa* i en eller flere af prøverne, mens 39 laboratorier har fundet *B. cereus* i de 2 prøver, der var tilsat denne testkultur, og 24 laboratorier har fundet *S. aureus* i en eller flere af prøverne. Enkelte laboratorier har således ikke identificeret de hæmolytiske bakterier, men angivet det totale antal hæmolytiske bakterier. Andre laboratorier har identificeret de hæmolytiske kolonier som *Bacillus mycoides*, *Bacillus*, *Bacillus brevis*, *Aeromonas*, *Pseudomonas cepacia/Pseudomonas pseudomallei*, Mikrokok, Gram negativ stav, *Staphylococ*, β -hæmolytisk *staphylococ*, *Staphylococcus epidermidis*, koagulase negativ *staphylococ*, *Bac. cepacia/pseudomallei* og *Pseudomonas*, hvilket fremgår af bilag 3.

Identifikationsmåder

DS 2217 angiver ikke kriterier og fremgangsmåder til identifikation af hæmolytiske bakterier, og følgelig heller ikke substrater og reagenser til brug ved denne identifikation. Laboratorierne har derfor frit kunnet vælge metode og hjælpemidler til identifikation af hæmolytiske bakterier, og der er således anvendt flere forskellige kombinationer af nedennævnte kriterier/substrater/reagenser/reaktioner: Kolonimorfologi, hæmolyseform, gramfarvning, KOHtest, mikroskopi,

API staph, API 20 E, oxi ferm tube, staph latex test, Staphyslidetest, kaninplasma, DNase, vækst ved 42°C, vækst på CN ved 42°C, vækst på mælkeagar ved 42°C, vækst ved 4°C, anaerob vækst, aerob vækst, sporer, bevægelighed i HF, bevægelighed, stik, HI bouillon, BHI, katalase, oxidase, Hugh & Leifsons medium, kaseinhydrolyse på mælkeagar, fluorescens, pigmentering, salt, mannitol, oksebouillon, gelatinehydrolyse, VP, citrat, lecitinase reaktion på æggeblommeagar, lecitinase reaktion på Bacillus cereus agar, indol, glucose, urease, arabinose, mannitol, Baird Parker samt Cereus selektiv agar.

Parametre i DS 2217

Ved en revision af DS 2217 bør det overvejes, hvorledes det er muligt i fortsættelse af kimtalsbestemmelsen, at vurdere en evt. forekomst af patogene bakterier i stedet for en generel vurdering af hæmolytiske bakterier, idet ikke alle hæmolytiske bakterier er patogene, ligesom der findes patogene bakterier, der ikke er hæmolytiske. Bacillus cereus kan karakteriseres som en relativ uskadelig bakterie i bassinvand, men dens hæmolyse er hurtigt indtrædende og meget tydelig. Derimod kan Staphylococcus aureus og Pseudomonas aeruginosa forårsage sygdom ved badning i inficeret bassinvand, men disse bakterier udvikler svage hæmolyseformer, og er derfor vanskelige at opdage ved hjælp af dette kriterium.

Fluorescens

3.5.3. Pseudomonas aeruginosa efter DS 268.

Næsten alle laboratorierne har haft problemer med angivelse af fluorescens ved anvendelse af mælkeagar, hvorimod ceftrimid-nalidixinsyreagar har givet tydeligere, men langt fra tilfredsstillende, fluorescens. Fluorescenskriteriet kan derfor betragtes som mindre egnet til brug ved identifikation af Pseudomonas aeruginosa, ligesom det bør fremhæves, at ikke alle P. aeruginosastammer er i stand til at udvise fluorescens. Fluorescenskriteriet anvendes da også kun til at adskille P. aeruginosa fra P. cepacia biotype C og P. pseudomallei, og det er måske ikke afgørende, at disse 3 adskilles i bassinvandssammenhæng. I modsat fald bør dette kriterium erstattes med et andet og mere velegnet kriterium, f. eks. argininhydrolyse, der kan adskille P. aeruginosa fra P. cepacia biotype C. P. pseudomallei er relateret til troperne og subtroperne, hvorfor det næppe er sandsynligt, at den forekommer i danske svømmebade. Hvis det alligevel beslutes at bibeholde fluorescenskriteriet, bør begrebet "fluorescens" defineres i DS 268.

Pigmentering

Pigmentering må ligeledes anses som et mindre væsentligt kriterium, idet ikke alle P. aeruginosastammer danner pigmenter, og de dannede pigmenter kan være meget forskellige af udseende.

4. Konklusioner.

4.1. Totale kimtal efter DS 2217.

4.1.1. Statistisk vurdering foretaget af VKI.

VKI's konklusioner, der fremgår af bilag 2, er gengivet nedenfor.

Vurdering af laboratorierne

Datamaterialet er homogent og uden generelt afvigende mønstre. Der er dog fundet en repeterbarheds-outlier, nemlig lab.nr. 25 på prøveparret 1 og 3, og en reproducerbarheds-outlier, nemlig lab.nr. 35 på prøveparret 2 og 4. Ved den generelle vurdering af h-værdier er alle resultater fra lab.nr. 35 fundet at være behæftede med systematiske fejl, og laboratoriets gennemsnit ligger ca. 3 standardafvigelser under det generelle niveau for alle prøver. Alle 4 enkeltresultater fra lab.nr. 35 er efterfølgende udeladt af den statistiske beregning. Ved Cochrans test og ved brug af den udvidede repeterbarhedsgrænse $r_{99\%}$ er det fundet, at lab.nr. 25 har en afstand mellem prøve 1 og 3, der er afvigende stor. Ved brug af $r_{99\%}$ er det fundet, at lab.nr. 10A har en afstand mellem prøve 2 og 4, der er afvigende stor.

Generel analysekvalitet

For kimtalsniveauet på 200 kim/100 ml er repeterbarhedsstandardafvigelsen 0.096 log kim/100 ml, og reproducerbarhedsstandardafvigelsen er 0.107 log kim/100 ml. For kimtalsniveauet på 2000 kim/100 ml er repeterbarhedsstandardafvigelsen 0.106 log kim/100 ml, og reproducerbarhedsstandardafvigelsen er 0.107 log kim/100 ml. Disse standardafvigelser er i god overensstemmelse med de af VD angivne standardgrænser omkring 0.10-0.15 for s_r og væsentligt bedre end tilsvarende standardgrænser omkring 0.20-0.25 for s_R .

Homogenitet

Kontrol af homogenitet er udført ved hjælp af enkeltbestemmelser af 10 prøver af hvert prøvepar. Der er ikke fundet signifikante standardafvigelser vurderet på baggrund af repeterbarhedsstandardafvigelser.

4.1.2. Laboratoriernes bemærkninger.

Fortyndingsvæske

* Det ønskes angivet, hvorledes pH i fortyndingsvæsken kan blive 7.0.

Aflæsning

* Tælleinterval bør være >20 til <200 .

* Det foreslås, at man overvejer at aflæse på filtre med ≥ 10 og ≤ 100 .

* Det giver en større statistisk sikkerhed at tælle på filtre med op til 200 kolonier end på filtre med op til 100 kolonier.

* Resultater på basis af et lille kolonital er behæftet med relativ stor usikkerhed, og der er på plader med 100-200 kolonier stadig tale om distinkte, lettællelige kolonier.

(Af ovennævnte 4 punkter fremgår det, at laboratorierne har forskellig opfattelse af, hvilket tælleinterval der bør anvendes).

* 24 timers inkubation anses for utilstrækkeligt til at foretage en

pålidelig kimtælling.

Beregning

- * Det fremgår ikke klart af regneeksemplerne i DS 2217, hvorledes disse skal anvendes.
- * Hvorledes skal "Antallet af kolonier divideret med den totale udsædsmængde x 100" tolkes?
- * DS 2217 mangler anvisning på resultatberegning for tal <20 og >100.
- * Fordelingen af kimtallet kan falde udenfor de i DS 2217 angivne eksempler.
- * DS 2217 mangler beregningsbeskrivelse for visse tilfælde.

Sammenfatning

4.1.3. Generel vurdering.

I samtlige prøver genfinder laboratorierne med ganske få undtagelser niveauerne for det totale kimtal uden problemer, jf. den statistiske vurdering. Laboratoriernes bemærkninger giver endvidere ikke anledning til store ændringer af denne del af DS 2217, men præciseringer på baggrund af disse bemærkninger vil blive indarbejdet ved en kommende revision.

4.2. Hæmolytiske kolonier efter DS 2217.

Det bemærkes, at resultaterne af identifikation og aflæsning af antallet af hæmolytiske kolonier efter DS 2217, den anvendte metodik eller andet, som laboratorierne har benyttet til at opnå disse resultater, *ikke i nogen henseende kan eller må anvendes til bedømmelse af laboratorierne.*

4.2.1. Laboratoriernes bemærkninger.

Fortyndingsvæske

- * Det ønskes angivet, hvorledes pH i fortyndingsvæsken kan blive 7.0.

Aflæsning

- * Det er meget vanskeligt, at sammenholde koloni og hæmolyse, hvis der forekommer flere hæmolyseformer.
- * Aflæsning af hæmolytiske kolonier bør ske efter inkubation i 1 døgn og efter inkubation i 2-3 døgn.
- * I DS 2217 bør der tælles op til 200 kolonier i stedet for op til 100 kolonier.
- * Det bør i standarden angives, at pladerne skal inkuberes yderligere 24 timer (d.v.s. ialt 48 timer).
- * Der var først begyndende Staphylocochæmolyse efter 72 timers inkubation.
- * Nogle kolonier viste først hæmolyse efter 48 timers inkubation ved 37°C og efterfølgende henstand ved stuetemperatur.
- * Hæmolyse efter 1 døgn var udelukkende *B. cereus*, mens andre bakterier først viste hæmolyse efter inkubation i 48 timer eller længere.

Metoden bør derfor ændres, så der sker aflæsning efter 1-3 døgn.

* *S. aureus* giver en meget svag hæmolyse efter 1 døgn, men hæmolyse bliver helt klar og skarprandet efter yderligere nogle få ekstra timers henstand i køleskab.

* Efter 24 timer er mange hæmolyseformer ikke fremtrædende nok til at aflæsning kan foretages, men efter 48 timer er det vanskeligt at sammenholde koloni og hæmolyse.

* Såfremt "ingen hæmolyse" efter 24 timer skal sidestilles med "små og usikre hæmolyseformer (DS 2217)" bør dette præciseres ved en fremtidig revision af DS 2217.

* 24 timers inkubation anses for utilstrækkeligt til at foretage en pålidelig kimtælling.

* Hvis der er mere end 50 hæmolytiske kolonier på filteret kan aflæsning ikke foretages.

Identifikation

* Det bør angives, hvilke tests, der skal udføres ved forekomst af forskellige hæmolytiske kolonier.

* Undersøgelse for hæmolytiske bakterier bør beskrives nærmere.

Beregning

* DS 2217 mangler anvisning på resultatberegning for tal <20 og >100.

* Det virker forkert, at skulle angive et kvantitativt resultat ved hjælp af vilkårlig opprikning.

* DS 2217 mangler beregningsbeskrivelse for visse tilfælde.

Sammenfatning

4.2.2. Generel vurdering.

Mange laboratorier har haft problemer med at identificere de hæmolytiske bakterier, og dette antages især at være forårsaget af den i DS 2217 manglende beskrivelse af identifikationsmetoder og dertilhørende substrater og reagenser. Laboratorierne har derfor selv valgt identifikationsmetoder til undersøgelse for hæmolytiske bakterier, og interkalibreringen afspejler således en mangfoldighed heraf, ligesom der blev "identificeret" mange forskellige arter af hæmolytiske bakterier. Det må konkluderes, at hvis DS 2217 fortsat skal indeholde identifikation af hæmolytiske bakterier, er det nødvendigt at beskrive, hvilke hæmolytiske bakterier, der skal undersøges for, og hvorledes dette skal gøres. Det foreslås imidlertid, at det overvejes, hvorledes det er muligt i fortsættelse af kimtalsbestemmelsen, at vurdere en evt. forekomst af patogene bakterier i stedet for en generel vurdering af hæmolytiske bakterier. Ved revision af denne del af DS 2217 vil præciseringer på baggrund af interkalibreringen og deltagernes bemærkninger hertil blive indarbejdet i denne.

4.3. *Pseudomonas aeruginosa* efter DS 268.

Det bemærkes, at resultaterne af bestemmelse af *Pseudomonas aeruginosa*

nosa efter DS 268, den anvendte metodik eller andet, som laboratorierne har benyttet til at opnå disse resultater, *ikke i nogen henseende kan eller må anvendes til bedømmelse af laboratorierne.*

4.3.1. Laboratoriernes bemærkninger.

Fortyndingsvæske

* Det ønskes angivet, hvorledes pH i fortyndingsvæsken kan blive 7.0.

*Aflæsning på
CN-agar*

* Samtlige kolonier var meget udflydende på filtrene, hvilket vanskeliggjorde aflæsningen.

* Tælleinterval er ikke angivet.

* Ved aflæsning bør kolonimorfologien vurderes.

*Hugh & Leifsons
medium*

* Hugh & Leifsons medium viste ikke en overbevisende reaktion.

* Reaktion i Hugh & Leifsons medium fremkom først efter 3 døgn.

*Fluorescens og
pigmentering*

* Det bør nævnes i forskriften, at fluorescensen kan nedsættes/forsvinde efter opbevaring af mælkeagarpladerne i køleskab, og at aflæsning derfor bør foretages på plader taget direkte fra 42°C termostaten.

* Fluorescensen er svag og atypisk, hvorved der ikke kan skelnes mellem *P. cepacia* biotype C og *P. aeruginosa*.

* Mælkeagar giver en dårlig udvikling af fluorescens og pigmenter, og DS 268 bør revideres på dette punkt.

* Mælkeagar synes uegnet til vurdering af fluorescens og pigmentering.

* Fluorescens på mælkeagar fremkommer ikke tydeligt efter 24 timer.

* Den konstaterede pigmentering fremkom først efter 24 timers henstand af mælkeagarpladerne ved stuetemperatur efter 2 døgn ved 37°C.

* Fluorescenskriteriet er meget usikkert, og der er først udviklet fluorescens efter mere end 2 dages inkubation.

* Pigmentering fremkom hos nogle *Pseudomonas* først efter 2 døgn.

* Differentiering mellem *P. aeruginosa* og *P. cepacia* biotype C er meget usikker, da fluorescensen er utydelig og pigmenteringen mangler.

* Pigmentdannelsen var sent indtrædende.

* Fluorescensen er kraftigere på CN-agar end på mælkeagar.

* Udviklingen af fluorescens blev bedømt på Kings Agar B.

* Fluorescens og pigmentering er ikke tydelig efter 1 døgn inkubation ved 37°C, men efter yderligere 3 døgn ved stuetemperatur er aflæsningen let.

* Fluorescens manglede.

* Fluorescens er ligeledes ikke fremkommet på Kings Agar B.

* Fluorescens og pigmentering var tydelig på CN-agar, mens fluorescens var utydelig på mælkeagar, hvor der desuden ikke var pigmentering.

* Fluorescens er et meget subjektivt kriterium, da *P. aeruginosa* tilsyneladende kan variere betydeligt med hensyn til fluorescens og pigmentering.

* Fluorescens bør defineres.

- * Fluorescenskriteriet er usikkert.
- * Fluorescens og pigmentering bør måske aflæses på Kings agar B i stedet for på mælkeagar.
- * Fluorescens på mælkeagar er vanskelig at aflæse.
- * Pigmentdannelse fremkom først efter henstand af mælkeagar ved stuetemperatur.

Kaseinhydrolyse

- * Kaseinhydrolyse fremkom senere end 26 timer.

Beregning

- * Det bør i standarden stå, at *P. aeruginosa* angives som forholdstal, og ikke som der står, som %.
- * Det virker forkert at skulle angive et kvantitativt resultat ved hjælp af en vilkårlig opprikning.

Sammenfatning

4.3.2. Generel vurdering.

Fluorescens og pigmentering har voldt mange laboratorier problemer, og det kan diskuteres, om disse kriterier skal bibeholdes i DS 268. Ikke alle *P. aeruginosa*-stammer er således i stand til at fluorescere, ligesom ikke alle er pigmentdannende. Fluorescens anvendes i DS 268 kun til at adskille *P. aeruginosa* fra *P. cepacia* biotype C og *P. pseudomallei*, og det er måske ikke afgørende at adskille disse bakterier i bassinvandssammenhæng. I modsat fald bør dette kriterium erstattes af et mere velegnet kriterium, f. eks. argininhydrolyse, der adskiller *P. aeruginosa* fra *P. cepacia* biotype C. *P. pseudomallei* er relateret til troperne og subtroperne, hvorfor den næppe træffes i danske svømmebade. Hvis det alligevel beslutes, at bibeholde fluorescenskriteriet bør begrebet "fluorescens" defineres i DS 268. Ved revision af DS 268 vil præciseringer på baggrund af interkalibreringen og delta-gernes bemærkninger hertil blive indarbejdet i denne.

4.4. DS 2217 og DS 268.

4.4.1. Laboratoriernes bemærkninger.

*Antal *P. aeruginosa**

- * Der er forskel på fund af antal *Pseudomonas aeruginosa* ved dyrkning på blodagar og ved dyrkning på ceftrimid-nalidixinsyre-agar.

4.4.2. Generel vurdering.

CN-agar/blodagar

Pseudomonas aeruginosa er talrigere forekommende på blodager end på ceftrimid-nalidixinsyre-agar, idet udsæd af samme mængde fra samme prøve på de 2 nævnte substrater giver ca. 25-50 % flere *P. aeruginosa* på blodagar end på ceftrimid-nalidixinsyre-agar. Dette er dog afhængig af de øvrige tilsatte testkulturer og disses antal.

5. Referencer.

DS 2217. Vandundersøgelse.

Bestemmelse af 37°C kimtallet i svømmebassin vand ved membranfiltrering.

DS 268. Vandundersøgelse.

Bestemmelse af *Pseudomonas aeruginosa* i vand ved membranfiltrering.

Miljøstyrelsen.

Orientering fra Miljøstyrelsen. Nr. 7, 1986. Mikrobiologiske vand- og miljøanalyser 1985.

Miljøstyrelsens Mikrobiologiske Referencelaboratorium.

Vejledning til de deltagende laboratorier i Miljøstyrelsens 15. mikrobiologiske interkalibrering.

6. Bilagsfortegnelse.

Side

Bilag 1: Rådata til statistisk behandling	34
Bilag 2: Statistik	35
Bilag 3: Øvrige rådata	36
Bilag 4: Deltagende laboratorier	40
Bilag 5: Homogenitetskontrol	42

Rådata til statistisk behandling.

RESULTATER AF 15. MIKROBIOLOGISKE INTERKALIBRERING

Totale kimal pr. 100 ml ved 37°C i 24 timer på blodagar.

Lab. nr.	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4
0	220	1400	170	2000
1	130	1100	100	2100
2	200	2200	210	2300
3	180	1900	140	1900
4	140	2200	180	2500
5	180	2200	170	2000
6	140	2300	160	1800
7	310	3000	220	2000
8	180	2600	230	1900
9				
10A	230	2400	150	950
10B	170	1600	170	2100
11	170	1500	200	2700
12	280	2500	130	1800
13	220	2100	190	3000
14	160	1600	180	1800
15	170	1600	130	3700
16	120	1900	190	1400
17	180	1700	170	1900
18	280	3000	130	2100
19				
20A	200	2000	160	1800
20B	190	2700	180	2800
21				
22	210	1200	150	2000
23	210	2500	130	2000
24	150	1800	180	1200
25	200	2600	2500	1900
26	210	2000	150	2100
27	170	1800	170	1600
28	260	1900	210	2000
29	290	3100	290	1900
30	160	3000	300	2100
31	310	2000	270	1400
32	130	1700	140	1300
33	240	2400	230	1600
34	240	1800	150	2100
35	68	1200	79	1100
36	130	1600	160	2400
37	200	2300	300	2400
38	190	2100	190	1700
39	220	2600	190	2700
40	230	2300	200	2400
41	160	3100	240	2300
42	190	1900	220	2000
43				
44	210	2200	130	2500
45	160	2400	230	2400
46	180	3400	240	2000
47				
48	230	2000	300	2600
49				
50	250	2000	180	1800

Statistik.

Det kan konkluderes at

- Indledende vurdering af datamateriale Datamaterialet er homogent og uden generelt afvigende mønstre. Der er fundet en enkelt repeterbarheds-outlier og en enkelt reproducerbarheds-outlier. Disse udgøres af hhv. lab. 25 på prøve 1 og 3, og lab. 35 på prøve 2 og 4. Efterfølgende er alle fire enkeltresultater fra laboratorium nr. 35 fundet at ligge mere end to standardafvigelser lavere end gennemsnittene for de enkelte prøver. Resultaterne fra laboratorium nr. 35 er derfor udeladt i den videre statistiske behandling.
- Generel analysekvalitet Den generelle analysekvalitet kan udtrykkes ved standardafvigelser for repeterbarhed og reproducerbarhed på 0.096 log kim/100 ml og 0.107 log kim/100 ml ved et totalt kimtalsniveau på 200 kim/100 ml. Ved et kimtalsniveau på 2000 kim/100 ml er værdierne hhv. 0.106 log kim/100 ml og 0.107 log kim/100 ml. Disse standardafvigelser er i god overensstemmelse med standardgrænserne omkring 0.10 - 0.15 for s_r , og væsentligt bedre end standardgrænserne omkring 0.20 - 0.25 for s_R .
- En regressionslinje gennem alle enkeltresultater (pånær outliers) er bestemt til $y = 1.04x - 0.11$, hvor y er en måling, mens x er det nominelle indhold. Denne linjes hældning afviger signifikant fra 1, hvilket kan henføres til at differensen mellem de fundne niveauer er 1.037, som er signifikant større end den nominelle differens på 1.
- Bedømmelse af laboratorier Bedømmelse af laboratorier er gjort, dels generelt ved hjælp af h-værdier og k-værdier, dels specifikt for hvert niveau ved hjælp af Cochrans og Grubbs' test, samt vha. udvidede repeterbarhedsgrænser $r_{99\%}$.
- Ved den generelle vurdering af h-værdier er resultaterne fra laboratorium nr. 35 fundet at være behæftede med systematiske fejl. Laboratoriets gennemsnit ligger ved begge niveau ca. tre standardafvigelser under det generelle niveau.
 - Ved Cochrans test og ved brug af $r_{99\%}$ er fundet at laboratorium nr. 25 har en afstand mellem prøve 1 og 3, der er afvigende stor.
 - Ved brug af den udvidede repeterbarhedsgrænse $r_{99\%}$ er fundet at laboratorium nr. 10A har en afstand mellem prøve 2 og 4, som er afvigende stor.
- Homogenitet Kontrol af homogenitet er udført ved hjælp af enkeltbestemmelser på ti prøver for hvert niveau. Der er ikke fundet signifikante standardafvigelser mellem prøverne, vurderet på baggrund af standardafvigelser for repeterbarhed.

Øvrige rådata.

RESULTATER AF 15. MIKROBIOLOGISKE INTERKALIBRERING

Antallet af *Pseudomonas aeruginosa* pr. 100 ml. ved 37°C i 24 - 48 timer på blodagar.

Lab. nr.	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4
0		< 1(Hæm.bak.)	16(Pseud.)	30
1				
2		< 1(Hæm.bak.)		< 1(Hæm.bak.)
3				
4	60	1200	30	800
5	40(Pseud.)	700(Pseud.)	60(Pseud.)	500(Pseud.)
6		800		600
7	21(Pseud.)	< 1(Hæm.bak.)	30(Pseud.)	< 1(Hæm.bak.)
8				400
10A	25	160	12	160
10B	24(Pseud.)	270(Pseud.)	33(Pseud.)	440(Pseud.)
11	30	400	30	400
12		< 1(Hæm.bak.)		< 1(Hæm.bak.)
13 *)				
14	10	84		290
15	80	560	27	1600
16	14(Pseud.)			
17				
18	20	600	30	300
20A	20	500	30	300
20B	20	560	50	600
22		320(Pseud.)		380(Pseud.)
23	30	800	30(Pseud.)	700(Pseud.)
24	17	230	30	240
25		< 1(Hæm.bak.)		< 1(Hæm.bak.)
26	90	700	18	600
27				
28				
29	26(Pseud.)	800(Pseud.)	24(Pseud.)	480(Pseud.)
30	40	1600	80	800
31	ca.33(Hæm.bak.)	ca1000(Hæm.bak.)	ca.180(Hæm.bak.)	ca1200(Hæm.bak.)
32	53(Hæm.bak.)	< 1(Hæm.bak.)	57(Hæm.bak.)	< 1(Hæm.bak.)
33				
34				
35		2000(Hæm.bak.)	36(Hæm.bak.)	1400(Hæm.bak.)
36				
37	60	1100	70	700
38				
39			10(Bacillus)	
40	60	300	10	500
41		350		340
42	50	700	50	600
44		< 1(Hæm.bak.)		< 1(Hæm.bak.)
45	36	1400		1000
46		1100		1200
48				
50		360		300

*) Lab.nr. 13 har ikke angivet antallet af hæmolytiske kolonier.

Betegnelser i parentes angiver påvisning af andet end *Pseudomonas aeruginosa*.Ikke udfyldte rubrikker angiver, at *Pseudomonas aeruginosa* ikke er fundet.

Betegnelsen hæm.bak. betyder, at det totale antal hæmolytiske kolonier er angivet, og at der ikke er foretaget identifikation af disse.

Øvrige rådata.

RESULTATER AF 15. MIKROBIOLOGISKE INTERKALIBRERING

Antallet af *Bacillus cereus* pr. 100 ml ved 37°C i 24 - 48 timer på blodagar.

Lab. nr.	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4
0	40	< 1(Hæm.bak.)	32	
1	60(Bacillus)		50(Bacillus)	
2	25	< 1(Hæm.bak.)	30	< 1(Hæm.bak.)
3	61	420(B. brevis)	40	530(B. brevis)
4	40		50	
5	50		30	
6	60		60	
7	32(Bacillus)	< 1(Hæm.bak.)	46(Bacillus)	< 1(Hæm.bak.)
8	60		40	
10A	32		24	
10B	32		16	
11	60		50	
12	48	< 1(Hæm.bak.)	37	< 1(Hæm.bak.)
13 *)				
14	40		60	140(Mikrokok.)
15	40(B.mycoides)		40(B.mycoides)	
16	7		100	
17	45		68	
18	80	1000(Aeromonas)	40	300(Gr- stav)
20A	90		50	
20B	40		10	
22	30		50	
23	50		40	
24	76	150(Ps. cepacia/ pseudomallei)	80	160(Ps. cepacia/ pseudomallei)
25	59	< 1(Hæm.bak.)	80	< 1(Hæm.bak.)
26	30		30	
27	43		37	
28	90		30	
29	130(Bacillus)		48(Bacillus)	
30	50		30	
31	ca.33(Hæm.bak.)	ca.1000(Hæm.bak.)	ca.180(Hæm.bak.)	ca.1200(Hæm.bak.)
32	53(Hæm.bak.)	< 1(Hæm.bak.)	57(Hæm.bak.)	< 1(Hæm.bak.)
33	40		40	
34	60		50	
35		2000(Hæm.bak.)	36(Hæm.bak.)	1400(Hæm.bak.)
36	38		58	
37	60		70	
38	65		41	
39	56		40	
40	20		40	
41	23		32	
42	50		50	
44	54	< 1(Hæm.bak.)	63	< 1(Hæm.bak.)
45	24		50	
46	90		90	
48	40	260	40	
50	31		43	

*) Lab.nr. 13 har ikke angivet antallet af hæmolytiske kolonier.

Betegnelser i parentes angiver påvisning af andet end *Bacillus cereus*.Ikke udfyldte rubrikker angiver, at *Bacillus cereus* ikke er fundet.

Betegnelsen hæm.bak. betyder, at det totale antal hæmolytiske kolonier er angivet, og at der ikke er foretaget identifikation af disse.

Øvrige rådata.

RESULTATER AF 15. MIKROBIOLOGISKE INTERKALIBRERING

Antallet af *Staphylococcus aureus* pr. 100 ml ved 37°C i 24 - 48 timer på blodagar.

Lab. nr.	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4
0		< 1(Hæm.bak.)		
1	50(Staph.)	600(Staph.)	40(Staph.)	1300(Staph.)
2		< 1(Hæm.bak.)		< 1(Hæm.bak.)
3				
4	30(β-hæm.staph.)	1000(β-hæm.staph.)	70(β-hæm.staph.)	1700(β-hæm.staph.)
5	60(Staph.)	900(Staph.)	70(Staph.)	900(Staph.)
6	50	1200	50	1200
7		< 1(Hæm.bak.)		< 1(Hæm.bak.)
8	50	1600	110	1300
10A		160(<i>S.epidermidis</i>)		160(<i>S.epidermidis</i>)
10B	24(Staph.)	630(Staph.)	33(Staph.)	660(Staph.)
11	70	900	50	2300
12		< 1(Hæm.bak.)		< 1(Hæm.bak.)
13 *)				
14		340(Staph.)		290(Staph.)
15	20	840	13	550
16	80(Staph.)	1300(Staph.)	30(Staph.)	470(Staph.)
17	70	800	58	1200
18	20	200	30	1300
20A	60	1400(Koagulaseneg. staph.)	30	1300
20B				
22		220(Staph.)		150(Staph.)
23	40	1000	60	1000
24	11(<i>Ps. cepacia/pseudomallei</i>)	500	(<i>Ps. cepacia/pseudomallei</i>)	500
25		< 1(Hæm.bak.)		< 1(Hæm.bak.)
26	80	1000	90	1400
27	90	770	120	700
28	70	1000	110	1200
29	100(Staph.)	1900(Staph.)	170(Staph.)	1100(Staph.)
30	70	1400	190	1400
31	ca. 33(Hæm.bak.)	ca.1000(Hæm.bak.)	ca.180(Hæm.bak.)	ca.1200(Hæm.bak.)
32	53(Hæm.bak.)	< 1(Hæm.bak.)	57(Hæm.bak.)	< 1(Hæm.bak.)
33	150	1500	70	900
34	80	1200	60	1200
35	82	2000(Hæm.bak.)	36(Hæm.bak.)	1400(Hæm.bak.)
36	ca. 60(Staph.)	ca. 90	ca. 60	2000
37	80	900	140	1300
38	40	210	50	250
39	53	1700	46	1500
40	70	1300	40	1400
41				
42	90	1200	90	1400
44		< 1(Hæm.bak.)		< 1(Hæm.bak.)
45		960		
46	20(β-hæm.staph.)	800(<i>Ps. cepacia/pseudomallei</i>)	90(<i>Bac. cepacia/pseudomallei</i>)	800(<i>Ps. cepacia/pseudomallei</i>)
48		260	17	420
50	19(Staph)	840(Staph.)	7(Staph.)	500(Staph.)

*) Lab.nr. 13 har ikke angivet antallet af hæmolytiske kolonier. Betegnelser i parentes angiver påvisning af andet end *Staphylococcus aureus*. Ikke udfyldte rubrikker angiver, at *Staphylococcus aureus* ikke er fundet. Betegnelsen hæm. bak. betyder, at det totale antal hæmolytiske kolonier er angivet, og at der ikke er foretaget identifikation af disse.

Øvrige rådata.

RESULTATER AF 15. MIKROBIOLOGISKE INTERKALIBRERING

Antallet af *Pseudomonas aeruginosa* pr. 100 ml ved 42°C i 48 timer på ceftrimid-nalidixinsyre-agar.

Lab. nr.	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3	Prøve 4
0	3	< 1	< 1	120
1	25	320	15	280
2	8	72	7	200
3	16	170	17	160
4	19	460	37	480
5	5	210	7	132
6	21	460	21	320
7	22	460	17	340
8	30	270	18	300
10A	47	350	37	600
10B	16	330	22	290
11	13	140	24	250
12	18	150	11	20
13 *)				
14	14	250	9	330
15	26	320	22	600
16	1	100	6	50
17	29	360	31	500
18	18	270	17	280
20A	37	490	38	450
20B	32	400	33	560
22	3500	350	3500	370
23	37	410	28	620
24	20	380	15	270
25	25	390	890	420
26	22	310	≥ 22	350
27	33	530	40	610
28	32	510	22	370
29	22	190	17	300
30	34	780	37	650
31	38	460	34	470
32 *)				
33	33	470	34	520
34	32	470	34	550
35	17	190	24	300
36	ca. 3	240	14	110
37	33	370	32	420
38	29	500	44	410
39	37	340	37	810
40	< 1	< 1	< 1	< 1
41	18	280	26	330
42	24	500	43	470
44	13	340	24	320
45	27	290	25	370
46	8	300	6	88
48	15	140	8	170
50	ikke tællelig	ikke tællelig	ikke tællelig	340

*) Lab. nr. 13 og 32 har ikke angivet antallet af *Pseudomonas aeruginosa*.

Deltagende laboratorier.

Samlet oversigt over de 47 deltagende laboratorier. Rækkefølgen er uafhængig af laboratoriernes kodenummerering.

- Levnedsmiddelkontrollen i Roskilde I/S, 4000 Roskilde.
 Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen, 4200 Slagelse.
 Miljølaboratoriet, 7100 Vejle.
 N.Ø. Vendsyssels Levnedsmiddel- og Miljøkontrol, 9900 Frederikshavn.
 Stadsdyrlægens kontor, 2000 København F.
 Levnedsmiddelkontrollen Sønderborg, 6400 Sønderborg.
 Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen I/S, 2740 Skovlunde.
 Holstebro Fælleskommunale Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen, 7500 Holstebro.
 Levnedsmiddel- og Miljøtilsynet, 8200 Århus N.
 Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen, 7000 Fredericia.
 Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen Køge Bugt I/S, 4600 Køge.
 Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen, 7700 Thisted.
 Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen, 4800 Nykøbing F.
 Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen, 8600 Silkeborg.
 Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen, 4300 Holbæk.
 Det Fælleskommunale Laboratorium, 7400 Herning.
 Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen, 6705 Esbjerg Ø.
 Den Fælleskommunale Levnedsmiddelkontrollen, 5700 Svendborg.
 Fælleskommunal Levnedsmiddelkontrol, 2600 Glostrup.
 Levnedsmiddelkontrollen, 7600 Struer.
 Hygiejnisk Forvaltning, 9220 Aalborg Øst.
 Bornholms Levnedsmiddelkontrol, 3700 Rønne.
 Miljø- og Levnedsmiddellaboratoriet, 4700 Næstved.
 Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen, 5220 Odense SØ.
 Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen, 3400 Hillerød.
 Levnedsmiddelkontrollen I/S, 3600 Frederikssund.
 Det Kommunale Laboratorium, 6200 Åbenrå.
 Miljø- og Levnedsmiddel-Centret I/S, 8700 Horsens.
 Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen i Viborg I/S, 8800 Viborg.
 Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen, 4100 Ringsted.
 Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen Hjørring, 9800 Hjørring.
 Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen, 6760 Ribe.
 Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen, 8900 Randers.

Levnedsmiddelkontrollen i København I/S, 1711 København V.
Det Fælleskommunale Hygiejnelaboratorium, 6270 Tønder.
Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen, 6100 Haderslev.
Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen, 6800 Varde.
Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen, 3000 Helsingør.
Hedeselskabet. Laboratoriet, 9230 Svenstrup J.
Qvist's Laboratorium A/S, 8240 Risskov.
Steins Laboratorium A/S, 7500 Holstebro.
Steins Laboratorium A/S, 6650 Brørup.
Alfred Jørgensen. Laboratory Ltd., 1809 Frederiksberg C.
R. Dons. Vandanalytisk Laboratorium, 2850 Nærum.
Vandkvalitetsinstituttet, 2970 Hørsholm.
Steins Laboratorium A/S, 2620 Albertslund.
Hygiejnisk Institut, FR-100 Thorshavn.

Homogenitetskontrol.

Til homogenitetskontrol blev der ialt udtaget 10 koncentreter af hvert prøvepar, nedenstående benævnt glas nr. 1 - 10. Udtagningen af disse fordeltes jævnt over hele aftapningsperioden. Koncentreterne blev opbevaret i termocontainer ved 0-5°C i 24 timer, hvorefter prøverne blev fremstillet som beskrevet i vejledningen og dernæst undersøgt i henhold til DS 2217 og DS 268. Resultaterne af homogenitetskontrollen er vist i nedenstående skema:

Prøveparret 1 og 3. Antallet er pr. 100 ml.

Glas nr.	Totale kimental på blodagar efter DS 2217	Hæmolytisk B. cereus efter DS 2217	Hæmolytisk S. aureus efter DS 2217	Hæmolytisk P. aeruginosa efter DS 2217	Ikke hæmolytiske kolonier efter DS 2217 *	Pseudomonas aeruginosa efter DS 268
1	360	90	80	40	150	37
2	170	30	80	30	30	25
3	240	80	30	40	90	32
4	200	50	60	20	70	30
5	260	60	100	40	60	36
6	290	30	140	60	60	34
7	180	30	100	10	40	36
8	190	50	70	40	30	42
9	150	40	30	20	60	30
10	230	30	50	90	60	36

Prøveparret 2 og 4. Antallet er pr. 100 ml.

Glas nr.	Totale kimental på blodagar efter DS 2217		Hæmolytisk S. aureus efter DS 2217	Hæmolytisk P. aeruginosa efter DS 2217	Ikke hæmolytiske kolonier efter DS 2217 *	Pseudomonas aeruginosa efter DS 268
1	2400		1800	600	0	460
2	2000		1600	200	200	580
3	1600		800	600	200	570
4	2500		1500	1000	0	480
5	1800		500	500	800	450
6	2000		1300	600	100	480
7	2100		900	#	?	430
8	1800		1500	300	0	500
9	2400		800	#	?	440
10	2200		900	500	800	400

Kan ikke aflæses.

? Kan ikke beregnes.

* Beregnede værdier.

