

# Arbejdsrapport fra Miljøstyrelsen

Nr. 4      1986

MILJØSTYRELSENS 5. MIKROBIOLOGISKE INTERKALIBRERING  
BESTEMMELSE AF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS (=DS= 2256)

---

UDARBEJDET AF

MILJØ- OG LEVNEDSMIDDELKONTROLENHEDEN  
ODENSE

---

**Miljøstyrelsen**

Strandgade 29, 1401 København K, tlf. 01-57 83 10

MILJØSTYRELSENS 5. MIKROBIOLOGISKE INTERKALIBRERING

INTER =DS= 2256

Vandundersøgelse.

Bestemmelse af Clostridium perfringens.

Juli 1986.

MILJØSTYRELSEN  
BIBLIOTEKET  
STRANDGADE 29  
1401 KØBENHAVN K

## INDHOLDSFORTEGNELSE.

	SIDE
1. INDLEDNING .....	3
2. GENNEMFØRELSE AF 5. INTERKALIBRERING (Inter =DS= 2256: Bestemmelse af Clostridium perfringens) .....	4
3. RESULTATER .....	6
4. KONKLUSIONER .....	12
BILAGSFORTEGNELSE .....	14

## 1. INDLEDNING.

Førud for nærværende interkalibrering er der i 1984 og 1985 gennemført interkalibreringer i Miljøstyrelsens regi på følgende mikrobiologiske metoder indenfor vandanalyser:

1. Bestemmelse af kimtallet ved 37°C i Plate count agar (Inter =DS= 2254)
2. Bestemmelse af coliforme og termotolerante bakterier efter MPN-metoden (Inter =DS= 2255).
3. Bestemmelse af kimtallet og fluorescerende kim ved 21°C i King's agar B (Inter =DS= 2252).
4. Bestemmelse af kimtallet ved 21°C i Plate count agar (Inter =DS= 2251).

Interkalibreringerne er i alle tilfælde blevet gennemført på Miljø- og levnedsmiddelkontrolenheden i Odense.

Styringsgruppen besluttede i forlængelse af de tidligere interkalibreringer, at gennemføre en interkalibrering på analysemetoden for Clostridium perfringens i jernsulfitagar efter forskriften i standardbladet =DS= 2256.

Metoden er udarbejdet til bestemmelse af Clostridium perfringens i drikkevand, overfladevand, spildevand, slam og sedimentter.

Metoden definerer Clostridium perfringens som obligat anaerobe, sporedannende, gram-positive bakterier som ved 48°C reducerer sulfid til sulfid indenfor 24 timer.

Af praktiske grunde har nærværende interkalibrering alene fokuseret på metoden som den foreligger beskrevet til analysering af recipientprøver (overfladevand/spildevand) og der vil derfor ikke blive taget stilling til eventuelle problemer ved metodens anvendelse på drikkevand eller på slam eller sedimentprøver. Ligesom der heller ikke vil blive taget stilling til den del af metoden, der omhandler bestemmelse af Clostridium perfringens sporer.

2. GENNEMFØRELSE AF 5. INTERKALIBRERING (INTER =DS= 2256: BESTEMMELSE AF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS).

Varsling af interkalibrering

Interkalibreringen af parameteren Clostridium perfringens i jernsulfitagar blev gennemført i uge 15, 1986. Undersøgelsen var varslet ved brev fra Miljøstyrelsen af 18. marts, i denne forbindelse blev laboratorierne endvidere tildelt kodenumre. I samme uge 12 blev vejledning og fælles basissubstrat til jernsulfitagaren udsendt til laboratorierne. Der blev udsendt tørsubstrat af følgende sammensætning:

Fælles basissubstrat

- peptone - Oxoid - code L 37
- kødekstrakt - Merck-art 3979
- agar-agar - Struers

til fremstilling af 2 ltr. færdigt substrat.

Af praktiske grunde blev natriumsulfit- og ammoniumferrosulfatsalte til fremstilling af 10 % natriumsulfitopløsning og 5 % ammoniumferrosulfatopløsning ikke fremsendt. Laboratorierne har således alene anvendt egne reagenser i undersøgelsen.

49 deltagere

I interkalibreringen deltog 39 levnedsmiddelkontrollenheder, 6 STP-autoriserede laboratorier og 4 laboratorier med særlig laboratoriefunktion. Koden for de 6 simulerede recipientprøver blev

Koden for testprøver

- Niveau I : prøve 1 = prøve 6
- Niveau II : prøve 2 = prøve 4
- Niveau III : prøve 3 = prøve 5

Prøverne var endvidere fremstillet således, at indholdet af Clostridium perfringens i prøvepar 1 = 6 var dobbelt så stort som i prøvepar 2 = 4. Endvidere var indholdet af Clostridium perfringens i prøvepar 1 = 6 10 gange så stort som i prøvepar 3 = 5.

Testkultur

Som testkultur udvalgte én Clostridium perfringens-stamme, der blev isoleret fra en spildevandsprøve. Stammen udviste gennem flere måneders dyrkning i fly-

dende og faste substrater meget stabile egenskaber såvel kintalsmæssigt som ved de biokemiske undersøgelser. Den pågældende stamme viste sig endvidere kintalsmæssigt stabil efter opbevaring i indtil 8 døgn ved temperaturer i området 0 - 5°C.

#### Homogenitet

Homogeniteten i analysematerialets kimindhold blev bekræftet løbende forud for og under selve interkalibreringen. I eksemplerne 1, 2 og 3, side 26, er homogeniteten illustreret med analyseresultater for de 3 niveauer, opnået på 3 forskellige analysedage.

#### Modtagelse af interkalibreringsmaterialet

Laboratorierne modtog analyseprøverne den 09. april om formiddagen. For at laboratoriums vedkommende var der forsinkelser således at materialet først nåede frem den pågældende dags aften og analyseringen blev derfor gennemført den følgende formiddag.

### 3. RESULTATER.

#### Indrapportering

Laboratoriernes analyseresultater skulle være Miljøstyrelsen i hænde senest den 16. april. Den forholdsvise korte frist blev valgt, fordi resultaterne af analysen for *Clostridium perfringens* fremkommer allerede inden for ét døgn inkubation.

Hovedparten af laboratorierne indrapporterede rettidigt, men først den 23. april var samtlige resultater modtaget. I den mellemliggende periode blev de aktuelle laboratorier telefonisk rykket for svar.

Ligesom ved de foregående interkalibreringer har der været nogle særlige forhold omkring indrapportering der kan illustreres i følgende punkter:

- enkelte laboratorier sender resultaterne til forkert adresse,
- enkelte laboratorier meddeler forsinkelser, fordi resultaterne er "forsvundet i systemet",
- enkelte laboratorier respekterer ikke deres egen anonymitet, idet de fremsender resultaterne påført underskrift.

#### Supplerende spørgeskema

Efter at samtlige resultater var modtaget i Miljøstyrelsen fremsendtes den 07. maj, til alle laboratorierne, til foreløbig orientering, samtlige ubehandlede resultater på ét oversigtsskema. Samtidigt fremsendtes et supplerende spørgeskema, der skulle besvares senest den 14. maj, begrundelsen følger i afsnit 3-4-5, side 7.

#### Enkelte afbud

I forbindelse med at laboratorierne modtog kodenummer vejledning og basissubstrat reagerede et par af laboratorierne, i det de meddelte, at de ikke ønskede at deltage i interkalibreringen begrundet med manglende rutine (eller autorisation) til =DS= 2256-metoden. Miljøstyrelsen har indtil videre valgt at tage situationen til efterretning, men vil fremlægge forholdene og principperne for et styringsgruppemøde for de mikrobiologiske vandinterkalibreringer.

Yderligere har en række laboratorier meddelt enten som bemærkning på skemaerne eller ved telefonisk henvendelse, at man har ingen eller meget lidt erfaring og ruti-

ne i metoden til bestemmelse af Clostridium perfringens i jernsulfitagar. Med denne baggrund måtte man forvente, at resultaterne ville blive præget af stor spredning eller usikkerhed.

En oversigt over laboratoriernes primære bemærkninger er samlet i oversigten, bilag 11, side 25.

Supplerende spørgeskema fremsendes

Efter at interkalibreringen var afviklet fremgik det, ved gennemlæsning af laboratoriernes bemærkninger og enkelte telefonsamtaler, at en række laboratorier ikke har fulgt forskriftens anvisninger med hensyn til blanding af prøvemateriale og substrat og endvidere var der tydeligvis tvivl om, hvilke/hvor mange fortyndinger der skal indgå i beregning af kimtallene.

Det blev endvidere klart, at nogle laboratorier afkøler de podede glas i vandbad, med henblik på størkning, forud for påhældning af dæklag.

For at få et fuldstændigt oplysningsmateriale omkring disse punkter, valgte Miljøstyrelsen, at udsende et supplerende spørgeskema til samtlige laboratorier.

Der blev stillet følgende detailspørgsmål i spørgeskemaundersøgelsen:

- A I hvilken rækkefølge er 1. prøve materiale 2. fortyndingsvæske 3 substrat blandet ? anfør rækkefølge
- B Foretages der afkøling af de podede glas i vandbad før påhældning af dæklag ? svar ja eller nej.
- C Har laboratoriet påhældt dæklag ? svar ja eller nej.

De indkomne svar viste, at laboratorierne til spørgsmål A grupperer sig i 3 hovedgrupper :

- 18 laboratorier anvendte rækkefølgen: prøvemateriale, fortyndingsvæske og til sidst substrat.
- 17 laboratorier anvendte rækkefølgen: fortyndingsvæske, prøvemateriale og derefter substrat.
- 12 laboratorier (9, 21, 23, 24, 25, 27, 28, 30, 31, 33, 44, 52) har ophældt substrat først og derefter



tilblandet prøvematerialet og til sidst tilsat fortyndingsvæske. Sidstnævnte rækkefølge er angivet i standardbladet.

Laboratorium 42 undlod at tilsætte fortyndingsvæske og laboratorium nr. 7 anvendte skiftevis rækkefølgen substrat, prøvemateriale, fortyndingsvæske og fortyndingsvæske, substrat og prøvemateriale. 2 laboratorier blandede endvidere i rækkefølgen: prøvemateriale, substrat, fortyndingsvæske.

Til spørgsmål B, (omkring afkøling af de podede glas til størkning forud for påhældning af dæklag):

- 35 laboratorier meddelte at de ikke afkøler i vandbad (6 - 10°C) men ved stuetemperatur,
- 14 laboratorier (2, 10, 11, 13, 17, 26, 31, 32, 35, 36, 38, 41, 45, 48) har afkølet i vandbad.

Til spørgsmål C har alle laboratorier anført, at dæklag er påhældt. Et laboratorium (nr. 28) anvendte som dæklag parafin i stedet for substrat.

#### Substrat

Af laboratoriernes bemærkninger til størrelse og udseende af kolonier fremgik, at mange har registreret en tydelig forskel ved sammenligning i de to substrater. Enkelte laboratorier har endvidere umiddelbart efter afviklingen af interkalibreringen henvendt sig til Miljø- og levnedsmiddelkontrollenheden for at få oplysninger om sammensætning og fabrikat af det fælles tilsendte basissubstrat. Laboratorierne er således blevet meget opmærksomme på substratforholdene, og har erkendt en række problemer og forskelle.

#### Reagenser

2 laboratorier (3 og 29) har meddelt at de anvender ferricitrat, kaliumpermanganat og natriumsulfit istedet for forskriftens anviste: Natriumsulfit og ammoniumferrosulfat. Forholdet synes ikke at have haft speciel / afgørende indflydelse på resultaternes størrelse.

#### pH

Indstilling af pH i jernsulfitagaren har voldt problemer hos laboratorium 49, hvis resultater som følge heraf helt udgår af de statistiske beregninger. Vanskeligheder ved pH-justering viser sig yderligere

hos 3 laboratorier. Det ene laboratorium (nr.7) opnår ét outlier-resultat, se senere.

Korrektion af fejl

Forud for den statistiske behandling af resultaterne for denne 5.interkalibrering, blev der i lighed med de foregående interkalibreringer foretaget en gennemgang af resultater og tællerresultater, for at afgøre om resultaterne evt. var belastet af regnefejl, afrundingsfejl m.v.

I denne forbindelse blev der foretaget følgende korrektioner:

- afrunding til 2 betydende cifre hos 6 laboratorier (19, 35, 38, 43, 45, 52),
- rettelser af småregnefejl eller misforståelser hos 2 laboratorier (25, 41),
- endvidere er der taget stilling til at benytte ét sæt resultater for laboratorium 32 (beregnet ved totaltællingstallet gange volumen).

Det skal bemærkes, at rettelser af fejl m.v. ikke medførte at resultater fik betegnelsen outlier.

Resultater udgår

Et resultat udgår af beregningsmaterialet for laboratorium 24 og 41's vedkommende på grund af totalsværtning. Et sæt resultatet angivet ved "> 100" udgår ligeledes (laboratorium 1).

Resultaterne for laboratorium 26 er bibeholdt og indgår i beregningsmaterialet, skønt der kun er udført enkeltbestemmelse.

Middelkimtallet

Herefter forelå datasæt fra 48 laboratorier og den statistiske bearbejdning er gennemført i overensstemmelse med DS/ISO 5725. Disse data er samlet i tabel 1, bilag 1, side 15. Af oversigten fremgår endvidere middelkimtallet og standardafvigelse. Middelkimtallene holder indbyrdes de fremstillede kimniveauer (10:5:1), og middelkimtallene er lidt lavere i tilsendt end i eget substrat.

Outliertest

Indledningsvis er testen for eventuelle outlier's udført i form af Cochran's maximum - varianstest på log-transformerede resultater. Log-transformeringen er gennemført for at sikre, at forudsætningen for datamaterialets normalfordeling er opfyldt. Ved outliertesten blev laboratorium 7, 20, 30 og 39 outlier på mindst ét af prøveparrene 1=6, 2=4 eller 3=5, i enten eget eller tilsendt substrat.

Resultaterne af outliertesten er vist i tabel 2, bilag 2, side 16.

Repetierbarhed

De beregnede værdier for repeterbarhed er for alle 3 niveauer vedkommende lig med middelkimtallet, eller en anelse mindre end middelkimtallet. Til sammenligning

kan anføres, at ved interkalibrering af pladespredningsmetoder er repeterbarheden fundet at udgøre ca. 50 % af middeltallet eller derunder.

Repeterbarhedsværdierne er angivet i tabel 3, bilag 2, side 16 .

#### Reproducerbarhed

Reproducerbarhedsværdierne er store. Disse udgør i alle 3 niveauer det dobbelte af middeltallet. Dette giver sig især udslag ved, at forskellen mellem laboratoriernes resultater er stor. Reproducerbarheden er som ventet mindre ved analyse i fælles substrat end i eget substrat.

Reproducerbarhedsværdierne er angivet i tabel 3, bilag 2, side 16 .

#### Grafiske illustrationer

Resultaterne fra de 48 laboratorier der indgik i beregning af repeterbarhed og reproducerbarhed er grafisk illustreret for de enkelte prøvepar i eget og tilsendt substrat i bilag 3-8, side 17-22.

#### Valg af fortynding til kolonitælling

Med hensyn til beregning af indholdet af Clostridium perfringens i analyse materialet var der ikke enighed om, hvordan dette skal gøres. I metodeforskriften anføres, at metoden er anvendelig på prøver med 10-15 Clostridium perfringens pr. ml, men der gives ikke anvisninger på hvorledes man bør gøre, hvor der er mulighed for at tælle i flere fortyndinger, eller om man bør tage hensyn til samtlige kolonier eller ej.

Ved gennemgang af kintalsresultaterne og tællerresultaterne blev det klart, at laboratorierne anvender forskellig procedure til beregning af de resulterende kintal, og laboratorierne grupperer sig således:

- 13 laboratorier benytter en beregningsmetode hvor tællerresultatet fra 2 (eller flere) fortyndinger indgår.
- 30 laboratorier beregner kintallet udfra tælling af én fortynding.
- 5 laboratorier kunne ikke rubriceres.

For at få en vurdering af hvilken indflydelse de forskellige beregningsprincipper har, er der gennemført en beregning af middeltal for de identiske prøvepar i eget og tilsendt substrat. Således at de 13 laboratoriers resultater fremkommet ved beregningsmetoden, hvor flere fortyndinger indgår, er sammenlignet med de øvrige 30 laboratoriers resultater fremkommet som gennemsnit af kolonitællinger i én fortynding.

Det viste sig, at resultaterne beregnet udfra én fortynding er lavere end resultaterne fremkommet ved sammenvejning af flere fortyndinger. Forskellen er ca. 10 %, men det skal tages i betragtning, at der ikke er lige mange laboratorier i grupperne og at repeterbarhedsværdierne er lig med middeltallet. Resultaterne er grafisk illustreret i bilag 9 , side 23 . Middelværdierne fremgår af tabel 4 , side 23 .

#### Køling i vandbad

Beregnes middeltal i ens prøver i henholdsvis eget og tilsendt substrat for de 14 laboratorier, der angiver at anvende køling af podede glas, til sammenligning med tilsvarende resultater for de resterende laboratorier ses, at køling i vandbad giver lavere resultater (10-20 % lavere). Igen skal bemærkes, at grupperne er af forskellig størrelse og at repeterbarhedsværdien er stor. Resultaterne er grafisk illustreret i bilag 10 , side 24 . Middeltallene findes samlet i tabel 4 , side 23 .

#### Blandingsprocedure

Som omtalt side 7 grupperede laboratorierne sig i 3 grupper med hensyn til blanding af analysemateriale, substrat og fortyndingsvæske. Ved at sammenholde middeltal i ens prøver i henholdsvis eget og tilsendt substrat for de 12 laboratorier der i detaljer har benyttet forskriften i standarden, med middeltallet fra de øvrige laboratorier, der afveg fra DS-proceduren på ét eller flere punkter, kan primært konstateres, at resultaterne er lidt lavere i tilsendt end i eget og endvidere ses tendens til, at resultaterne efter blandingsproceduren i forskriften giver lavere resultater i tilsendt end i eget substrat. Resultaterne er grafisk illustreret i bilag 10 , side 24 . Middeltallene findes i tabel 4 , side 23 .

#### 4. KONKLUSIONER.

##### Vedrørende metode

Interkalibrering af *Clostridium perfringens* parameteren i de 6 simulerede recipientprøver viste, at =DS= 2256 indeholder fortolkningsproblemer og uklarheder med hensyn til

- proceduren for beregning af det resulterende kimaltal,
- proceduren for blanding af prøvemateriale og substrat.

Undersøgelsen har videre vist, at *Clostridium perfringens*, under visse (substrat ?) betingelser vokser frem med kolonier mindre end 1 mm i diameter, hvorfor forskriftens bemærkning om, at kolonier med diameter over 1 mm skal medregnes, bør revideres.

##### Vedrørende substrat

De anvendte substrater synes kvalitetsmæssigt uensartede. Flere laboratorier har meddelt, at de agter at ændre på forholdene, fordi kolonierne i eget substrat var meget små eller voksede langsomt. Generelt blev middeltal opnået ved analyse i det fælles substrat fundet lidt lavere end ved analyse i laboratoriernes egne.

I ét tilfælde har indstillingen af pH betydet, at et laboratorium opnår helt afvigende resultater i såvel eget som tilsendt substrat.

Da udvikling af sværtning, (på grund af reduktion af sulfid til sulfid), er en løbende proces, bør podede glas observeres så tidligt som muligt den følgende dag.

##### Vedrørende laboratoriefunktion

Det fremgår klart, at de 49 laboratoriers praktiske håndtering af =DS= 2256-metoden er forskellig og at rutinen i analysen er meget varierende. Konsekvenserne er derfor som ventet, at resultaterne er præget af store variationer, gældende både indenfor det enkelte laboratorium og i mellem laboratorierne indbyrdes.

Disse forhold viser sig konkret ved, at såvel repeterbarhedsværdien som reproducerbarhedsværdien er store og størst i egne substrater. Repeterbarhedsværdien (et udtryk for laboratoriernes præcision på metoden) er forventet stor, fordi udvikling af sværtning betyder, at laboratorierne skal tælle i glas med forholdsvis få

kolonier.

De supplerende statistiske beregninger, foretaget efter gruppering af laboratorierne efter deres forskellige procedurer (for beregning af kimtal, for blandingsprocedur samt køling af podede glas), belyser nogle forhold, der har indflydelse på analyseresultaternes størrelse og kvalitet.

## Bilagsfortegnelse.

	SIDE
Bilag 1 : Tabel 1. Oversigt over data der indgår i beregning af repeterbarhed og reproducerbarhed .....	15
Bilag 2 : Tabel 2. I tabellen er anført i laboratorier med outlier-resultater .....	16
Tabel 3. Tabellen viser middeltal, repeterbarhed og reproducerbarhed .....	16
Bilag 3-8 : 12 grafiske illustrationer af 48 laboratoriers resultater ved analyse af prøverne 1-6, 2-4 og 3-5 i eget og tilsendt substrat .....	17
Bilag 9 : I tabel 4 er middelmåltal anført i relation til forskellig laboratorieprocedure .....	23
Grafisk illustration af effekt ved tælling i én eller to fortyndinger .....	23
Bilag 10 : Grafisk illustration af effekt ved køling i vandbad .....	24
Grafisk illustration af effekt af forskellig blandingsprocedure .....	24
Bilag 11 : Oversigt over de primære bemærkninger fra laboratorierne .....	25
Bilag 12-14 : I eksempel 1, 2 og 3 illustreres testprøvernes homogenitet .....	26
Bilag 15 : Søjlediagram, der viser temperaturregistrering i testprøverne .....	29
Bilag 16 : Deltagende laboratorier i Inter =DS= 2256 .....	30
Bilag 17 : Udsendt vejledning og rapporteringsskema .....	31
Bilag 18 : Referenceliste .....	37

Tablel 1 : Kim pr. ml af Clostridium perfringens. I tabellen er vist de laboratorieresultater, der indgår i beregning af reperterbarhed og reproducerbarhed. Resultaterne er korrigerede for beregnings- og afrundingsfejl. I tabellen er outlier-resultater og manglende -resultater markeret.

## Kim pr. ml af Clostridium perfringens

Substrat	eget		tilsendt		eget		tilsendt		eget		tilsendt	
	1	6	1	6	2	4	2	4	3	5	3	5
Lab nr 1	8000	3000	5000	2000	2900	2700	2000	1700	640	mangler	500	130
2	3000	700	3000	1400	1400	320	1900	1100	95	30	65	170
3	5000	3200	11000	3000	3000	3000	2300	2800	550	450	640	500
4	8000	9500	9500	6500	3000	2500	1000	1500	350	1000	650	850
5	6000	8500	4000	8000	3000	3600	2000	3000	650	750	400	500
6	7100	5700	6600	4300	1600	1200	3100	3200	690	440	470	530
7	1300	3600	1500	5000	550	1200			76	300	450	440
8	Ikke deltaget				outlier							
9	3000	2000	2600	1500	2400	1500	2000	700	270	230	300	200
10	5800	5100	3500	2800	2500	2400	1300	2000	360	510	340	260
11	6000	3000	6500	6000	4500	3500	3000	5000	350	700	750	250
12	14000	6000	11000	9000	5500	4000	3500	3800	1300	500	600	350
13	2600	2800	1000	2600	400	1200	500	1200	190	340	160	200
14	8000	6600	7100	7400	3500	4600	3900	4200	680	690	800	820
15	2500	6000	2200	4500	3500	6000	3300	3600	650	650	500	400
16	1200	350	1700	600	95	200	85	140	100	330	55	110
17	9400	8600	4100	3700	4500	4200	2200	2700	690	660	330	320
18	4200	4400	5300	4400	3000	2400	2700	2600	440	480	500	500
19	2000	3500	1800	2800	1000	2000	1200	1500	300	300	240	53
20	500	600	outlier		140	150	outlier		30	40	120	110
21	4500	9500	3100	3200	2000	3600	2000	3200	180	220	160	240
22	3600	4300	3000	3900	2400	2800	1700	2300	410	500	160	190
23	5700	6200	4800	5000	4300	3200	3100	2400	800	700	560	430
24	5500	mangler	4000	4500	1700	2000	2200	2500	600	300	500	500
25	7300	12000	9500	10000	5000	3600	6500	4600	1000	1000	820	1200
26	13000	9000	11000	14000	3000	8000	4200	3300	900	900	800	1500
27	4000	6500	4700	6500	2000	5000	2400	3000	750	600	700	440
28	5400	4800	3600	4200	3100	3200	2400	1800	490	410	210	270
29	5000	2100	3700	4800	3500	1600	2900	3700	300	500	470	510
30	800	1600	1300	2500	500	200	850	1300	outlier			150
31	2500	2500	1100	1800	2000	1900	350	490	230	230	160	55
32	2200	700	1700	750	1900	1200	1900	1100	95	130	91	130
33	8000	13000	3000	2400	4300	4400	2300	2400	800	550	120	140
34	9000	11000	9000	7500	3000	5000	5500	3500	800	750	650	750
35	5200	3800	2000	2000	2900	1700	1400	1300	210	500	230	220
36	2500	2200	3100	2400	2500	1700	1700	1200	280	220	210	130
37	4000	10000	10000	4100	1300	1500	2500	2500	300	300	600	950
38	3800	4500	5500	5000	1900	2200	2500	2900	450	1100	850	500
39	250	1000	2500	5000	outlier				1100	1600	70	110
40	7100	6400	7700	5200	3000	2300	3500	2600	580	480	530	490
41	7000	mangler	6000	6000	3700	1500	3200	2000	700	700	500	500
42	3300	3400	2700	2500	2500	3300	2300	2100	420	430	300	200
43	10000	8000	2100	7200	2500	7000	2500	3500	800	800	900	620
44	6500	5000	3800	3700	1700	2700	1300	1900	450	450	200	220
45	3500	3000	5000	4000	2500	2200	3500	2500	200	650	700	1000
46	Ikke deltaget											
47	5400	6100	4700	2700	2600	2400	1700	2000	550	470	330	290
48	4700	3800	3600	3200	2100	1800	1900	1600	280	360	280	350
49	Fejl i analyseproceduren											
50	4500	4000	3100	3300	2500	2400	2900	2700	350	400	600	250
51	Ikke deltaget											
52	5500	5500	1900	1600	4000	3400	2100	2400	620	840	290	330
Middelværdi	5200	5100	4600	4400	2600	2700	2400	2400	470	500	420	400
Std.afvig.	3000	3100	2900	2600	1200	1700	1200	1100	280	250	240	310



Tabel 2 : Cochran's outliertest.

Kim/ml Clostridium perfringens bedømt udfra værdierne efter logaritmetransformation. Laboratorierne 7, 20, 30 og 39 har outlier-resultater.

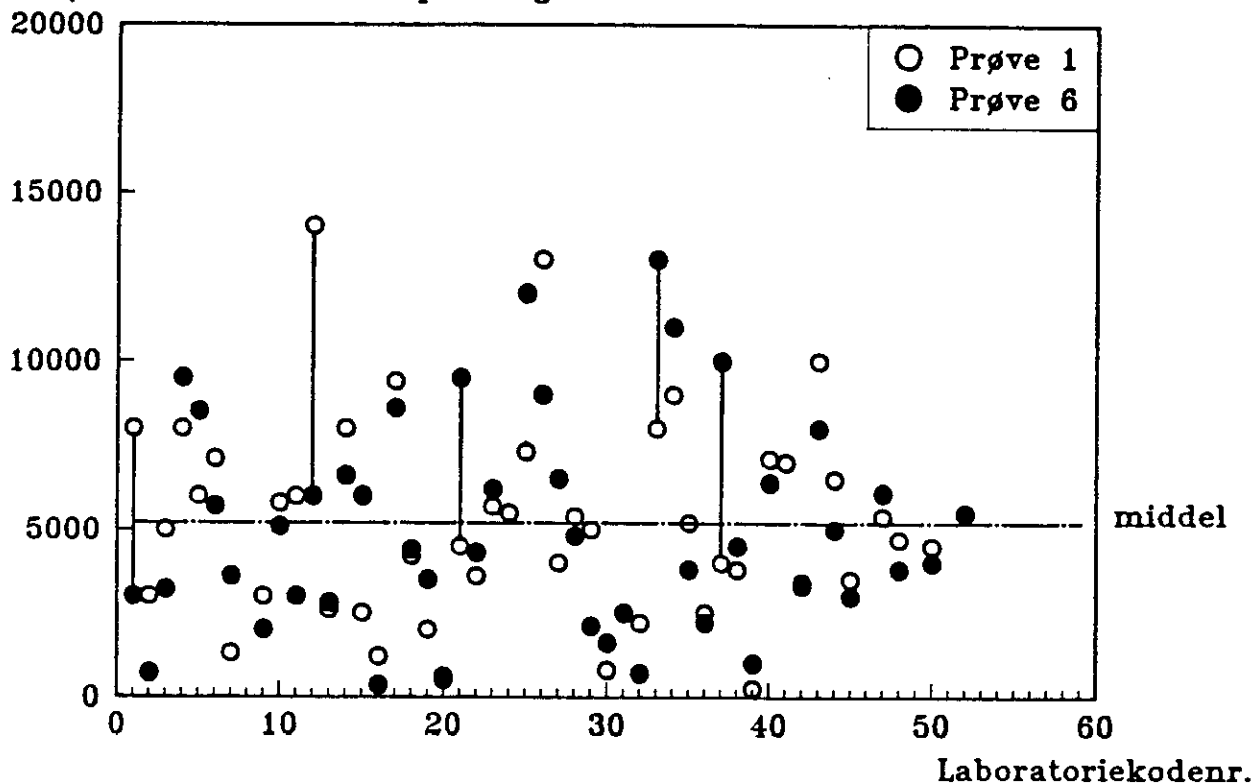
Prøvepar substrat	1-6 eget	1-6 tilsendt	2-4 eget	2-4 tilsendt	3-5 eget	3-5 tilsendt
Outlier	-	20	39	7 20	30	-
Straggler	-	-	-	-	-	-

Tabel 3 : Repeterbarhed og reproducerbarhed for kim/ml af Clostridium perfringens. Idet laboratoriet med outlier-status efter logaritmetransformation er udskudt i de respektive prøvepar.

Prøvepar substrat	1-6 eget	1-6 tilsendt	2-4 eget	2-4 tilsendt	3-5 eget	3-5 tilsendt
Middeltal	5.100	4.500	2.700	2.400	480	410
Repeterbarhed	5.100	4.500	2.800	1.600	460	400
Reproducerbarhed	8.700	7.700	4.200	3.200	750	780

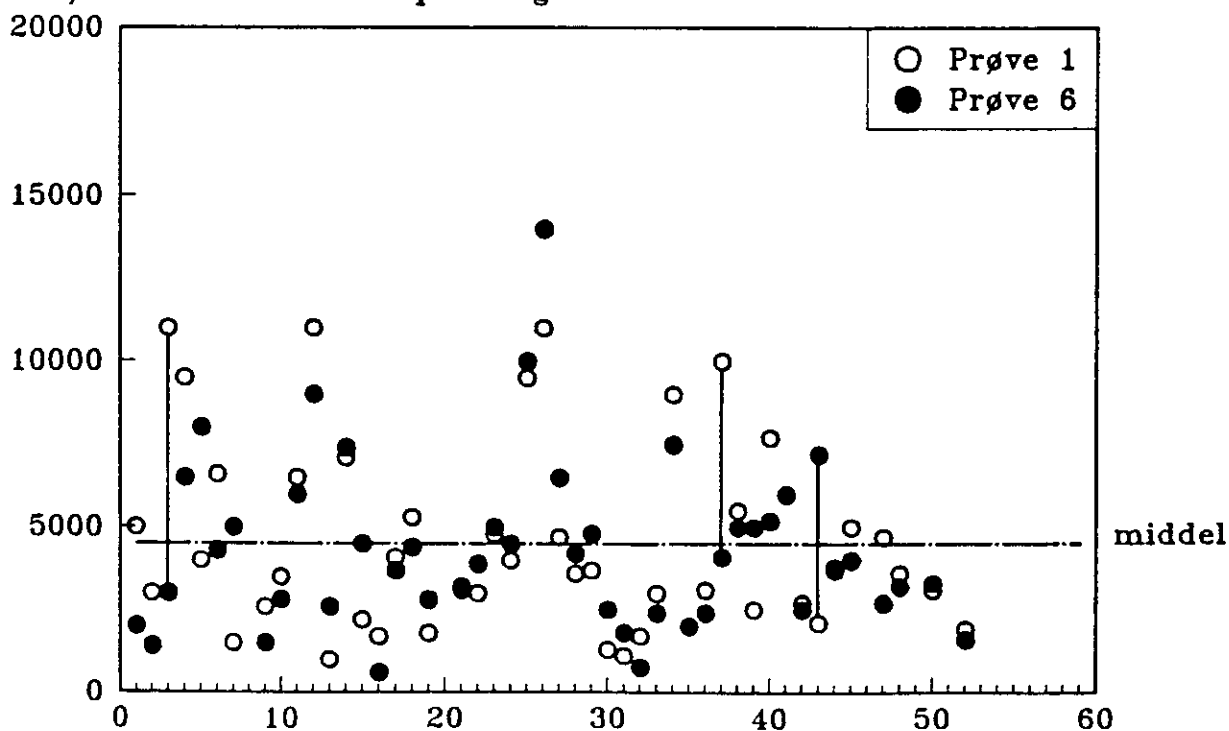
### 48 laboratoriers bestemmelse af Clostridium perfringens i prøve 1 og 6 i eget substrat

Kim/ml af Clostridium perfringens



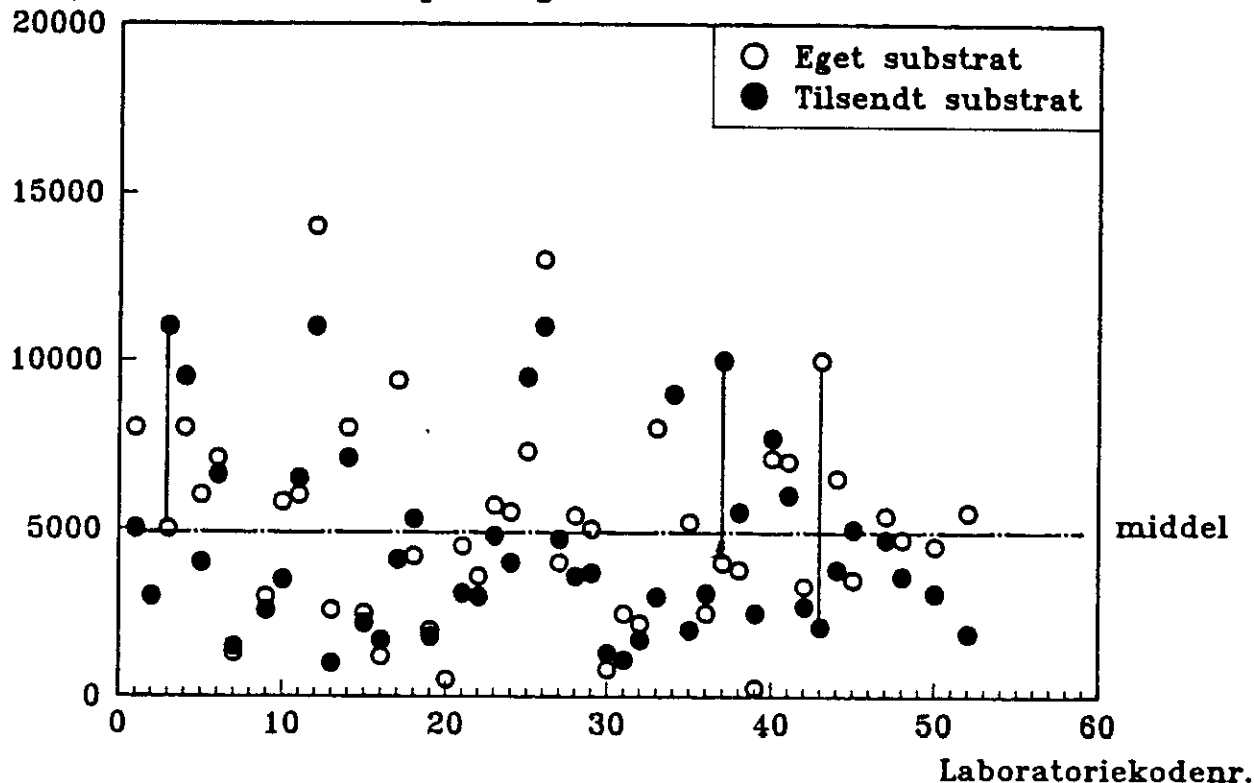
### 48 laboratoriers bestemmelse af Clostridium perfringens i prøve 1 og 6 i tilsendt substrat

Kim/ml af Clostridium perfringens



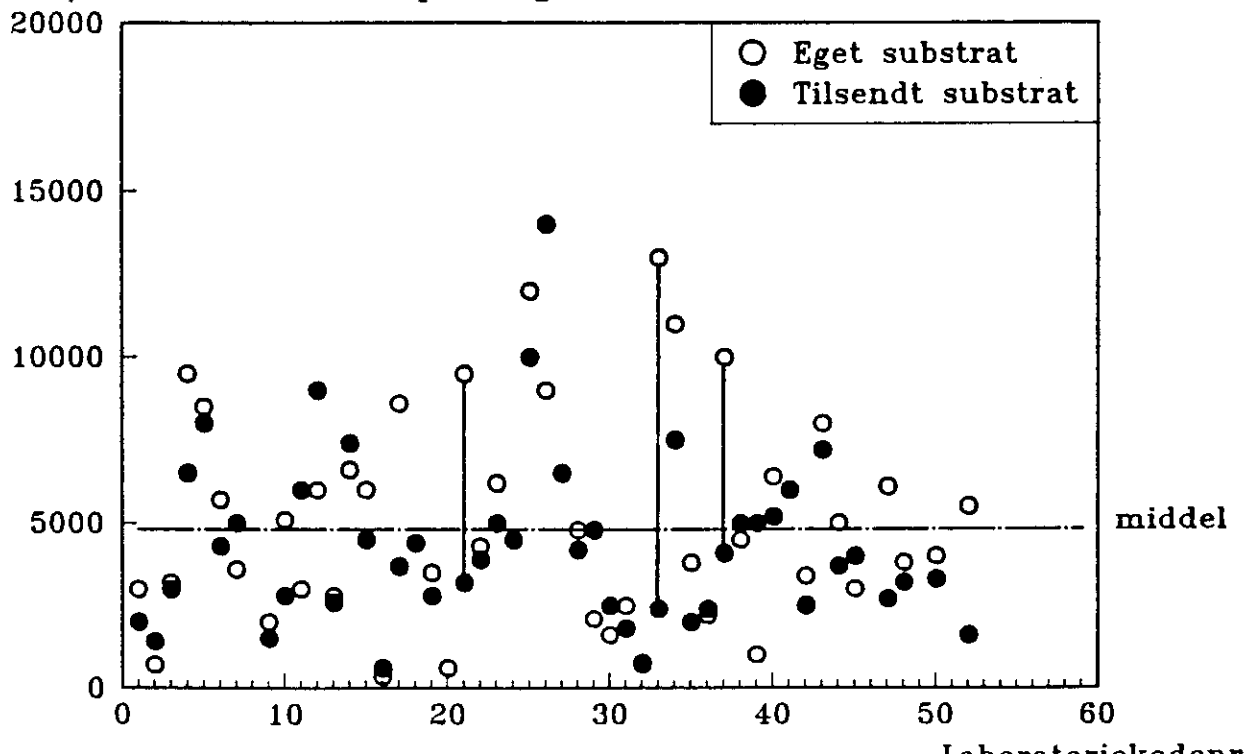
## 48 laboratoriers bestemmelse af Clostridium perfringens i prøve 1 i eget og tilsendt substrat

Kim/ml af Clostridium perfringens



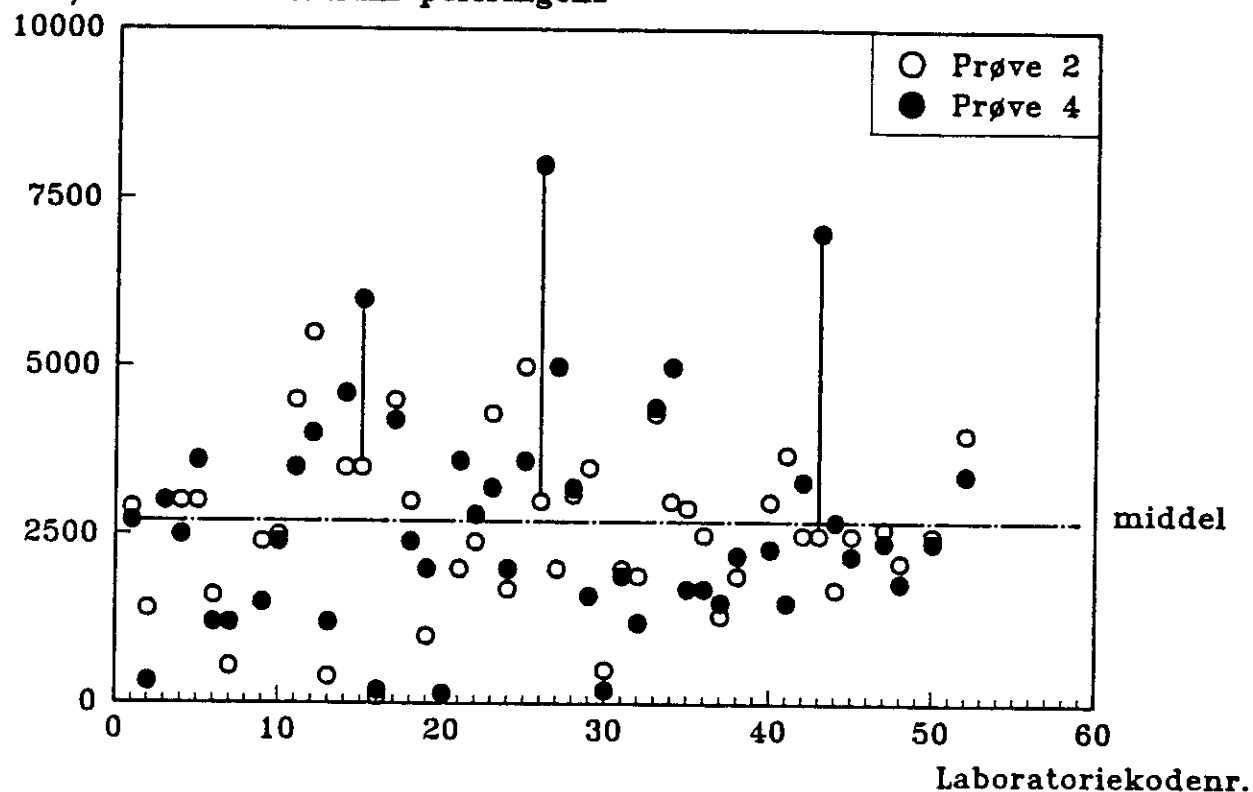
## 48 laboratoriers bestemmelse af Clostridium perfringens i prøve 6 i eget og tilsendt substrat

Kim/ml af Clostridium perfringens



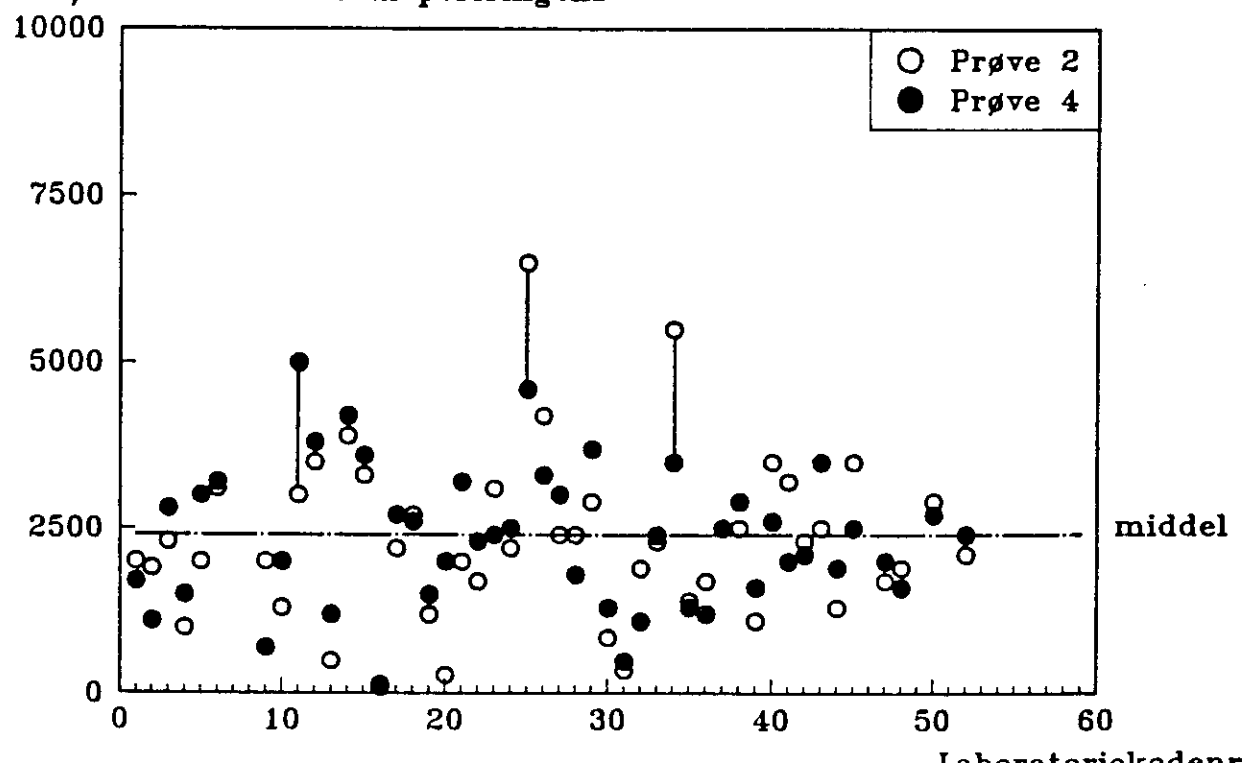
## 48 laboratoriers bestemmelse af Clostridium perfringens i prøve 2 og 4 i eget substrat

Kim/ml af Clostridium perfringens



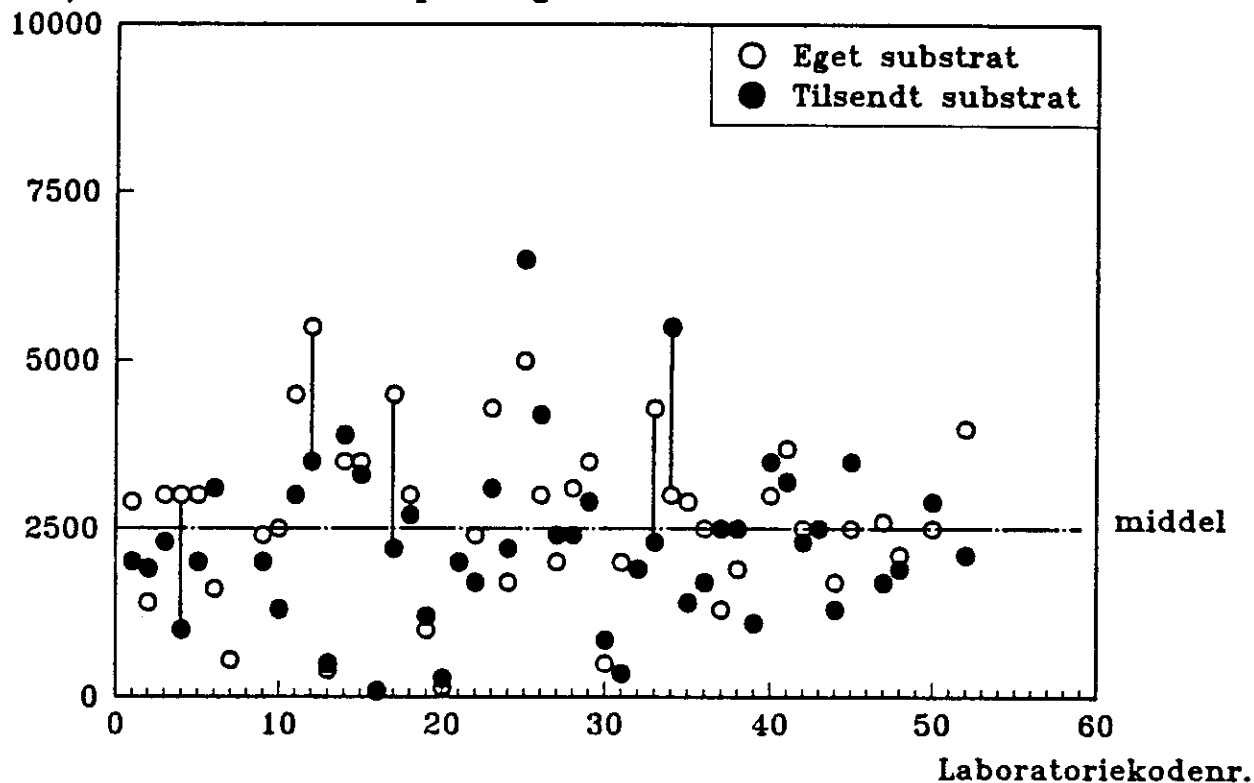
## 48 laboratoriers bestemmelse af Clostridium perfringens i prøve 2 og 4 i tilsendt substrat

Kim/ml af Clostridium perfringens



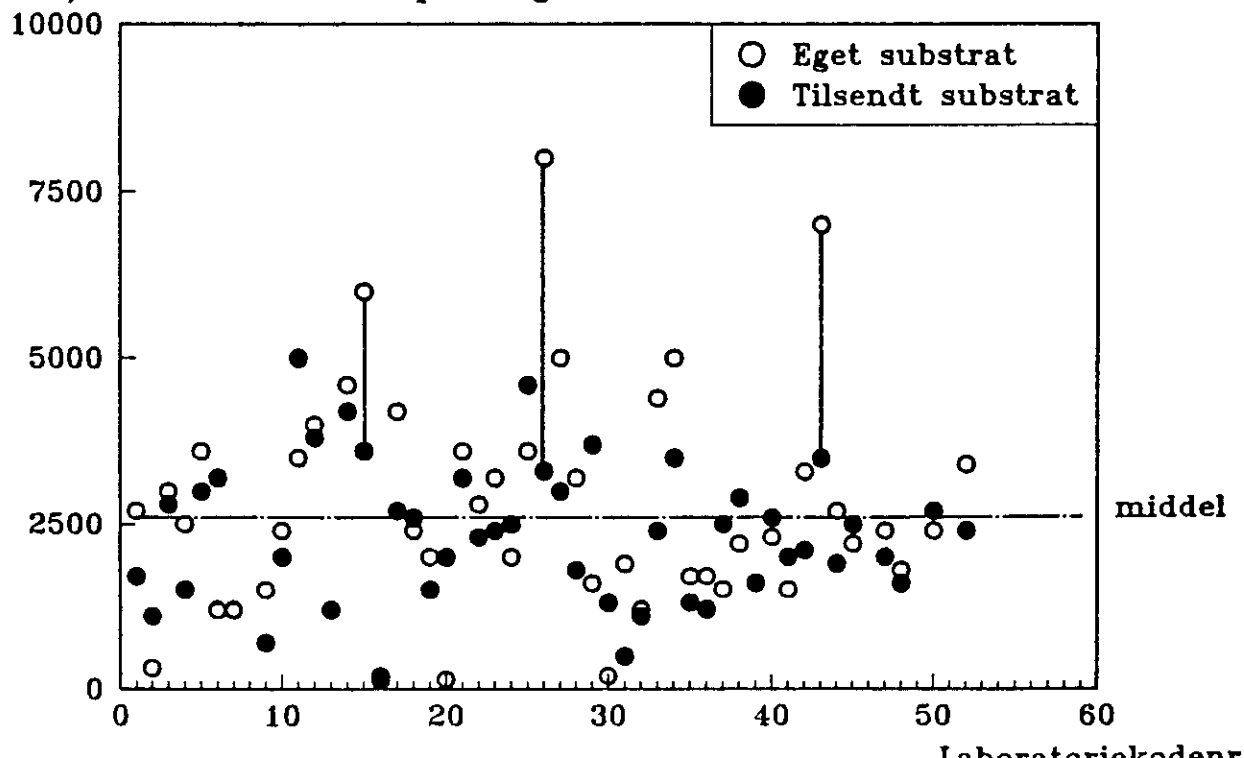
## 48 laboratoriers bestemmelse af Clostridium perfringens i prøve 2 i eget og tilsendt substrat

Kim/ml af Clostridium perfringens



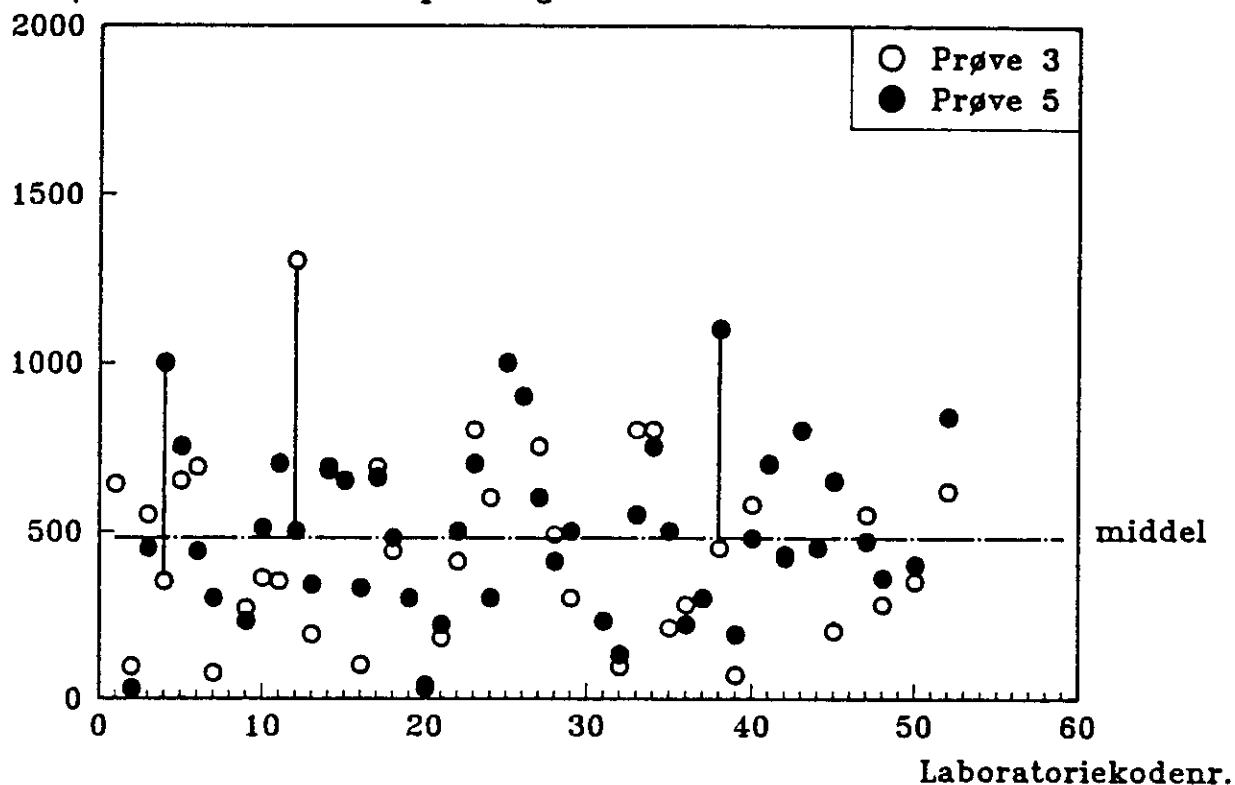
## 48 laboratoriers bestemmelse af Clostridium perfringens i prøve 4 i eget og tilsendt substrat

Kim/ml af Clostridium perfringens



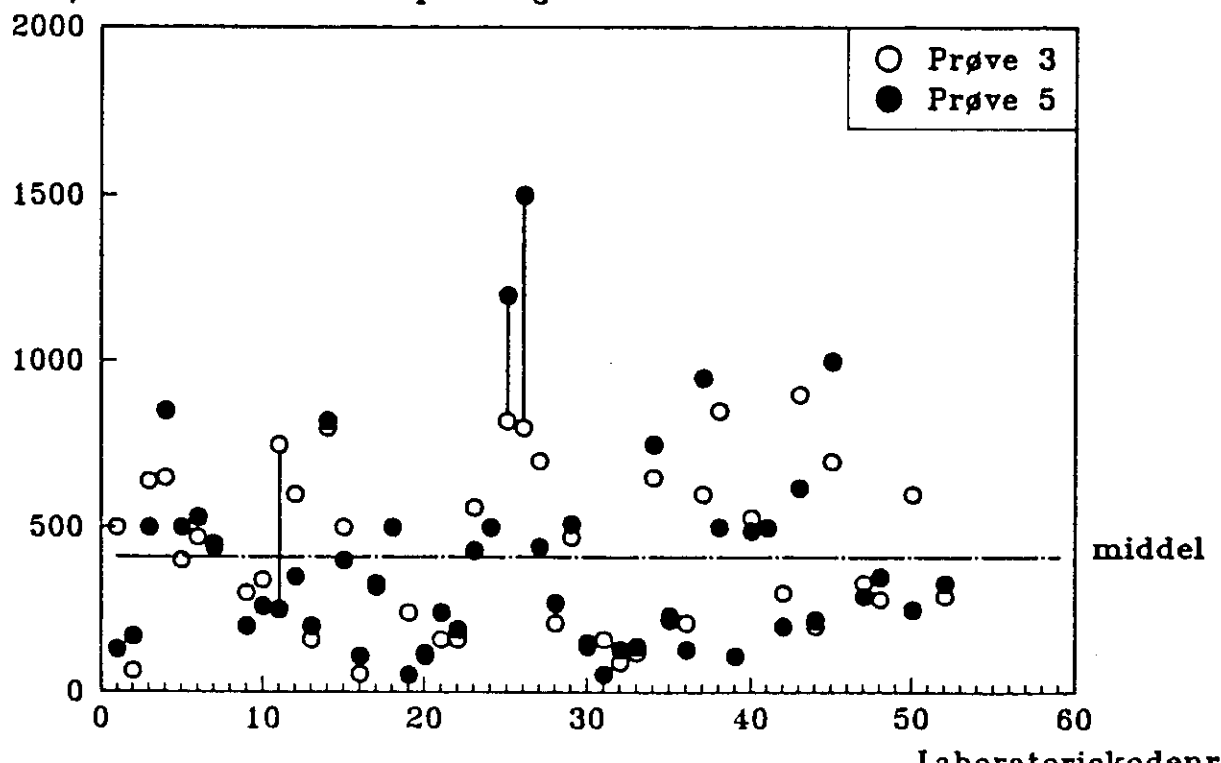
## 48 laboratoriers bestemmelse af Clostridium perfringens i prøve 3 og 5 i eget substrat

Kim/ml af Clostridium perfringens



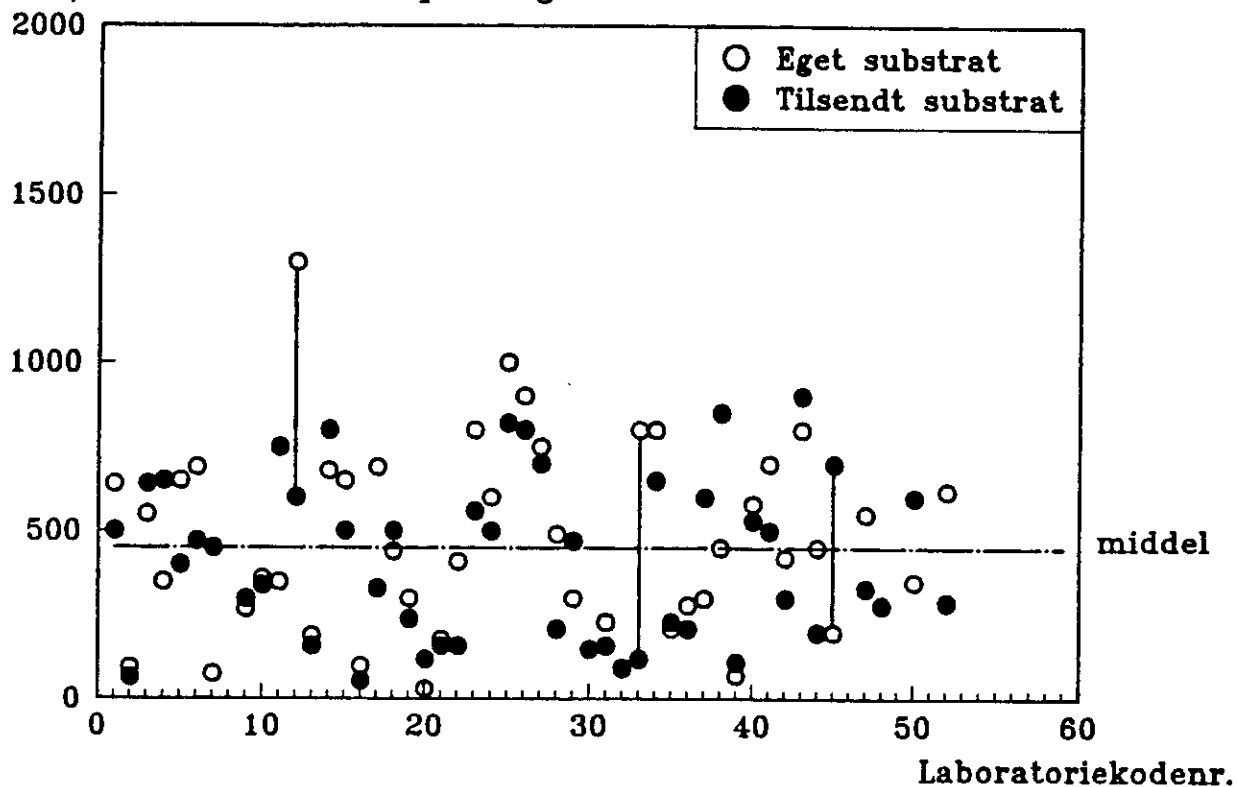
## 48 laboratoriers bestemmelse af Clostridium perfringens i prøve 3 og 5 i tilsendt substrat

Kim/ml af Clostridium perfringens



## 48 laboratoriers bestemmelse af Clostridium perfringens i prøve 3 i eget og tilsendt substrat

Kim/ml af Clostridium perfringens



## 48 laboratoriers bestemmelse af Clostridium perfringens i prøve 5 i eget og tilsendt substrat

Kim/ml af Clostridium perfringens

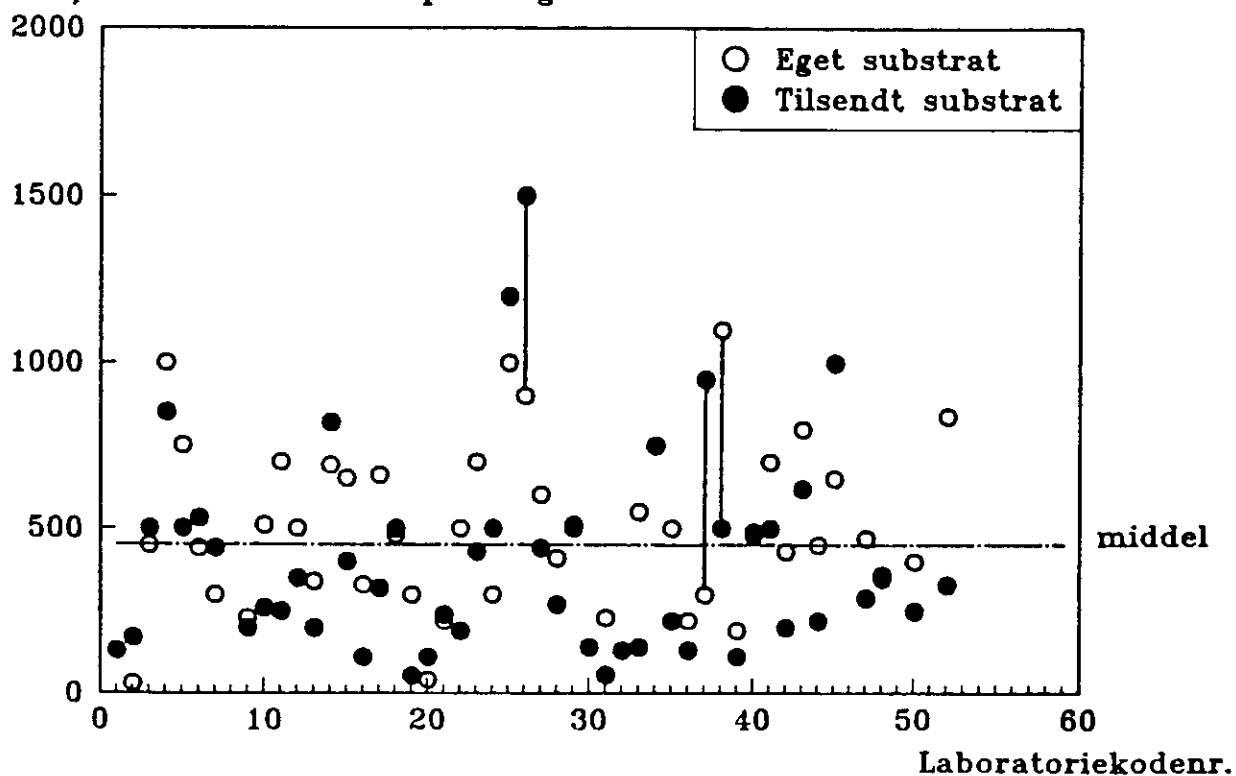
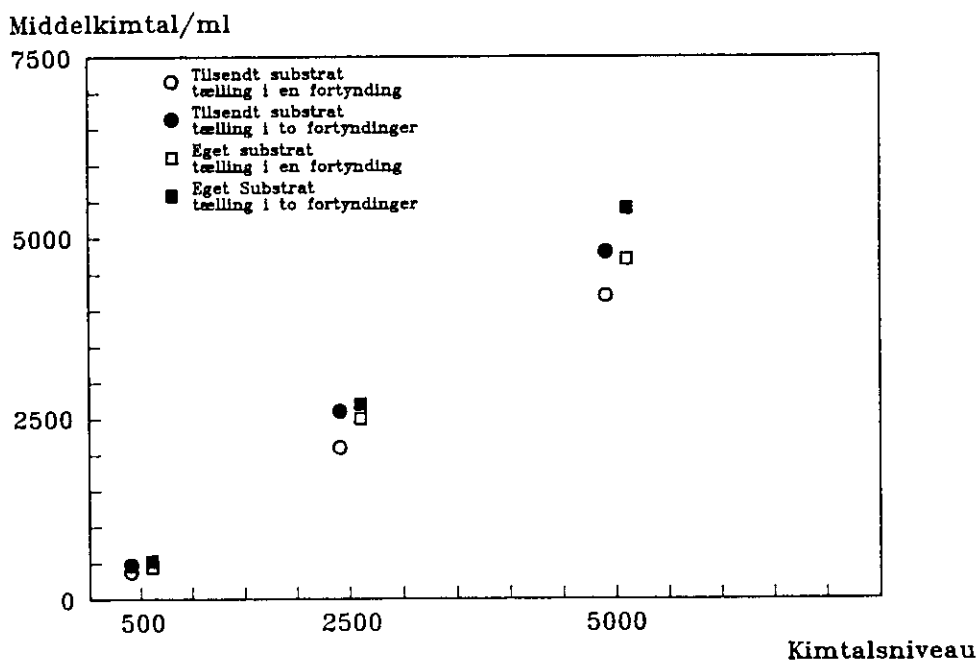


Table 4 : Indflydelse af laboratorieprocedure på middelkimtal pr. ml af Clostridium perfringens.

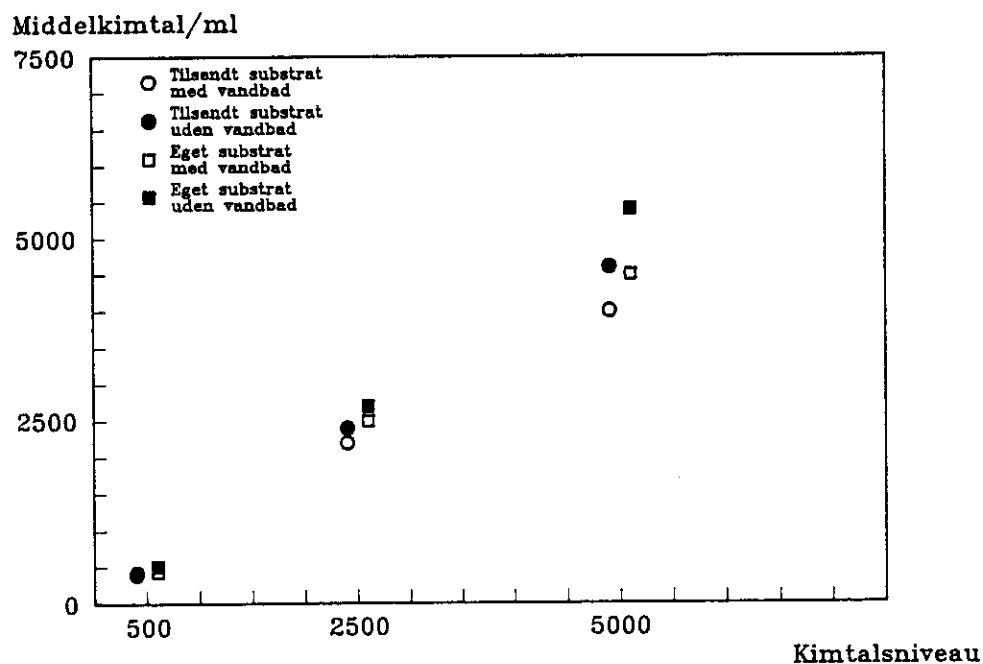
Substrat	Niveau I		Niveau II		Niveau III	
	eget kim/ml	tilsendt kim/ml	eget kim/ml	tilsendt kim/ml	eget kim/ml	tilsendt kim/ml
Procedure						
Benyttet vandbad	430	390	2.500	2.100	4.400	4.000
Resten	510	420	2.700	2.500	5.400	4.600
Fulgt =DS= 2256	530	350	2.800	2.300	5.500	3.800
Resten	470	430	2.600	2.400	4.900	4.700
Talt en fortynding	440	370	2.500	2.100	4.700	4.200
Talt to fortyndinger	510	470	2.700	2.600	5.400	4.800

### Effekt ved tælling i en eller to fortyndinger på middelkimtal af Clostridium perfringens

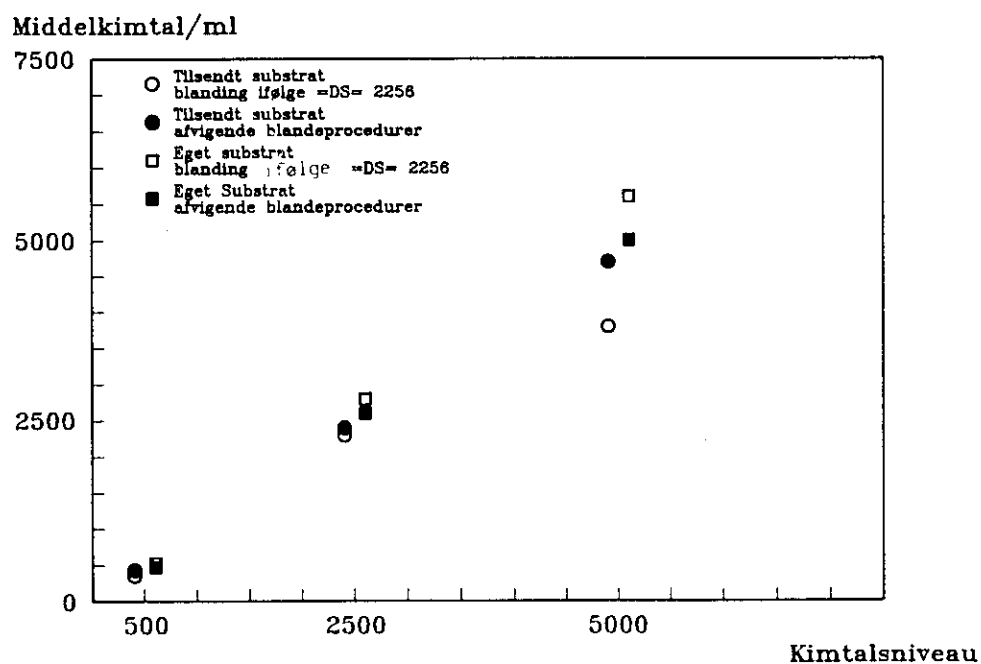




## Effekt ved afkøling i vandbad på middelkimtal af Clostridium perfringens



## Effekt af blandeprocedure på middelkimtal af Clostridium perfringens



De primært indkomne bemærkninger fra laboratorierne til substratforhold, pH-forhold, kolonistørrelse/koloniaflæsning, aflæsningstidspunkt m.v. er gengivet i fuldt eller reduceret omfang i nedenstående oversigt:

Lab.nr.	Kommentarer:
2	I prøve 3-5-6 registreres små kolonier i begge substrater. Kolonierne er verificeret på BA under anaerobe forhold.
3	I tilsendt substrat konstateres uldne kolonier, i eget konstateres luftudvikling. Substrat og reagenser har anden sammensætning end foreskrevet i =DS= 2256 (ferri citrat, kaliumpermanganat, natriumsulfit).
4	I eget substrat konstateres små og langsomt voksende kolonier.
6	Kolonier i tilsendt substrat er alle $> 1$ mm, dette gælder ikke i eget substrat.
7	Problemer med pH-justeringer i tilsendt substrat. Registrerer langsom vækst i eget substrat.
9	Problemer med pH-indstilling og opløsning af tilsendt substrat.
15	I tilsendt substrat ses mange kolonier $< 1$ mm. Bemærker: Ingen rutine i analysen.
17	50 % af kolonierne i eget substrat var omkring 1 mm i diameter.
20	Aflæsning af kolonier i tilsendt var lettest. Kolonier $< 1$ mm i eget substrat er ikke medtalt. Kommentar til inkubationstiden.
21	Sværtning i tilsendt substrat var mindre udtalt. Kommenterer inkubationstiden.
27	Kommenterer inkubationstiden (20:24 timer).
28	Bemærkning om pH-justering i tilsendt substrat. Har registreret et problem med størkning af substratet.
29	Sammensætning af reagenser er helt forskellig fra forskriftens (ferricitrat, kaliumpermanganat, natriumsulfit).
30	Laboratoriet gennemførte analysen et døgn senere end de øvrige laboratorier.
47	Kolonierne var tydeligst i eget substrat.

EKSEMPEL 1: HOMOGENITETEN I NIVEAU I (PRØVEPAR 1-6) ER BELYST I NEDENSTÅENDE EKSEMPEL, 120 INTERKALIBRERINGSPRØVER ER AFPIPPETERET OG HERAF ER 10 PRØVER UDTAGET I INTERVALRÆKKEFØLGE, INDHOLDET AF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS ER BESTEMT I JERNSULFITAGAR EFTER  $\text{DS} = 225^{\circ}$ , 95 % KONFIDENSGRÆNSERNE ER ANGIVET VED  $\bar{x} + 2s$  OG  $\bar{x} - 2s$ .

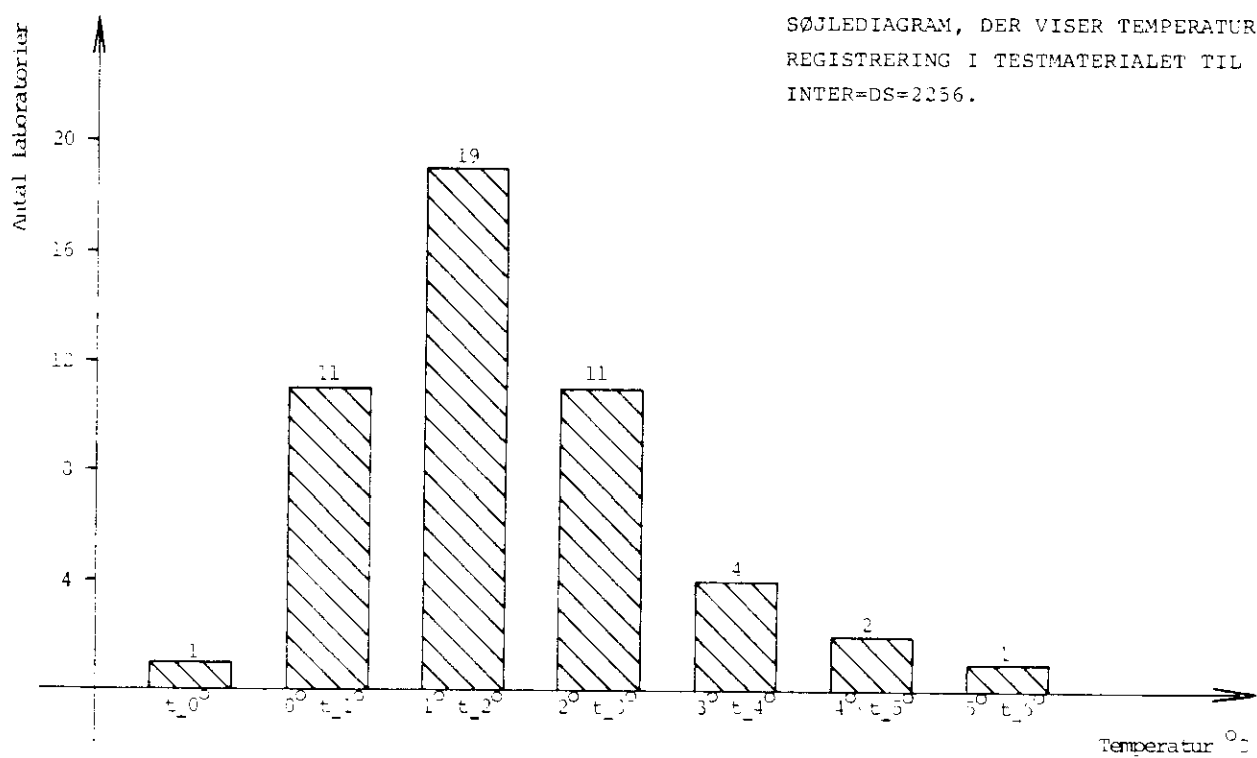
$\bar{x}/\text{ML}$	
2.400	
1.100	
1.400	
1.400	
2.300	
2.400	
1.900	
2.200	
1.600	
1.900	
<hr/>	
$\bar{x}$ :	1.900
s:	470
$\bar{x} + 2s$ :	2.800
$\bar{x} - 2s$ :	960

EKSEMPEL 2: HOMOGENITETEN I NIVEAU II (PRØVEPAR 2-4)  
 ER BELYST I NEDENSTÅENDE EKSEMPEL, 120  
 INTERKALIBRERINGSPRØVER ER AFFIPPETERET  
 OG HERAF ER 10 PRØVER UDTAGET I INTERVAL-  
 RÆKKEFØLGE. INDHOLDET AF CLOSTRIDIUM PER-  
 FRINGENS ER BESTEMT I JERN-SULFITAGAR EFTER  
 $=DS= 2256$ .  
 95 % KONFIDENSGRÆNSERNE ER ANGIVET VED  
 $\bar{x} + 2s$  OG  $\bar{x} - 2s$ .

<u><math>\bar{x}/ML</math></u>	
1.100	
1.000	
1.400	
1.100	
1.500	
1.700	
1.700	
1.100	
1.200	
750	
<hr/>	
$\bar{x}$ : 1.300	
s: 310	
$\bar{x} + 2s$ : 1.900	
$\bar{x} - 2s$ : 630	

EKSEMPEL 3: HOMOGENITETEN I NIVEAU III (PRØVEPAR 3-5)  
 ER BELYST I NEDENSTÅENDE EKSEMPEL. 120 IN-  
 TERKALIBRERINGSPRØVER ER AFFIPPETERET OG  
 HERAF ER 10 PRØVER UDTAGET I INTERVALRÆK-  
 KEFØLGE. INDHOLDET AF CLOSTRIDIUM PERFRIN-  
 GENS ER BESTEMT I JERN-SULFITAGAR EFTER  
 $\bar{D}_S = 2256$ ,  
 95 %-KONFIDENSGRÆNSERNE ER ANGIVET VED  
 $\bar{x} + 2s$  OG  $\bar{x} - 2s$ .

<u><math>\bar{x}/ML</math></u>	
180	
250	
210	
180	
180	
230	
180	
200	
190	
130	
<hr/>	
$\bar{x}$ :	190
$s$ :	33
$\bar{x} + 2s$ :	260
$\bar{x} - 2s$ :	130



DELTAGENDE LABORATORIER.

Samlet oversigt over de 50 deltagende laboratorier. Rækkefølgen er helt uafhængig af laboratoriernes kodenummerering.

Miljø- og levnedsmiddelkontrollen, Esbjerg	Bornholm Levnedsmiddelkontrollenhed, Rønne
Levnedsmiddelkontrollenheden i Fredericia	Levnedsmiddellaboratoriet, Sakskøbing
Stadsdyrlægens Kontor-Frederiksberg, København F.	Levnedsmiddelkontrollen I/S, Skovlunde
Nordøstvendssels Levnedsmiddel- og Miljøkontrol, Frederikshavn	Miljø- og levnedsmiddelkontrollenheden i Slagelse
Levnedsmiddelkontrollen I/S, Frederiksborg Amt Vest, Frederikssund	Levnedsmiddelkontrollenheden i Silkeborg
Levnedsmiddelkontrollen, Miljøhygiejnisk laboratorium, Haderslev	Struer Levnedsmiddelkontrol, Struer
Miljø- og levnedsmiddelkontrollen i Helsingør	Levnedsmiddelkontrollenheden i Svendborg
Levnedsmiddelkontrollen i Herning	Levnedsmiddelkontrollen i Sønderborg
Levnedsmiddelkontrollen i Hillerød	Miljø- og levnedsmiddelkontrollenheden i Thisted
Hjørring kommunale levnedsmiddelkontrol, Hjørring	Hygiejnelaboratoriet i Tønder
Miljø- og levnedsmiddelkontrollenheden i Holbæk	Miljø- og levnedsmiddelkontrollen i Varde
Miljø- og levnedsmiddelkontrollenheden i Holstebro	Levnedsmiddelkontrollen i Vejle
Miljøhygiejnisk Forvaltning i Horsens	Viborg Levnedsmiddelkontrollenhed, Viborg
Levnedsmiddelkontrollen i København	Hygiejnisk Forvaltning, laboratoriet for miljø og levnedsmidler, Aalborg Øst
Fælleskommunal levnedsmiddelkontrol, København Amt Vest, Glostrup	Levnedsmiddel- og miljøtilsynet, Århus N.
Miljø- og levnedsmiddelkontrollen Køge Bugt I/S, Køge	Det kommunale laboratorium i Åbenrå
Miljø- og levnedsmiddelkontrollen i Nykøbing F.	A/S Dansk Gærings-Industri Glostrup
Miljø- og levnedsmiddellaboratoriet, Næstved	Alfred Jørgensens Gæringsfysiologisk laboratorium A/S, København V.
Miljø- og levnedsmiddelkontrollenheden i Odense	Dansk Handels- og Landbrugslaboratorium, Odense
Randers Levnedsmiddelkontrol, Randers	Vandkvalitetsinstituttet, Hørsholm
Miljøhygiejnisk laboratorium, Levnedsmiddelkontrollen, Ribe	Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, København V.
Miljø- og levnedsmiddelkontrollenheden i Ringsted	Steins Laboratorium, Albertslund
Levnedsmiddelkontrollen i Roskilde I/S, Roskilde	Veterinærdirektoratets Laboratorium, Ringsted

A/S Qvist's Laboratoriu,  
Risskov

Århus Universitet, Hygiejnisk Institut  
Århus C.

FARRE-FOOD,  
Give

Hygiejnisk Institut,  
Tårshavn.

MILJØ- OG LEVNEDSMIDDELKONTROLHEDEN  
ODENSE

Mikrobiologisk laboratorium.

LILLE TORNBJERG VEJ 24 . 5220 ODENSE SØ  
TLF. (09) 13 13 72

DEN 20. marts 1986.

J. NR.: 7.5-1/84-88.

REF.: A-BC/LB

Attention:Til de deltagende laboratorier i miljøstyrelsens interkalibrering: MSI-5/86.

Inter =DS= 2256.

Formålet med denne interkalibrering er at bestemme laboratoriernes præcision på undersøgelsesmetoden: =DS= 2256, udtrykt ved repeterbarhed ( $r$ ) og reproducerbarhed ( $R$ ), jfr. ISO 5725.

Det er hensigten, efter behandling af interkalibreringsresultaterne i styringsgruppen, at miljøstyrelsen kontakter de laboratorier, der finder afvigende resultater.

Miljøstyrelsen har i skrivelse af 18.03.1986, j.nr. 84-20413-8, som ansvarshavende meddelt gennemførelsen af en mikrobiologisk interkalibrering i uge 15.

Det tilhørende analysemateriale: 6 simulerede prøver af overfladevand, mærket: 1, 2, 3, 4, 5 og 6, samt ét glas mærket: Temperaturregistrering/rød tapestrimmel, vil i overensstemmelse hermed blive udsendt den 08.04.86.

Forsendelsen er adresseret til det enkelte laboratoriums kontaktperson som ekspres og rekommanderet forsendelse.

Idet det må tilstræbes at give ensartede betingelser for alle deltagende laboratorier og dermed muligheden for at opnå optimale resultater, skal følgende forhold iagttages:



Modtagelsesforhold:

Termocontaineren kan forventes modtaget på samtlige laboratorier den 09.04.1986. Tidspunktet for modtagelsen noteres.

Containeren åbnes på laboratoriet såvidt muligt kl. 10.00 og herefter påbegyndes analysearbejdet.

Der foretages straks en temperaturmåling med termometer ( $\pm 0,1^\circ$ 's nøjagtighed). Termometret skal for ud være nedkølet til området 0-5°C. Temperaturen måles kun i vandprøven mærket: Temperaturregistrering (rød tape) og denne prøve anvendes ikke til analyse.

Termoelementerne fjernes fra kassen og umiddelbart herefter anbringes isvand omkring prøverne.

Temperaturen i lokalet noteres.

Substrat:

Tørsubstrat, (basisagar), mærket: Inter =DS= 2256 af samme batch-nummer, fremsendes hermed til samtlige laboratorier.

Opløs dåsens indhold af tørsubstrat i 2 ltr. glasdestileret vand, opvarm til komplet opløsning, indstil pH: 7,2 - 7,4. Opløsningen steriliseres ved 121°C i 15 min. Natriumsulfitopløsning, 10 %, og ammoniumferrosulfatopløsning, 5 %, fremstilles og tilsættes helt i overensstemmelse med standarden.

Undersøgelsen gennemføres ved dyrkning i laboratoriets eget substrat samt parallelt hermed i det tilsendte substrat.

Analysen:

Af hensyn til bearbejdning af talmaterialet, der fremkommer i forbindelse med nærværende interkalibrering, er det væsentligt:

- at vandprøverne opbevares ved 0-5°C fra kl. 10.00, anbring derfor isvand i den grå transportkasse omkring vandprøverne indtil den sidste prøve tages i brug.
- at fremstilling af fortyndinger, udsæd af prøverne samt kintælling udføres af én og samme laborant, nøje i overensstemmelse med =DS= 2256 med anvendelse af kortest mulig analysetid,
- at der i samtlige vandprøver, mærket 1, 2, 3, 4, 5 og 6, bestemmes indhold af Clostridium perfringens, jfr. =DS= 2256 med laboratoriets eget substrat samt det tilsendte substrat. Fra samtlige 6 prøver fremstilles én fortyndingsrække til og med  $10^{-4}$ . Der foretages udsæd fra den ufortyndede prøve samt fra samtlige fortyndinger. Prøverne analyseres i den rækkefølge de er nummererede.

Analysematerialet vedlægges kopi af nærværende skrivelse og rapporteringsskema.

Registrering af analysedata:

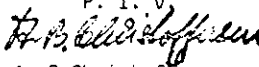
Tæl de sorte kolonier i glas med vækst og angiv i skemaet tællerestultaterne for hvert glas (jfr. eksempel). Angiv endvidere kintallet pr. ml med 2 betydende cifre.

Såfremt enkelte rubrikker ikke kan udfyldes, bedes årsag hertil anført under bemærkninger. Endvidere skal evt. afvigelser fra ovennævnte procedure eller fra forskrift i =DS= 2256 noteres af hensyn til senere vurdering af resultaterne.

Skemaerne returneres i udfyldt stand til miljøstyrelsen, att. Holger Pedersen, Hygiejnisk-kemisk/6. kontor, Strandgade 29, 1401 København K, senest den 16.04.1986.

HUSK AT ANFØRE KODENUMMER på alle skemaer, jfr. miljøstyrelsens skrivelse af 18.03.1986. I tilfælde af uregelmæssig forsendelse eller tvivl vedrørende analyseforhold rettes henvendelse enten til miljøstyrelsen, tlf.nr. (01) 57 83 10, lok. 2413 eller til Miljø- og levnedsmiddelkontrollenheden i Odense, tlf.nr. (09) 13 13 72, lok 5613.

Termocontainer samt kølelegemer returneres i papkassen til Miljø- og levnedsmiddelkontrollenheden i Odense.

P. i. v.  
  
A.-B.Christoffersen

./.  
2 bilag

INTER =DS= 2256.

Kodenummer: \_\_\_\_\_

CHECKLISTE TIL ONSDAG DEN 09. APRIL 1986.

<u>FORARBEJDE:</u>	
Eget substrat, basisagar, er tilvirket dato:	_____
Sammensætning af eget substrat:	_____
Tilsendt substrat er tilvirket dato:	_____
Natriumsulfitopløsning er fremstillet dato:	_____ kl.: _____
Ammoniumferrosulfatopløsning er fremstillet	_____
	dato: _____ kl.: _____
Termometer nedkøles til 0-5°C.	
<u>MODTAGELSE:</u>	
Container er modtaget, dato:	_____ kl.: _____
Container er åbnet dato :	_____ kl.: _____
Temperaturen i rør med rød tape måles. (max. 10 sek.) _____	
Anbring isvand i grå kasse omkring prøverne.	
Temperatur i lokalet: _____	
Starttidspunkt kl. 10.00.	
<u>UNDERSØGELSEN:</u>	
Der fremstilles én fortyndingsrække fra prøve 1. Der udsås fra ufortyndet prøve til og med $10^{-4}$ , i såvel eget som tilsendt substrat.	
Samme procedure for resterende prøver.	
Dyrkningstemperatur: _____	

BEMÆRKNINGER: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Returneres senest den 16. april 1986.

Miljøstyrelsen  
 att. dyrlæge Holger Pedersen  
 Hygiejnisk-kemisk/6. kontor  
 Strandgade 29  
 1401 København K.

INGEN UNDERSKRIFT  
 HUSK KODENUMMER.

INTER -DS- 2256

BILAG 2.

KODENUMMER \_\_\_\_\_

Prøve nr.	KIMTAL VED 48°C I EGET SUBSTRAT						KIMTAL VED 48°C I TILSENDT SUBSTRAT					
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	Kimtallet/ml	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	Kimtallet/ml
Eksempel	total sværet	8	< 1	< 1	< 1	100/ml	total sværet	8	< 1	< 1	< 1	100/ml
	total sværet	12	< 1	< 1	< 1		total sværet	12	< 1	< 1	< 1	
Prøve 1												
Prøve 2												
Prøve 3												
Prøve 4												
Prøve 5												
Prøve 6												

REFERENCER.

Buchanan, R. E. & N. E. Gibbons, edv.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The William & Wilkins Compagny. Baltimore 1984.

DS/ISO 5725: Precision of testmethods. Determination of repetability and reproducibility by inter - laboratory tests, 1981.

Dansk Standard =DS= 2256: Vandundersøgelse.  
Bestemmelse af Clostridium perfringens.

Miljøstyrelsen: Mikrobiologiske interkalibreringer på miljø- og vandanalyser 1984.  
Februar 1985.

Miljøstyrelsen: Miljøstyrelsens 2. mikrobiologiske interkalibrering.  
Bestemmelse af coliforme bakterier og termotolerante coliforme bakterier. Fortyndingsmetoden (MPN-metoden). Inter =DS= 2255.  
December 1984.

Miljøstyrelsen: Miljøstyrelsens 3. mikrobiologiske interkalibrering.  
Bestemmelse af kimal og fluorescerende kim ved 21°C i King's agar B. Juni 1985.

Miljøstyrelsen: Miljøstyrelsens 4. mikrobiologiske interkalibrering.  
Bestemmelse af aerobt kimal ved 21°C.  
Januar 1986.