

Arbejdsrapport fra Miljøstyrelsen

Nr. 33 1990

Miljøstyrelsens 5.
mikrobiologiske
metodeafprøvning

Miljøministeriet **Miljøstyrelsen**

Strandgade 29, 1401 København K, tlf. 31 57 83 10

B25

343.69

OK. 2

Arbejdsrapport fra Miljøstyrelsen, nr. 33/1990

Miljøstyrelsens
5. mikrobiologiske
metodeafprøvning

Miljø- og Levnedsmiddelkontrolenheden,
Odense

MILJØSTYRELSEN
BIBLIOTEKET
Strandgade 29
1401 København K

Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

INDHOLDSFORTEGNELSE

	SIDE
1. INDLEDNING	1
2. FORMÅL	3
3. GENNEMFØRELSE	4
4. RESULTATER	7
5. KONKLUSIONER	29
6. REFERENCER	32
7. BILAGSFORTEGNELSE	33

1. INDLEDNING.

Vandanalyser udgør en stor del af danske laboratoriers arbejde, og bl.a. af den grund har mange laboratorier fremført ønsket om, at anvende en analysemetode, der er simplere, mere nøjagtig og hurtigere at udføre end MPN-metoden efter DS 2255. Endvidere er der andre bakterier end den coliforme gruppe, som er i stand til at danne syre og luft i MacConkey bouillon ved 37°C, altså give samme reaktioner som coliforme bakterier.

På grundlag af ovenstående samt da membranfiltreringsmetoden er et hyppigt brugt europæisk alternativ til MPN-metoden, blev det besluttet, at afprøve og vurdere ISO/DIS 9308-1 og sammenligne resultaterne opnået efter anvendelse af denne forskrift med resultaterne af 10. interkalibrering udført efter DS 2255.

Via badevand er der mulighed for overførsel af smitsomme sygdomme, og da det ikke er muligt at undersøge badevandet for samtlige patogene mikroorganismer, har man valgt at basere kontrollen på anvendelse af indikatorbakterier. I saltvand anvendes termotolerante coliforme bakterier, og i ferskvand anvendes desuden coliforme bakterier som indikatorbakterier.

De fleste coliforme bakterier er vidt udbredt i jord og overfladevand og kan vokse heri, mens andre især *Escherichia coli* anses for at være specifikke tarmbakterier hos varmlodede dyr, incl. mennesker, og påvisning af *E. coli* i vand og sedimenter indicerer en frisk fækal forurening.

Påvisning af coliforme bakterier efter DS 2255 har imidlertid som tidligere nævnt den ulempe, at visse bakterier bl.a. nogle *Aeromonas* arter kan simulere coliforme bakterier, idet de er i stand til ved forgæring af laktose at danne syre og luft ved 37°C, men ikke ved 44°C. Imidlertid vil det ofte være relevant at påvise disse *Aeromonas* arter, da det drejer sig om potentiel patogene organismer, men i så fald bør man anvende en særskilt metode hertil. Ved undersøgelse efter DS 2255 sker der ofte en sammenblanding af *Aeromonas* arter og coliforme bakterier.

Aeromonas species er naturligt forekommende i ferskvandsmiljøer, og kan som følge heraf hyppigt isoleres fra drikkevand, såvel kloret som ikke kloret, overfladevand, levnedsmidler, jord og plantemateriale. *Aeromonas* species kan forårsage humane hudinfektioner og septikämier samt gastroenteriter, men kan desuden være årsag til stumme infektioner, hvilket bl.a. kan have betydning i levnedsmiddelindustrien.

Aeromonas tilhører familien Vibrionaceae og opdeles i to grupper:

Gruppe I Aeromonas salmonicida,

Gruppe II Aeromonas hydrophila,

Aeromonas sobria,

Aeromonas caviae.

Gruppe I er psykrotrof og ubevægelig, mens gruppe II er mesofil og bevægelig, og de tre arter i denne gruppe adskilles ved hjælp af biokemiske kriterier. Nogle Aeromonas species kan som tidligere nævnt ud fra laktose danne syre og luft ved 37°C , men ikke ved 44°C , og har derfor ringe betydning som indikatorer for fækal forurening, og de kan ikke betragtes som hørende til tarmfloraen. På den anden side er Aeromonas hydrophila den patogene bakterie, der hyppigst kan isoleres fra diarrépatienter, og må således betragtes som hørende til enteropatogenerne.

Med hensyn til yderligere litteratur om Aeromonas species henvises til referencelisten side 32.

2. FORMÅL MED 5. METODEAFPRØVNING.

Formålet med 5. metodeafprøvning er, som berørt i indledningen, at afprøve og vurdere ISO/DIS 9308-1 og sammenligne resultaterne opnået efter anvendelse af denne metode med resultaterne af 10. interkalibrering udført efter DS 2255. Endvidere ønskes det belyst, at DS 2255 medtager andre bakterier i definitionen af coliforme bakterier end coliforme bakterier. Da ISO/DIS 9308-1 anvender mange forskellige substrater, er det ligeledes ønskeligt bl.a. at påvise hvilket isolationssubstrat, der er det bedst egnede, da det ikke er givet at samtlige i ISO/DIS 9308-1 nævnte substrater er fundet ligeværdige ved ISO'ens tilblivelse.

3. GENNEMFØRELSE AF 5. METODEAFPRØVNING.

Miljøstyrelsen meddelte i skrivelse af 4. april 1990 gennemførelsen af 5. mikrobiologiske metodeafprøvning på vandprøver i uge 20, 1990. Tillige blev der givet kodenumre, og uofficiel dansk oversættelse af ISO/DIS 9308-1, tilmeldingsskema samt noter af marts 1990 var vedlagt skrivelsen.

Den 24. april 1990 fremsendtes vejledningen fra Referencelaboratoriet, Miljø- og Levnedsmiddelkontrolenheden i Odense, bilag 1. Endvidere fremsendtes 50 membranfiltre samt substratet Membran Lauryl sulfat Agar med tilhørende forskrift til brug i metodeafprøvningen.

Den 9. maj udsendtes telefax/brev med rettelse i forskriften til fremstilling af Membran Lauryl sulfat Agar, da fejl i forskriften blev konstateret på dette tidspunkt.

Den 14. maj 1990 blev analysematerialet afsendt fra Referencelaboratoriet som ekspres og rekommanderet forsendelse til forventet modtagelse på samtlige deltagende laboratorier den 15. maj 1990 inden kl. 10. Af bilag 2 fremgår hvilke laboratorier, der modtog analysematerialet udenfor den forventede tidsramme.

Ved denne metodeafprøvning anvendte laboratorierne til halvdelen af de i alt 48 filtreringer isolationssubstratet Membran Lauryl sulfat Agar tilsendt fra Referencelaboratoriet. Dette substrat blev sendt til samtlige deltagende laboratorier, og hver portion stammede fra samme batchnr. Endvidere afsendte Referencelaboratoriet membranfiltre (Gelman Sciences, Product No. 66068, Lot No. 9120901, 47 mm i diameter, hvide, rudeinddelte, porestørrelse 0,45 um, sterile) til alle deltagende laboratorier.

Laboratorierne blev desuden bedt om selv at vælge et af de øvrige isolationssubstrater til den anden halvdel af de 48 filtreringer. Endvidere blev laboratorierne bedt om at vælge Fosfat buffer opløsning som fortyndingsvæske, samt Laktose Pepton Vand og Lauryl Tryptose Mannitol Bouillon med Tryptofan som verifikationsmedier for henholdsvis coliforme bakterier og presumptive Escherichia coli.

Bemærkninger til anvendte substrater og reagenser fremgår af bilag 3, mens en samlet oversigt over anvendte substrater og reagenser findes på Referencelaboratoriet.

I metodeafprøvningen deltog 44 laboratorier. 37 levnedsmiddelkontrolenheder, 6 STP-autoriserede laboratorier og 1 laboratorium med særlig laboratoriefunktion, bilag 4.

Koncentraternes kodenumre og indhold.

Der udsendtes i alt 6 koncentrater, og af disse anvendtes 4, nemlig koncentraterne A,B,C og D både til interkalibreringen og til metodeafprøvningen, mens koncentraterne E og F udelukkende anvendtes til interkalibreringen. Alle blev sendt til samtlige deltagende laboratorier, og hvert koncentrat indeholdt 9 ml., der var fremstillet ved tilsætning af testkulturer til transportmediet. Koncentraterne blev fremsendt nedkølede.

Testkulturer.

1. Escherichia coli.
2. Enterobacter cloacae.
3. Aeromonas sobria.

Af karakteristika for disse testkulturer skal nævnes:

Escherichia coli danner syre og luft ud fra laktose ved 37°C og ved 44°C , og er indol positiv samt oxidase negativ.

Enterobacter cloacae danner syre og luft ud fra laktose ved 37°C , men ikke ved 44°C . Endvidere er den indol negativ og oxidase negativ. Vækstmaximum for Enterobacter cloacae er på Membran Lauryl sulfat Agar ca. $42,5^{\circ}\text{C}$, ligesom den i Laktose Pepton Vand producerer syre og luft ved $42,5^{\circ}\text{C}$. Syreproduktion finder desuden sted ved såvel 43°C som $43,5^{\circ}\text{C}$.

Aeromonas sobria danner syre og luft ud fra laktose ved 37°C , men ikke ved 44°C , og er indol positiv samt oxidase positiv. Den positive oxidase reaktion bruges til at adskille denne bakterie fra den coliforme gruppe af bakterier. Vækstmaximum for Aeromonas sobria er på Membran Lauryl sulfat Agar (LSA) ca. 41°C , idet den vokser og giver den for coliforme bakterier karakteristiske reaktion ved 41°C , men ikke ved $41,5^{\circ}\text{C}$. Fra $38,5^{\circ}\text{C}$ til 40°C sker der et gradvist fald i luftdannelsen i Laktose Pepton Vand, og ved $42,5^{\circ}\text{C}$ er der stadig syreproduktion, mens denne er ophørt ved 43°C .

De i denne metodeafprøvning 3 anvendte bakteriearter er afprøvet på samtlige isolationssubstrater, der er nævnt i ISO/DIS 9308-1. På alle substraterne, når undtages Endo substrat og LES Endo Agar ved 44°C og mFC substrat ved 37°C, viste samtlige kolonier den for coliforme bakterier typiske reaktion, beskrevet side 7 i ISO/DIS 9308-1. E. coli præsenterede sig på hvert substrat som den største koloni, dernæst E. cloacae, mens A. sobria var mindst.

Endo substrat og LES Endo Agar var som nævnt i ISO/DIS 9308-1 uegnede til brug ved 44°C, idet kolonierne var ukarakteristiske og meget mindre end på de øvrige substrater, der blev afprøvet samtidig, mens mFC var uegnet som substrat ved 37°C, idet kolonierne flød sammen.

Iøvrigt var der ikke nævneværdig forskel på substraterne m.h.t. det fremkomne kimtal, men alle 3 bakteriearter præsenterede sig ved såvel 37°C som 44°C bedst på Membranberiget Teepol Bouillon tilsat agar samt Membran Lauryl sulfat Bouillon tilsat agar, idet kolonierne her var velafgrænsede og derfor lettere at tælle.

Grunden til at Referencelaboratoriet valgte at udsende Membran Lauryl sulfat Bouillon med Agar var, at dette til forskel fra det andet substrat kunne fås kommersielt.

Prøvernes sammensætning.

Koncentraterne A og C blev fremstillet med henblik på, at der i de færdige prøver A og C ville være et kimindhold på ca. 10.000 kim pr. 100 ml.

Prøve A og C: ca. 9.000 Enterobacter cloacae pr. 100 ml.

ca. 1.000 Escherichia coli pr. 100 ml.

Koncentraterne B og D blev fremstillet med henblik på, at der i de færdige prøver B og D ville være et kimindhold på ca. 5.000 kim pr. 100 ml.

Prøve B og D: ca. 5.000 Aeromonas sobria pr. 100 ml.

Koncentraternes homogenitet under aftapning af disse til udsendelse er undersøgt. Resultatet fremgår af bilag 5.

Temperaturen i testmaterialet ved laboratoriernes åbning af containeren fremgår af oversigten samt af sjølediagrammet bilag 6.

4. RESULTATER.

Laboratoriernes analyseresultater skulle være Miljøstyrelsen i hænde senest den 29. maj 1990.

Den 20. juni 1990 fremsendtes udskrift af de modtagne rådata (bilag 7) til samtlige deltagende laboratorier. Det enkelte laboratorium havde på denne måde mulighed for at sikre, at de resultater, som var afsendt fra pågældende laboratorium var korrekt indlæst. Et resultat blev korrigeret, nemlig lab.nr. 42, prøve C-37 t = prøve C, 37°C coliforme, tilsendt substrat, hvor 8600 kim/100 ml blev rettet til 8900 kim/100 ml.

Den grafiske fremstilling af resultaterne fremgår af bilag 8.

Laboratoriernes bemærkninger til egne resultater.

Lab. nr.	Prøve A	Prøve B	Prøve C	Prøve D
3	"Oxidasetest er først lavet på kolonier fra isolationssubstratet. Derefter er alle de positive lavet på kolonier fra Nutrient Agar."		Eget substrat coliforme: "Begge kolonier var både ox+ og ox-. Delt op i en gul del og en rød del. Den røde var ox+, den gule ox-. Begge kolonier op på Nutrient Agar, her var de ox+."	
5	"Kolonierne små og mange atypiske"			Tilsendt substrat coliforme: "Disse var ox+ både på isolationssubstratet og Nutrient Agar."
6	"Meget svag indolreaktion"	"Falsk positiv:Aeromonas hydrophila"	"Indol-reaktionen var meget svag"	"Falsk positiv: Aeromonas hydrophila"
7	"Resultatet opgivet som formlens resultat, ikke som vanligt med 2 betydende cifre"	"Resultatet opgivet som formlens resultat, ikke som vanligt med < et givet antal"	"Resultatet opgivet som formlens resultat, ikke som vanligt med 2 betydede cifre, gælder for (presumptive E.coli eget substrat)"	"Resultatet opgivet som formlens resultat, ikke som vanligt med < et givet antal"

Lab.

nr. Prøve A

Prøve B

Prøve C

Prøve D

8	"Indolnegative i Lau- ryl Tryptose Manni- tol Bouillon med tryptofan ved podning i Tryptovand efter DS 2255 findes de in- dolpositive. C er i så fald: Eget 1300 LSA: 1200"		"Se bemærkninger til prøve A. C er i så fald: Eget: 1100 LSA: 1400"
14	"Resultaterne er op- givet med 2 betydn- ende ciffer"	"Resultaterne er op- givet med 2 betydn- ende ciffer"	"Resultaterne er op- givet med 2 betydn- ende ciffer"
15	"Verifikationen har omfattet både oxi- dasetest og luft- udvikling i laktose pepton"	"Luftdannelse i lak- tose pepton vand, men oxidase + Oxi/Ferm Tube II Roche: Aeromonas hydrophila"	"Verifikationen har omfattet både oxida- setest og luftudvik- ling i laktose pep- ton"
16			"På pladerne med 0,1 ml var der 16 koloni- er på Eget sub. og 15 kolonier på LSA der er kun gået videre fra plader med mellem 20- 200 kolonier"
17	"Inkubator ved 37°C gik i stykker natten mellem d.15. og 16. temperaturen var 38,7°C kl. 8.00 den 16. Inkubatoren blev repareret den 16. kl. 10."	"Inkubator ved 37°C gik i stykker natten mellem d.15. og 16. temperaturen var 38,7°C kl. 8.00 den 16. Inkubatoren blev repareret den 16. kl. 10."	"Inkubator ved 37°C gik i stykker nat- ten mellem d.15. og 16. temperaturen var 38,7°C kl. 8.00 den 16. Inkubatoren blev repareret den 16. kl. 10."
18	"Indoldannelsen i LTMB+tryptofan var meget svag men kraftig i tryp- tonvand."		"Indoldannelse - se under prøve A"
21		"Eftersom der er ta- le om oxidaseposi- tive kolonier, må resultatet regnes for negativt"	"Eftersom der er ta- le om oxidaseposi- tive kolonier, må resultatet regnes for negativt"
24		"Oxidasetesten viser at de laktoseforgæ- rende kolonier ikke er coliforme bakte- rier"	"Oxidasetesten viser at de laktoseforgæ- rende kolonier ikke er coliforme bakte- rier"

Lab. nr.	Prøve A	Prøve B	Prøve C	Prøve D
26	"Lauryl Tryptose Mannitol Bouillon med Tryptofan viste positiv, men ikke særlig tydelig reaktion, idet rødfarvningen først kom efter nogle minutter og var svag. Derimod viste tryptonvand en tydelig positiv reaktion"		"Lauryl Tryptose Mannitol Bouillon med Tryptofan viste positiv, men ikke særlig tydelig reaktion, idet rødfarvningen først kom efter nogle minutter og var svag. Derimod viste tryptonvand en tydelig positiv reaktion"	
29		"Svag luftproduktion i laktosepeptonvand."		"Tilsyneladende 2 slags kolonier, store (3-4 mm) og små (1-2 mm), de sidste med navle/topdannelse. Ca. halvt af hver. Ligeledes forskel i luftproduktionen i laktosepeptonvand. Alle undersøgte kolonier, 5 af hver type, imidlertid oxidasepositive."
32	"Små kolonier (<1 mm) kunne ikke verificeres i LTM-bouillon med Tryptofan (10 stk. afprøvet) ikke talt med"	"Henholdsvis 6 og 1. kolonier ud af 10 er pos. i Laktose Pepton vand, men cyt.ox.pos."	"Små kolonier (<1 mm) kunne ikke verifice- res i LTM-bouillon med Tryptofan (10 stk. afprøvet) ikke talt med"	"Henholdsvis 4 og 9 kolonier ud af 10 er pos. i Laktose Pepton vand, men cyt.ox.pos."
38	"Til eget substrat er anvendt eget filter Sartorius Cellulose nitrate filter 0,45 mm porrestørrelse d = 47 mm Change nr. 1289 11406 8906301"	"Som prøve A"	"Som prøve A"	"Som prøve A"
40		"Coliforme: 10-ml filtreringen ikke anvendt ved aflæsning (overvokset) - derfor resultatatangivelsen u.100."		"Coliforme: 10-ml filtreringen ikke anvendt ved aflæsning (overvokset) - derfor resultatatangivelsen u.100."

Lab. nr.	Prøve A	Prøve B	Prøve C	Prøve D
42	"E.Coli verifikation i Lauryl Tryptose Manitol B: <u>MTB</u> : Luft og svag indolreaktion i 5 rør.. LSA: Luft-kraftig indolreaktion i 1 rør, luft svag indolreaktion i 4 rør. Ekstra verifikation ved podning af et antal karakteristiske kolonier til Mc Conkey og Indol. Luft/syre og indol ved 44°C"	"Der var luftdannelse ved laktosepeptitonvand fra de oxi-dase positive kolonier"	"E.Coli verifikation i Lauryl Tryptose Manitol B. <u>MTB</u> :Luftdannelse,kraftig indolreaktion i 1 rør, svag i 4 rør. LSA: Moderat/svag indolreaktion i 5 rør. Ekstra verifikation ved podning af et antal karakteristiske kolonier til Mc Conkey og Indol. Luft/syre og indol ved 44°C."	"Der var luftdannelse i laktosepeptitonvand fra de oxi-dase positive kolonier."
45	"A i tabellen er verificeret for såvel luft som oxidase. Resultaterne opgivet med 2 betydende cifre" 9308-1"	"Se prøve A" Bedømmelserne udfra kriterierne i bi-lag A- Iso/dis med 2 betydende cifre"	"Se prøve A"	"Se prøve B"
47	"Ved 44°C kunne der ses forskel på kolonierne ved hjælp af størrelsen på disse. Små kolonier var negative for luft og indoldannelser. Der blev opstukket 3 små og 3 store kolonier. Den mere korrekte mængde af thermotolerante coliforme bakt. er angivet under hvert skema (udregnet i henhold til forholdet mellem små og store kolonier.)"	"For prøve A,B,C og D: Antallet af kolonier er lettest at aflæse på Endo-substrat, idet kolonierne flyder noget ud på LSA. Det er sværere at dele kolonier på Endo-substrat i 2 (til oxidasetest & lactose-peptonvand)"	"Nogen sammenflydning af kolonier på pladen (0,1 ml pladen havde kun 7 kolonier)"	"For prøve A,B,C og D: Kolonierne flyede mindre ud på Teepol-agar end på LSA."
48		"Aeromonas (antagelig hydrophila)"		"Aeromonas (antagelig hydrophila)"
52		"Vedrørende presumtive Esch.coli: Såvel på eget substrat som på tilsendte substrat var membranfilter repræsenterende 100 ml uden kolonier (N=0) dvs. C=<1/100 ml."		"Vedrørende presumtive Esch.coli: Såvel på eget substrat som på tilsendte substrat var membranfiltret repræsenterende 100 ml vand uden kolonier (N=0), dvs. C=<1/100 ml"

Laboratoriernes bemærkninger til 5. metodeafprøvning.

Lab. nr. 3: "Selv forskriften er ikke særlig overskuelig. Det har været nødvendigt med yderligere inddelinger og understregninger.

Selv proceduren virker også meget tilfældig f.eks. må man selv bestemme om der inkuberes ved 35°C eller 37°C , og om man inkuberer i inkubator eller vandbad.

Vedr. verifikationsundersøgelsen:

Jeg synes, det var svært at skelne kolonierne på vores substrat og dermed svært at tælle de forskellige slags - de så egentlig meget ens ud, ligesom der ikke var stor forskel på udseendet på vores eget (7.3.3) og det tilsendte (7.3.4) substrat. Oxidasetesten viser derimod, at der er forskel, da nogle er positive og nogle er negative. Da der hermed er forskel på kolonier, som man forventede ville være ens, synes jeg ikke, man kan være sikker på, at den koloni man verificerer i laktosepepton-vand er den samme som den, der verificeres ved oxidasetesten; jeg mener, der er tale om så stor usikkerhed, at resultaterne ikke kan bruges. Jeg mener, det vil være rigtigst at rendyrke de presumptive bakterier og herefter lave samtlige verifikationsundersøgelser på samme rendyrkede koloni. Hvorvidt man så skal tælle samtlige fremvoksede kolonier og derefter verificere på op til 10 kolonier (som ved *Pseudomonas*) eller man skal prøve at skelne i grupper, tælle hvor mange kolonier, der tilhører hver gruppe og herefter verificere en koloni fra hver gruppe, kan jeg ikke tage stilling til, men umiddelbart vil jeg mene, at det første vil være mest overskueligt.

Vedr. ISO'ens pkt. 8.4.1 - 2 afsnit de 2 første linier forstår jeg ikke, da termotolerante coliforme bakterier og presumptive *E. coli* er dyrket ved 44°C , hvis proceduren i forskriften er anvendt. Såfremt det ikke er meningen, må det som i DS 2255 præciseres hvordan man gør."

Lab.nr. 8: "1) Laboratoriet har fået indolpositive reaktioner i tryptovand efter DS 2255. Samme stammer gav negativ indolreaktioner i Lauryl Tryptose Mannitol bouillon med tryptofan efter ISO/DIS 9308-1. Årsagen hertil er ikke fundet.

- 2) Subkulturer af laktosefermenterede organismer skal dyrkes på Nutrient-agar. Et andet grundsubstrat kan vel anvendes.
- 3) Resultatangivelser: Talstørrelsen, C, kan blive 0. Der skal være en nøjere beskrivelse af resultatangivelsen i sådanne tilfælde (<1, <10, <100 o.s.v. vil være rigtig).
- 4) Nye og "gamle" standarder skal harmoniseres.

Her tænkes bl.a. på:

- Autoklavingstemperaturer (Laktoseholdigt substrat v. 121°C?).
- pH i substrater
- Nye typer af fortyndingsvæsker ses i ISO/DIS 9308-1. Hvorfor kan fosfatbuffer efter DS 2255 ikke anvendes?
- Substrater/bouillonler med lille variation i forhold til allerede kendte indføres."

Lab. nr. 10: "Forskrift for "Nutrient Agar" mangler i ovennævnte standard."
(ISO/DIS 9308-1).

Lab. nr. 11: "Vi har bemærket forskellen i resultaterne for antal coliforme bakterier efter de to metoder ISO/DIS 9308-1 og DS 2255."

Lab. nr. 13: "De medsendte membranfiltre var vanskelige at skille fra beskyttelsesfilterpladerne. Membranfiltrene var meget "elektriske"."

Lab. nr. 14: "1. Kolonierne er i udseende alle typiske coliforme, men ved videre verifikation falder mange fra. Hvorved metoden bliver meget tidskrævende.
2. Metoden er meget omstændig. Selv om man verificerer mange kolonier, er det ikke sikkert, at man lige netop får fat i E. coli kolonier."

Lab. nr. 15: "Ved subkultivering i Laktose Pepton vand af kolonier, der har vist typisk reaktion på pladen (laktose +) har der i en del tilfælde ikke været vækst.

Ligeledes har der været problemer m. manglende vækst på Nutrient agar.

Laboratoriet har anvendt færdigfremstillet Kovac's reagens fra Bie og Berntsen. Det giver svagere reaktion i Lauryl Trypton Mannitol Bouillon end i Tryptonvand."

Lab. nr. 18: "Generelt virker metodeforslaget noget ustruktureret. F.ex. kommer teoretiske overvejelser og den praktiske udførelse blandet i mellem hinanden (pkt. 3.1 og 3.2 smlg. med 8.4 og 8.5 samt appendix A).

Særlige bemærkninger:

Pkt. 8.1.2: Hvorfor skal prøvemængderne være ens?

Det skal selvfølgelig tages højde for eventuelle forskelle i prøvemængde når resultaterne opgives jvf. f.eks. metodeafprøvingen.

Pkt. 8.4.1: hvad enten der er inkuberet ved 44°C eller 35°C eller 37°C - hvad menes der?

Pkt. 9: Vt - definitionen er forkert når man samtidig opererer med en faktor F = fortyndingen.

Forslag: Vt = den mængde af vandprøven eller fortyndingen, der er filtreret.

Det er ikke hensigtsmæssigt med de mange valgmuligheder:

Fortyndingsvæsker

Isolationssubstrater

Inkubationstemperaturer

Verifikationssubstrater

idet det må formodes at resultaterne vil være afhængige af de valgte kombinationer.

En grænseværdi, der alene henviser til denne standard vil være uden mening med alle disse valgmuligheder."

Lab. nr. 22: "Metodeforslaget er vanskeligt at forstå:

(Udtalelse fra laborant der har arbejdet med metoden).

- der mangler mange steder en direkte angivelse af temperatur og substrat.

Coli - termotolerante coli - presumptive coli bliver brugt i flæng f.eks. 8.4.1.

Der mangler kemiske formler og angivelser af, at mængden øverst er mængden i den færdige oplosning af fosfatbuffer oplosningen s. 20.

Hvad er "F" for en størrelse i udregningsformlen.

En luftinkubator der kan køre på $44,5 \pm 0,25^{\circ}\text{C}$ er nok ikke realistisk."

Lab. nr. 26: "ISO/DIS 9308-1 virker rodet, uden logisk sammenhæng og er tung at læse. Det er besynderligt, at der skal inkuberes ved $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ eller $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, når der undersøges for coliforme bakterier, og ved enten $44 \pm 0,25^{\circ}\text{C}$ eller $44,5 \pm 0,25^{\circ}\text{C}$, når der undersøges for termotolerante coliforme bakterier.

Der er mange substrater og reagenser i ISO/DIS 9308-1. Hvis disse er blevet afprøvet og fundet ligeværdige, er dette selv-følgelig acceptabelt, men hvis det ikke er tilfældet, bør det bedst egnede substrat/reagens vælges og de andre udgå af forskriften. Der er enkelte punkter i ISO/DIS 9308-1, der er direkte uforståelige, f.eks. side 8, afsnit 8.4.1, linie 6-9.

Det er vanskeligt/umuligt "at subkultivere kolonier eller et repræsentativt antal af dem", idet det kan dreje sig om over 100 kolonier, hvis alle skal overføres til f.eks. Laktose Pepton vand eller Nutrient Agar. Hvis man derimod vælger at overføre et repræsentativt antal, kan det være svært at vurdere, hvad der er repræsentativt, idet det kan være vanskeligt/umuligt at se, hvor mange forskellige kolonityper man har på filtret.

Mens mange substrater er indgående beskrevet, er Nutrient Agar overhovedet ikke beskrevet, men kun nævnt side 9 øverst. Formodentlig kunne PCA anvendes istedet for Nutrient Agar?

Ifølge forskriften er det kun les Endo Agar, der skal fordeles i små petriskåle, men dette er ikke krævet for de øvrige isolationssubstraters vedkommende. Her er igen en detalje, der tyder på, at ISO/DIS 9308-1 ikke er konsekvent.

ISO/DIS 9308-1 virker, som om den er kreeret udelukkende ved et skrivebord og er tilsyneladende sammenstykket af samtlige substrater/reagenser, der i teorien er anvendelige til undersøgelse for coliforme bakterier/termotolerante coliforme bakterier/presumptive E.coli. Forskriften bør efter vores opfattelse revideres en del, inden den udsendes som forslag til Dansk Standard."

- Lab. nr. 31: "1. Det kan undre, at man til aflæsning af indikative plader kan anvende plader med kolonital helt op til 200. Det kan undre, at det anbefales at anvende plader med ≥ 20 og ≤ 200 kolonier uafhængigt af aflæsningsarealet, idet der ved 5 cm membranfiltre er et areal der er over 3 gange mindre end arealet på en 9 cm petriskål.
2. Det er uklart om autoklaveringen af tilsendt substrat (LSA) skal udføres som Oxoid foreskriver (121°C i 15 min.) eller som ISO angiver (115°C i 10 min.). Vi har valgt at følge ISO."

Lab. nr. 32: "Vedr. prøverne B og D.

Tallet for coliforme bakterier er uden Aeromonas species (oxidase testede jvf. pkt. 8.5 i ISO/DIS 9308-1)."

Lab. nr. 34: "Aflæsningskriteriet "mellem 20-200 kolonier/plade" er urealistisk, da dette svarer til en plade med diameteren 90 mm. Her haves kun ca. det halve (47 mm) og derfor burde aflæsningskriteriet ændres tilsvarende. Desuden er skelnen mellem de enkelte kolonier meget vanskelig på så lille et areal, at dette gør verifikationen væsentlig sværere og mere tidskrævende, hvilket metoden i sig selv også er.

Formlen til beregning af "C" tager ikke umiddelbart hensyn til forekomsten af forskellige bakteriearter."

Lab. nr. 35: "Det fremsendte skriftlige materiale er meget uoverskueligt og fremgangsbeskrivelsen er meget rodet.

Der er ikke anført, hvornår og hvorfra man skal pode på nutrient agar til oxidase-test, og ej heller hvilken temperatur og hvilken dyrkningstid, der skal anvendes.

Man kan ikke skelne positive og negative kolonier på membranberiget Teepol (agar) og Lauryl sulfat (agar), kun hvorvidt hele pladen (ved farvereaktion) er positiv eller negativ.

Der burde angives retningslinier for, hvor mange kolonier, der skal verificeres. Vi har kun anvendt 3 af praktiske grunde, men der bør givet være flere, men hvor mange?

Det forekommer os at måtte være svært at udlede resultater af afprøvningen på grundlag af det meget frie substratvalg."

Lab. nr. 36: "3.2 Krav om temperaturvarians på ikke $> \pm 0,25^{\circ}\text{C}$ kræver specielt fintfølende udstyr på incubator.

Bestemmelse af termotolerante coliforme bakt. i levnedsmidler efter NMKL 125 - stiller kun krav om $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Kravene bør kunne koordineres.

3.1, 3.2, 7.3

Hvorfor de mange valgmuligheder med hensyn til temperatur og substrat?

8.2 Forincubering i 4 timer giver praktiske problemer med
Bemærk: indpasning i normal arbejdstid.

8.4.1 Et repræsentativt antal kolonier? - bør specificeres nærmere.

Afsnit 2: Som teksten er udformet, må det opfattes som om også kolonier fra 37° membranen skal afprøves i lactosepeptonvand 44°C , - for luft - og indoldannelse. Det kan vel ikke være meningen!

9. $F =$ fortyndingen bør være
 $F =$ fortyndingsfaktor."

Lab. nr. 37: "Vedr.: Fremstilling af prøven:

Prøven fra målekolben bør overhældes til almindelig prøveflaske. Der er lidt langt ned til vandstanden i kolben, når man skal afpipitere små mængder (0,1 og 1 ml).

Vedr.: Membranfiltrering:

Membranfiltreringsmetodik bør angives. Vi har brugt samme metodik med for- og efterskyllning af filtrene som angivet ved svømmebadsanalyser.

Vedr.: Substratopskrifter:

De kemiske formler for tilsatte stoffer bør angives, så man kan tage højde for evt. tilsat vand i kommersiel tilgængelige stoffer. (F.ex. købes dikaliumhydrogenphosphat med 3 molekyler vand.)

Det var næsten umuligt at opløse phenolrødt i vand - end ikke natten over ved svag varme og konstant omrøring kunne gøre det. Der bør stå i metoden, at opløsningen kan ske ved kogning i min. 20 minutter (20 minutters kogning var ikke engang perfekt).

Vedr.: Phosphatbuffer:

I standarden angives, at pH skal justeres til $7,2 \pm 0,5$ med 1 molær NaOH. Vi har tilsat mellem 10 og 15 ml 50% NaOH-opløsning for at ramme det foreskrevne pH, dvs. med en 1-molær-opløsning, vil det kræve en meget stor mængde NaOH.

Slut pH skal være $7,0 \pm 0,1$. Vores slut pH var 6,98 før autoklavering. Efter autoklavering var pH 7,33.

Variationsintervallet ($\pm 0,1$) for pH er ret snævert i forhold til intervallet for fremstilling ($\pm 0,5$).

Vedr.: Tryptonvand.

Metodens angivne opskrift på trytonvand - som ikke bruges i denne afprøvning - er dobbelt så stærk som trytonvand angivet i DS 2255.

Vedr.: Indolreaktionen.

Indolreaktionen i lauryltryptosemannitolbouillon var ikke klar rød (men dog rødfarvet, så vi skønnede reaktionen positiv). Reagenset blev afprøvet på vanlig vis i trytonvand - og gav her den normale klare røde farve.

I øvrigt skulle bouillonen rystes kraftigt, før der indtrådte farveskifte i alkoholfasen.

Vedr.: Inkubationstemperaturer:

Ifølge forskriften skal termotolerante coli inkuberes ved $44 \pm 0,25^{\circ}\text{C}$ - eller ved $44,5 \pm 0,25^{\circ}\text{C}$ - dvs. i temperaturintervallet 43,75 til $44,75^{\circ}\text{C}$. Der kunne altså ligeså godt stå $44,25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Inkubationstemperatur for Nutrient agar er ikke angivet i metoden. Vi har rendyrket ved 37°C.

Vedr.: Inkubation af verifikationsbouillon.

Der er ikke angivet, om bouillonen skal forvarmes, og om der bør inkuberes i vandbad eller lufttermostat. Vi har forvarmet bouillonen ved henholdsvis 37 og 44°C og inkuberet i vandbad.

Vedr.: Inkubation af lauryltryptosemannitolbouillon.

Der er ikke foreskrevet temperatur eller tid. Vi har inkuberet bouillonen ved 44°C i 24 timer (bør måske stå 48 timer, jfr. bemærkninger ved indolreaktionen?).

Vedr.: Verifikation af kolonier:

Der bør angives hvor stor en procentdel af kolonierne, der skal/bør verificeres. Ligeledes bør verificeres fra alle morfologiske typer, som bør tælles særskilt. (Exempel: Få/mange kolonier af en type falder positivt ud, mens et stort/lille antal af en anden morfologisk gruppe (ex. mindre, mere transparante kolonier) ikke verificeres. Hvis der er udtaget lige mange kolonier af hver type til verifikation, giver metoden et forkert resultat, når der i virkeligheden er et forholdmæssigt ringe/stort antal positive).

Vedr.: Tællegrænser.

Tællegrænser bør angives i standarden: Det "normale" interval - 20 - 200 kolonier - er ikke særlig egnet til membranfiltre, hvor kolonierne ofte flyder sammen/ligger i klumper/vokser ovenpå hinanden ved omkring 100 kolonier pr. filter (ofte allerede ved over 50 kolonier pr. filter).

Retningslinier for tælling af sammenhængende kolonier på filtre ønskes. Eksempel: Skal en "klump" af f.ex. 3 rimeligt velafgrænsede og tydelige, men sammenhængende kolonier, tælles som 1 eller 3 (Exemplet var aktuelt i prøve B).

Vedr.: Formel for udregning af resultat.

Der bør opstilles et eksempel i metoden. Det er lidt uklart, hvad der menes med "fortyndingen" - om det er i ml eller log. Enheder bør også præciseres.

Vedr.: Skemaer/opgivelse af resultater.

Det er uklart i forskriften, om oxidasetesten er et led i verifikationsprocessen. Vi har delt kolonierne, så samme koloni er testet for luftproduktion (+ evt. indol) og oxidasereaktion. I metoden bør angives, at samme koloni bør bruges til

begge tests, så der tages højde for oxidasetesten i udregningen, dvs. "antal verificerede kolonier" i formlen. Exemplet er aktuelt i prøve B og D.

Vi måtte lave det tilsendte substrat om, fordi vi regnede med, at der var taget højde for tilsat agar i opskriften. Det var meget kort varsel at ændre metoden kun 2 arbejdssage før metodeafprøvningen.

pH før sterilisation: 6,98

pH efter sterilisation: 7,33."

Lab. nr. 38: "Metodeafprøvningen tog et særligt stort omfang af 2 grunde:

1. Der var netop blevet fremstillet LSA, da ændringen blev fremsendt.
2. Den laborant, der havde forberedt metodeafprøvningen, blev sygemeldt på prøvningsdagen, hvorfor en anden laborant overtog opgaven. Herved blev prøvningsomstændighederne ikke gennemlæst nøjagtigt nok (forklaringen til metodeafprøvningen kunne have været bedre), og det var opfattelsen, at der skulle foretages dobbeltundersøgelse. Derfor blev egne filtre taget i brug og 96 prøver undersøgt.

De påskrevne resultater er fra enkeltprøver og er afrundet til 2 betydende cifre. Til sammenligning er vedlagt resultaterne fra dobbeltprøverne (overstreget).

De først aflæste plader er brugt i den egentlige affrapportering.

Andre bemærkninger:

På endoagar voksede oxidase-positive bakterier (prøve B og D), og der var ikke forskel på disse kolonier og kolonierne i prøverne A og C.

Resultaterne på "det fortyndede" LSA-medium var: Svagere farveraktion og en lidt mindre koloni.

Anvendt forkortelse MTBA = membranberiget teepol bouillon agar.

Metoden med at udprikke et antal kolonier til oxidase-test forekommer at kunne give større usikkerhed om resultatet, falsk-negative som falsk-positive resultater."

Lab. nr. 40: "1. Indoldannelsen i Lauryl Tryptose Mannitolbouillon m/tryp-tofan var svag (blegrød farve). En på laboratoriet anvendt kontrolstamme af E.coli viste ingen indoldannelse.

2. Upraktisk, at speciel fortyndingsvæske anvendes.
3. Detektionsgrænsen for coliforme kim kan være høj pga. overvoksede filtre.
4. Metoden er besværlig i forhold til MPN-metoden.
5. Det er en fordel at man har mulighed for at verificere kolonierne - dette er vanskeligere ved MPN-metoden, da en efterfølgende dyrkning på plade ofte viser en blandingskultur."

Lab. nr. 42: "Efter aftale med dyrlæge Irene Simoni, MLK Odense, er C værdierne ikke udregnet - det har referencelaboratoriet ikke noget imod at gøre selv.

ISO/DIS 9308-1 virker noget uoverskuelig i den foreliggende uofficielle oversættelse.

Hvordan får man en rimelig sikkerhed for at "fange" coliforme oxidasenegative kolonier fra en prøve med blandet vækst, hvis ikke man skal igennem et omfattende antal kolonier til verifikation?"

Lab. nr. 44: "ISO/DIS 9308-1 virker som en mere omstændelig metode end DS 2255.

Der er et større arbejde med hver enkelt prøve, og ISO/DIS 9308-1 virker ikke ligeså specifik som DS 2255.

Kolonierne på membranerne kan ligne hinanden og af udseende være coli, men er det nødvendigvis ikke. Selve filtreringen af prøven er ikke besværlig, men arbejdet med verifikationen forekommer besværlig og noget usikker."

Lab. nr. 45: "Det ville være ønskeligt med en vejledning i brugen af de enkelte substrater og deres virkemåde (princip) - hvilken prøvetype til hvilken substrat - samt fortyndingsvejledning i henhold til prøvetype."

Lab. nr. 46: "Metoden er rodet. Det virker som om man har blandet flere metoder sammen til én hvilket gör, at den bliver uoverskuelig og visse steder ulogisk. F.eks. pkt. 3.1 definitionen på coliforme bakterier hvor der er skrevet "...enten $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ eller $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C} ...$ ". Udtrykket enten/eller er normalt i modsætning til både/og. Når temperaturerne ikke relateres til dyrkningssubstrater, er det misvisende, fordi det skal være både/og. For termotolerante coliforme bakterier burde temperaturangivelsen også relateres til dyrkningssubstrater.

Pkt. 6.2 Det er anført at temperatursvingningen ved 44°C h.h.v. $44,5^{\circ}\text{C}$ skal være inden for $\pm 0,25^{\circ}\text{C}$. Jeg har ikke kunnet finde lufttermostater der kan overholde dette krav.

Pkt. 8.2 Det er sikkert udmarket at præinkubere i 4 timer ved 30°C . Men hvis der inkuberes i lufttermostat, begrænser det arbejdsdagens længde betydelig.

Der er i metoden ikke anført den oxidasetest på coliforme bakterier, som der er lagt op til i metodeafprøvningen.

Pkt. 9. Når man udregner formlen, ender man med et tal uden benævnelse. Dvs. at vi f.eks. skal opgive at $C = 2$. Det må kræves, at en resultatangivelse opgives på en umiddelbart forståelig måde, dvs. at enheden benævnes i forbindelse med tallet f.eks. $2/100 \text{ ml}$.

Hvis man bruger formlen i overensstemmelse med metoden, hvor bare en af faktorerne er et 0 vil man altid få værdien $0/100 \text{ ml}$. Hvis f.eks. ingen af de subkultiverede kolonier verificeres, vil resultatet derfor blive, at resultatet skal angives som $0/100 \text{ ml}$, hvad enten der er undersøgt $0,001 \text{ ml}$ eller 1 l. Da jeg ikke forventer, at metoden vil blive overvejet udsendt som officiel metode i den nuværende form, vil jeg begrænse mig til ovennævnte kritikpunkter."

..

Lab. nr. 47: "- Det er ønskeligt med en mere udførlig præcisering af; at termotolerante coliforme bakterier er presumptive termotolerante coliforme bakterier, der producerer luft fra laktose ved 44°C samt danner indol fra tryptofan ved 44°C .

- Der mangler en angivelse af et ca. antal af kolonier, der stikkes op fra filtrene til verifikation.

- Der mangler angivelser vedr. skyldning af tragt ved membranfiltrering.
- Der mangler angivelse af, hvorledes et negativt resultat udtrykkes.
- Det burde være angivet, at samme koloni skal anvendes til verifikation for luft produktion og oxidasetest.
- Det er meget betydningsfuldt, at mange falske positive kan eliminieres ved oxidasetesten.
- Det kan medføre en betydelig usikkerhed, at kolonierne skal opstikkes fra pladerne, se f.eks. vores resultater for 44°C ved prøve A. Det er sandsynligvis kun muligt at se forskel på kolonierne på grund af, at det er en konstrueret prøve.
- Det er umuligt at se om nogle af kolonierne på LST og Teepol-agar ikke forgærer lactose, da samtlige kolonier var gule og gulfarvningen af agaren var diffus (undtagen, når der var et meget lille antal kolonier på pladerne).
- Ved undersøgelse af få rigtige badevandsprøver på LSA, Tee-pol-agar og Endo-substrat kunne der iagttages følgende: Tydelig forskel på koloniernes farve gul/rødlig på LSA og Tee-pol-agar, hvorimod det var sværere at skelne kolonierne på Endo-substratet, når der var baggrundsflora."

Lab. nr. 48: "Ikke tilfredsstillende oversættelse.

Der opstod flere situationer, hvor forskellig tolkning er mulig, ligesom overskueligheden ikke er tilfredsstillende. Henvendelse til Irene Simoni var nødvendig i forbindelse med udregningen."

Lab. nr. 49: "Ved kraftig vækst af coliforme bakterier synes at forekomme tendens til at udeblive gult omslag under membranen, eller endog, på gult substrat, at slå om til rødt, således at oxydaseraktionen bliver afgørende uden hensyn til omslagets farve. Metoden som helhed synes at være meget tidskrævende i daglige masseforekommende rutineanalyser."

Lab. nr. 50: "Kemiske formler mangler.

Resultatberegning ud fra formel indicerer at opgive resultatet til 0.

Øvrige tal rundet af til 2 betydende cifre."

Lab. nr. 51: "1. Kontrolskåle bør indgå i metodikken, således at der filtreres med sterilt vand ved filtrerings start, midtvejs i undersøgelsen og ved slutningen af undersøgelsen. Dette for at kontrollere regelret desinfektion.

2. Der bør ikke tælles på filtre med over 50 kol. (tælle-interval 0-50).
3. Entydig aflæsning kan undertiden være vanskelig på det valgte substrat. (gule, mindre gule kol.).
4. Når der i prøve D er afprøvet ikke karakteristiske kol. skyldes det, at vi ikke er fortrolige med metoden.
5. Vedrørende beregnings formlen:
A: Verificerede kol. bør beregnes som verificerede Oxydase negativ/coliforme kol.
F: Fortyndingen misvisende betegnelse."

Lab. nr. 52: "Der bør angives kemisk formel (Eks. magnesiumklorid som kan have formlerne $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ eller $MgCl_2$)."

Lab. nr. 53: "MEGET OMFATTENDE FORSKRIFT:

Ingen opskrift på nutrient agar.

Vedr. 7.2 (s.4): Det bør direkte af forskriften fremgå, hvilke fortyndingsvæsker, der anbefales - og ikke "bare" en henvisning til en anden metode.

Vedr. 7.3 (s.5): Det store antal isolationssubstrater lægger næsten op til, at hvert laboratorium selv afprøver/udvælger det ønskede substrat, og dette er vel ikke hensigten. - Det kunne derfor ønskes, at et eller nogle få substrater kunne anbefales, evt. afhængig af vandtype.

NB! De fremsendte resultatskemaer var ikke logiske i forhold til forskriften - skabte uklarhed vedr.

- tælling af antal kolonier (totale antal, hvor forskriften angiver karakteristiske kolonier)
- brug af oxidasetesten (efter forskriften anvendes den evt. som en yderligere undersøgelse ved verifikation - og altså ikke primært ved en sortering af kolonier)."

25 **Vandkvalitetsinstituttet**
Water Quality Institute



Miljø- og Levnedsmiddelkontrolenheden
Lille Tornbjerg Vej 24
5220 Odense SØ.

Att.: Irene Simoni.

c.l.a. - 3 AUG. 1990

Deres ref. Your ref.

Dato/Date

Vor ref./Our ref.

Dato/Date

JLJ/PSS/ELS - Hørsholm
650948 31. august 1990

Statistisk vurdering ved Jess la Cour Jansen (s. 25-27).

Statistisk vurdering af data fra 5. metodeafprøvning og 10. interkalibrering af kmidtællingsmetoder.

På baggrund af rådata fra 5. metodeafprøvning og 10. interkalibrering af kmidtællinger er foretaget en statistisk vurdering af betydningen af anvendte vækstsubstrater og kimbestemmelsesmetoder. Rådata er modtaget på diskette og er på forhånd godkendt af Miljø- og Levnedsmiddelkontrolenheden i Odense.

Datamaterialet er inden de statistiske analyser gennemgået, og laboratorier for hvilke én eller flere data har manglet, er af effektivitetshensyn bortsorteret. Endvidere er data testet for varianshomogenitet, og laboratorier med ekstreme outliers er herved udelukket. Varianshomogenitet er herved sikret. I analysen af substratvalg er i alt 36 laboratorier indgået, og i analysen af kimbestemmelsesmetode er 38 laboratorier indgået.

Vurderingen er udført som variansanalyser, hvor betydningen af de enkelte variationskilder undersøges.

For vurderingen af substratvalg er anvendt data fra 5. metodeafprøvning, og følgende variationskilders betydning er undersøgt: Substratvalg (eget/tilsendt), prøve (A/C), temperatur (37°C/44°C).

Data er medtaget for både 37°C og 44°C og for både prøve A og C for at øge styrken af vurderingen. Samtidigt holdes bidraget til variationen fra prøven og fra temperaturen helt adskilt fra substratvalgets bidrag.

... 2

HEAD OFFICE · SCIENCE PARK HØRSHOLM

11. Agern Allé
Forskningscentret
DK-2970 HØRSHOLM
Denmark

Tелефon: +45 42 86 52 11
Telefax: +45 42 86 72 73

Giro: 314 49 09
Bank: DEN DANSKE BANK
Telex: 37874 VKICPH
Telegram: waterquality hørsholm

REGIONAL OFFICE · SCIENCE PARK AARHUS

Forskerparken
10. Gustav Wieds Vej
DK-8000 AARHUS C
Denmark

Tелефon: +45 66 20 20 00
·(direct): +45 66 20 20 11-100
Telefax: +45 66 20 12 21



- 2 -

Bestemmelserne er i alle tilfælde udført med MF-metoden.

For vurderingen af tællemetoden er anvendt data fra 10. interkalibrering og 5. metodeafprøvning, og i alle tilfælde er anvendt tilsendt substrat. Følgende variatkionskilders betydning er undersøgt: Tællemetode (MF/MPN), prøve (A/C), temperatur (37°C/44°C).

I variansanalyserne adskilles de enkelte variatkionskilders indflydelse og testes samtidigt. Det giver et differentieret billede af årsagen til kimbestemmelsernes variation, og på denne måde opnås en vurdering af den specifikke effekt af en bestemt variabel, som f.eks. substratvalg eller bestemmelsesmetode. Imidlertid opnås samtidigt en vurdering af betydningen af øvrige mulige kilder til den samlede variation og endvidere af den resterende variation, residualvariationen, som tillægges tilfældigheder og dermed ikke nærmere angivne årsager. Denne residualvariation skal helst være normalfordelt med en middelværdi på nul, idet der herigenem dokumenteres, at væsentlige specifikke variatkionskilder da vil være trukket ud og vurderet. Den aktuelle residualvariation i analysen er pånt fordelt omkring nul omend ikke helt normalfordelt, således at den statistiske analyse forløber pånt efter forudsætningerne.

Sammenligningen af substratvalg har vist, at der ikke kan observeres signifikant forskel på brug af tilsendt substrat og laboratoriernes eget substrat. En yderligere analyse af forskelle mellem de enkelte laboratoriers eget substrat er derfor ikke interessant i denne sammenhæng. Der er heller ikke forskel mellem prøve A og C, således at prøvematerialets homogenitet er dokumenteret. I denne analyse fra 5. metodeafprøvning har således kun temperaturen (37°C/44°C) vist sig (som ventet) at give signifikant bidrag til variationen i datamaterialet. En efterfølgende såkaldt "multiple range" test understøtter denne konklusion og viser ligeledes kun signifikant forskel på niveauer for 37°C-coliforme og 44°C-coliforme.

Sammenligningen af bestemmelsesmetode (MF og MPN) viser for det første, at der er meget stor forskel på den indre variation inden for hver metode. Variationen inden for MF-metoden er væsentligt mindre end variationen inden for MPN-metoden. MF-metoden er med andre ord væsentligt mere nøjagtig end MPN-metoden. Endvidere er der samtidigt forskel i deres niveau. Variansanalysen for tællemetoderne viser signifikant effekt af alle tre variatkionskilder: Bestemmelsesmetode, temperatur og prøve.

Den samlede vurdering er derfor:

- at substratvalg ikke har haft signifikant betydning for de opnåede resultater i 5. metodeafprøvning,

... 3



- 3 -

- at bestemmelsesmetode er af væsentlig betydning, idet MPN-metoden både er væsentligt mere upræcis og giver et coli-niveau, der er højere end MF-metoden,
- at temperaturen ikke uventet viser sig at have betydning i både 5. metodeafprøvning og 10. interkalibrering
- at der findes signifikant forskel på prøve A og C i analysen af data for 10. interkalibrering, men ikke i 5. metodeafprøvning. Forskellen i 10. interkalibrering er dog lille, men altså statistisk signifikant.

Med venlig hilser
VANDKVALITETSINSTITUTTET, ATV

Jøs la Cour Jansen

Referencelaboratoriets kommentarer.

Ved sammenligning af MPN-metoden efter DS 2255 og MF-metoden efter ISO/DIS 9308-1 har det vist sig, at MPN-metoden er mere upræcis, og tillsige giver et højere kimalt end MF-metoden. MF-metoden er altså mere "stabil", idet resultaterne ikke er så afvigende ved anvendelse af denne metode som ved brug af MPN-metoden.

På baggrund af de i denne metodeafprøvning opnåede resultater kan der ikke konstateres forskelle i de anvendte isolationssubstrater, idet såvel eget som tilsendt substrat giver kimalt på samme niveau. Imidlertid er ikke alle substrater afprøvede, da det ikke var praktisk muligt at inddale laboratorierne i grupper, således at hvert laboratorium i en gruppe på f.eks. 10 laboratorier skulle anvende et og samme substrat. I stedet for kunne det enkelte laboratorium frit vælge "egent substrat".

En del laboratorier har haft problemer med verifikationsmedierne, og som det bl.a. fremgår af skemaet s. 7-10, har især Lauryl Tryptose Mannitol Bouillon med Tryptofan voldt problemer. 13 Laboratorier har ikke fået verificeret samtlige overførte kolonier i Lauryl Tryptose Mannitol Bouillon med Tryptofan i den ene eller begge af prøverne A og C. Imidlertid har enkelte laboratorier tillsige verificeret i tryptonvand, og her har reaktionen været tydelig positiv. Laktose Pepton Vand har ligeledes hos 6 laboratorier ikke vist luftproduktion i den ene eller begge af prøverne A og C. Der er tilsvneladende usikkerhed ved brug af disse medier.

Ovenstående har naturligvis betydning for resultaterne, ligesom oxidasetesten har. 5 laboratorier har fundet såvel oxidase positive som oxidase negative kolonier i prøve B og/eller D, hvor der udelukkende skulle være oxidase positive kolonier. Dette kan skyldes, at nogle af disse laboratorier har lavet oxidasetesten på en koloni direkte fra isolationssubstratet, altså sprunget dyrkningen på Nutrient Agar over, og at der sammen med kolonien er overført reagens fra substratet. Der kan eventuelt også være tale om en forurening af pladen eller en fejlaflæsning af reaktionen, eller anvendelse af ikke friskfremstillet oxidasereagens.

4 laboratorier har angivet, at der er coliforme bakterier i prøven, skønt samtlige af laboratorierne testede kolonier er oxidasepositive.

Af ISO/DIS 9308-1 fremgår ikke, hvorledes negativt resultat skal angives, og laboratorierne har opfattet dette meget forskelligt, idet følgende måder til angivelse af negativt resultat er anvendt: 0/100 ml, <1/100 ml, <2/100 ml, <10/100 ml, <100/100 ml og <1000/100 ml.

Sluttelig skal det nævnes, at regnefejl bl.a. faktorfejl forekommer hos et par laboratorier, og at dette ligeledes har indflydelse på resultaterne.

5. KONKLUSIONER.

1. MF-metoden efter ISO/DIS 9308-1 har vist sig som en "stabil" metode med mindre variabilitet end MPN-metoden efter DS 2255. MPN-metoden har en større usikkerhed, og som følge heraf opnås tilsvneladende højere kimtal ved MPN-metoden end ved MF-metoden.
2. På baggrund af de i denne metodeafprøvning opnåede resultater er det ikke muligt at konstatere forskelle i de anvendte isolationssubstrater, men det skal præciseres, at ikke alle isolationssubstrater er afprøvede, idet det store antal heraf umuliggjorde dette under de forhåndenværende forhold.
3. Verifikationsmedierne har voldt en del problemer, og især kan Lauryl Tryptose Mannitol Bouillon med Tryptofan hos mange laboratorier givet tvivlsom eller negativ indolreaktion, hvor denne skulle have været positiv. Laktose Pepton Vand har ligeledes ikke i alle tilfælde givet luftproduktion. Der er tilsvneladende en usikkerhed ved brug af disse to verifikationsmedier.
4. Oxidasetesten har også givet anledning til problemer. Årsagen hertil kan skyldes, at oxidasetesten er lavet på en koloni direkte fra isolationssubstratet, at oxidasetesten er lavet på en fremmed koloni (forurener), fejlafslæsning af oxidasereaktionen, eller at der ikke er anvendt friskfremstillet oxidasereagens.
5. Negativt resultat er angivet meget forskelligt nemlig som 0/100 ml, <1/100 ml, <2/100 ml, <10/100 ml, <100/100 ml og <1000/100 ml. Det burde af ISO/DIS 9308-1 fremgå, hvorledes negativt resultat skal angives.

6. Næsten alle laboratorier havde bemærkninger til ISO/DIS 9308-1, og på grundlag heraf fremhæves følgende punkter:

- a) ISO/DIS 9308-1 er uoverskuelig, idet det virker som om flere metoder er blandet sammen til en, og er besværlig i forhold til MPN-metoden. Den har dog en fordel fremfor MPN-metoden, nemlig at kolonierne lettere kan verificeres og evt. eliminieres ved hjælp af oxidasetesten.
- b) Det er uhensigtsmæssigt med de mange valgmuligheder, hvad angår fortynningsvæsker, isolationssubstrater, inkubationstemperaturer og verifikationsmedier, og en grænseværdi, der alene baserer sig på denne standard, bør ikke angives.
- c) Nye og gamle standarder bør harmoniseres, bl.a. hvad angår autoklavingstemperaturer og pH i substrater. Der bør ikke indføres bouillon/substrat med lille variation i forhold til det allerede kendte.
- d) Der bør angives forslag til filtreringsmængder afhængig af vandtype.
- e) Membranfiltreringsteknikken bør beskrives.
- f) Punkt 8.4.1, 2. afsnit, linie 1 og 2 er uforståelige ligesom punkt 8.1.2, 2. afsnit.
- g) Verifikationsundersøgelserne bør beskrives mere indgående, således at det fremgår, at den koloni man verificerer i f.eks. Laktose Pepton Vand, er den samme som den, man verificerer vha. oxidasetesten. Endvidere bør det fremgå, hvor mange kolonier et repræsentativt antal er, da det er usikkert, om man ved overførsel til f.eks. Laktose Pepton Vand og til Nutrient Agar får fat i coliforme eller ikke coliforme bakterier.
Laktose Pepton Vand og Lauryl Tryptose Mannitol Bouillon med Tryptofan har som tidligere nævnt ikke i alle tilfælde givet luft - henholdsvis indoldannelse, ligesom det ikke af ISO/DIS 9308-1 fremgår, om inkubationen skal foregå i lufttermostat eller vandbad. Det fremgår heller ikke klart, ved hvilket temperaturinterval/hvilken tid Lauryl Tryptose Mannitol Bouillon med Tryptofan skal inkuberes. Endvidere er den i ISO/DIS 9308-1 anvendte tryptonvand dobbelt så stærk som den, der er anvendt i DS 2255.

- h) Der mangler opskrift på Nutrient Agar (indhold, fremstillingsmåde, dyrkningstid og - temperatur), idet denne agar overhovedet ikke er beskrevet. Det burde ligeledes af ISO/DIS 9308-1 fremgå, at/om et andet ligeværdigt substrat kan anvendes.
- i) På Endo-substrat er det sværere at skelne laktose positive fra laktose negative kolonier end på Membranberiget Teepol-Agar og LSA. Dog kan kraftig vækst på disse 2 substrater give tendens til udeblivelse af gult omslag under membranen.
- j) Der mangler angivelse af kemiske formler.
- k) Det er svært at ramme slut-pH på $7,0 \pm 0,1$, hvad angår Phosphat buffer.
- l) En forinkubering på 4 timer kan give problemer mht. arbejdstiden.
- m) En luftinkubator på $44,5 \pm 0,25$ anses for urealistisk og NMKL nr. 125 angiver $\pm 0,5$. Disse krav bør koordineres.
- n) Som tidligere nævnt ønskes det præciseret, hvorledes negativt resultat skal angives.
- o) F = fortyndingen er en misvisende betegnelse. VT og F bør ikke begge indgå i formelen.

7. Tællenniveauet $>20 - <200$ kolonier er for højt på de anvendte filtre.

8. Der ønskes regler for, hvorledes en sammenhængende klump af bakterier skal tælles.

9. ISO/DIS 9308-1 bør på grundlag af ovenstående observationer og bemærkninger revideres en del inden eventuel udgivelse som udkast til Dansk Standard. Præciseringer på baggrund af 5.metodeafprøvning og deltagernes bemærkninger hertil vil blive søgt indarbejdet i dette udkast.

6. REFERENCER.

Jeppesen, Claus: Aeromonas i drikkevand og levnedsmidler. Dansk Veterinær-tidsskrift 1. december 1989, Nr. 23, p. 1363-1372.

Larsen, Holger Errebo, Aalbæk Bent: 1988 "Veterinær mikrobiologi". Bind II p. 6.60-6.64. DSR-Forlag. Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole.

Vejledning fra Miljøstyrelsen. Nr. 2 1985. Kontrol med badevand.

DS 2255: Vandundersøgelse.

Bestemmelse af coliforme bakterier og termotolerante coliforme bakterier.
Fortyndingsmetoden (MPN-metoden).

ISO/DIS 9308-1. Vandkvalitet - Påvisning og optælling af coliforme bakterier, termotolerante coliforme bakterier og presumptive Escherichia coli - Del 1: Membranfiltreringsmetoden. (Uofficiel dansk oversættelse).

7. BILAGSFORTEGNELSE.

	Side
Bilag 1: Udsendte vejledning fra MLK, Odense	34
Bilag 2: Status over forsendelse og modtagelse af analysemateriale	45
Bilag 3: Anvendte substrater og reagenser	46
Bilag 4: Deltagende laboratorier	47
Bilag 5: Homogenitetskontrol	49
Bilag 6: Oversigt over temperaturregistrering samt søjlediagram over temperaturregistrering	51
Bilag 7: Udkrift af modtagne rådata	52
Bilag 8: Grafisk fremstilling	53



ODENSE

MILJØ- OG LEVNEDSMIDDELKONTROLENHEDEN
 LILLE TORNBJERG VEJ 24 . 5220 ODENSE SØ
 TLF. 66 13 13 72

DEN 24. april 1990.
 J. NR. 76.5-3/90-04.
 REF. IS/1b

VEJLEDNING

**Til de deltagende laboratorier i
 Miljøstyrelsens 5. metodeafprøvning.**

Miljøstyrelsen har i skrivelse af 04. april 1990 meddelt gennemførelse af 5. mikrobiologiske metodeafprøvning på vandprøver i uge 20.

Analysematerialet, der vil blive afsendt mandag den 14. maj 1990, består af:

Koncentrat A, B, C, D = 4 koncentrater á 9 ml. til fremstilling af 4 simulerede badevandsprøver (hvor disse 4 koncentrater og yderligere 2 desuden anvendes til interkalibreringen) samt 1 glas mærket med rød tape til temperaturregistrering.

De 4 prøver bedes analyseret for indhold af coliforme bakterier og presumptive Escherichia coli efter uofficiel dansk oversættelse af ISO/DIS 9308-1:

"Vandkvalitet - påvisning og optælling af coliforme bakterier, termotolerante coliforme bakterier og presumptive Escherichia coli - Del 1: Membranfiltreringsmetoden", (vedlagt Miljøstyrelsens brev af 4.april 1990).

Formålet med 5. metodeafprøvning er at afprøve og vurdere ISO/DIS 9308-1 samt sammenligne DS 2255 (MPN-metoden) med ISO/DIS 9308-1 (membranfiltreringsmetoden).

Idet det tilstræbes at give ensartede betingelser for alle deltagende laboratorier og dermed sikre muligheden for at opnå optimale resultater, skal ./. følgende forhold iagttakes, og vedlagte checkliste udfyldes.

Modtagelsesforhold og opbevaring.

Der henvises til det tilsvarende afsnit i vejledning for interkalibreringen side 2 øverst.

Modtagelsestidspunkt, tidspunkt for åbning af containeren samt den aflæste temperatur bedes noteret på såvel checkliste til 10. interkalibrering som checkliste til 5. metodeafprøvning.

Prøverne fremstilles og analyseres i alfabetisk rækkefølge som beskrevet i vejledningen for interkalibreringen, ligesom starttidspunkt for fremstilling af prøve A og temperaturen i lokalet noteres på begge checklister.

Til de laboratorier, der foruden at deltage i interkalibreringen også deltager i metodeafprøvningen:

Der henvises til det tilsvarende afsnit i vejledning for interkalibreringen side 2 nederst.

Fremstilling af de 4 prøver ud fra koncentraterne.

Der henvises til det tilsvarende afsnit i vejledning for interkalibreringen side 3-4.

Analysen.

Af hensyn til bearbejdning af talmaterialet og for at begrænse de arbejdsopgaver, der fremkommer i forbindelse med denne metodeafprøvning, er det væsentligt:

- at membranfiltreringen af de 4 prøver udføres af én og samme laborant med anvendelse af kortest mulig analysetid, og at resultaterne aflæses af én og samme laborant.

Der foretages 48 filtreringer, og hvert laboratorium bedes anvende de tilsendte membranfiltre (Gelman Sciences, product no. 66068, lot no. 9120901, 47 mm i diameter, hvide, rudeinddelte, porestørrelse 0,45 μm , sterile) til samtlige 48 filtreringer.

Det tilsendte isolationssubstrat, Membran Lauryl sulfat Agar (LSA), der i sammensætning svarer til Membran Lauryl sulfat Bouillon, blot er der tilsat 1,5 % agar, bedes anvendt til 24 filtreringer. Det enkelte laboratorium vælger selv et af de øvrige isolationssubstrater (eller 2 - hvis man ikke ønsker at/kan anvende samme substrat til undersøgelse for coliforme bakterier (37°C) som til undersøgelse for presumptive Escherichia coli (44°C)), der er beskrevet i ISO/DIS 9308-1 til de resterende 24 filtreringer. I den forbindelse skal der gøres opmærksom på, at Membranberiget Teepol Bouillon på tilsvarende måde kan tilsættes 1,5 % agar.

Som fortyndingsvæske samt ved filtrering af små prøvemængder, der iøvrigt gennemføres efter de sædvanlige principper for membranfiltrering, bedes laboratorierne anvende Fosfat buffer opløsningen side 20 i ISO/DIS 9308-1.

Til verifikation (luftdannelse) for coliforme bakterier (37°C) vælges Laktose Pepton Vand, mens der til verifikation (luft-samt indoldannelse) for presumptive Escherichia coli (44°C) vælges Lauryl Tryptose Mannitol Bouillon med Tryptofan.

De 4 prøver A, B, C, D filtreres, inkuberes og verificeres, idet der tillige laves oxidasetest, hver på samme måde efter følgende skema:

Eksempel: Prøve A.

Prøvemængde, der filtreres:	Filtret placeres på:	Inkubation:	Verifikation:
2 x 0,1 ml	LSA egent substrat	Disse 6 plader inkuberes ved $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ef- ter evt. præin- kubation.	X-antal kolonier fra hver substrat- type overføres til Laktose Pepton Vand
2 x 1 ml	LSA egent substrat		
2 x 10 ml	LSA egent substrat		
2 x 1 ml	LSA egent substrat	Disse 6 plader inkuberes ved $44 \pm 0,25^{\circ}\text{C}$ ef- ter evt. præin- kubation	X-antal kolonier fra hver substrat- type overføres til Lauryl Tryptose Man- nitol Bouillon med Tryptofan.
2 x 10 ml	LSA egent substrat		
2 x 100 ml	LSA egent substrat		

Kolonitælling foretages efter de sædvanlige principper herfor, mens detaljer vedrørende fremstilling af fortyndingsvæske, substratfremstilling, filtrering, dyrkning, oxidasetest, aflæsning og resultatberegning fremgår af ISO/DIS 9308-1 og denne vejledning. Eventuelle afvigelser fra ISO/DIS 9308-1 noteres på den medfølgende checkliste, og resultatskemaet udfyldes.

Returnering af resultatet.

Skemaerne (resultatskema samt checkliste) returneres i udfyldt stand til:

Miljøstyrelsen
Kemisk-Toksikologisk kontor
Strandgade 29
1401 København K.

Att. dyrlæge Holger Pedersen.

SENEST DEN 29. MAJ 1990.

Ved tvivlspørgsmål såvel forud som under metodeafprøvningen rettes henvedelse til:

Dyrlæge Irene Simoni
Tlf.nr. 66 131372
Lokal 5613.

HUSK KODENUMMER PÅ ALLE ARK OG INGEN UNDERSKRIFT.

Irene Simoni
Irene Simoni

Kodenummer: _____

CHECKLISTE TIL 5. METODEAFPRØVNING.**Husk før modtagelsen:**

- at fremstille fortyndingsvæske (jvf. vejledning) og nedkøle denne til 0-5°C,
- at nedkøle et termometer til 0-5°C.

Modtagelsen:

Container modtaget dato _____ kl. _____
 Container åbnet dato _____ kl. _____
 Temperatur i glas med rød tape _____ °C.

Koncentraterne opbevares ved 0-5°C, indtil det enkelte koncentrat tages i anvendelse.

Undersøgelsen:

Prøverne fremstilles og membranfiltreres i alfabetisk rækkefølge (jvf. vejledning og ISO/DIS 9308-1).

Starttidspunkt for fremstilling af prøve A dato _____ kl. _____
 Temperatur i lokalet _____ °C.

Substrater og reagenser.**Isolationssubstrat ("Eget substrat") til coliforme bakterier.**

Hvilket substrat er anvendt ?: _____

Fabrikat: _____

Batchnr.: _____

Tilvirkningsdato: _____

Afvigelse(r) fra forskrift ISO/DIS 9308-1 JA NEJ

Hvis ja, hvilken/hvilke ? _____

Isolationssubstrat ("Eget substrat") til presumptive Escherichia coli.

Hvilket substrat er anvendt ?: _____

Fabrikat: _____

Batchnr.: _____

Tilvirkningsdato: _____

Afvigelse(r) fra forskrift ISO/DIS 9308-1 JA NEJ

Hvis ja, hvilken/hvilke ? _____

Nutrient Agar Substrat.

Fabrikat: _____

Batchnr.: _____

Tilvirkningsdato: _____

Afvigelse(r) fra forskrift (ISO/DIS 9308-1) JA NEJ

Hvis ja, hvilken/hvilke ? _____

Fosfat buffer opløsning.

Fabrikat: _____

Batchnr.: _____

Tilvirkningsdato: _____

Afvigelse(r) fra forskrift (ISO/DIS 9308-1) JA NEJ

Hvis ja, hvilken/hvilke ? _____

CHECKLISTE TIL 5. METODEAFFPRØVNING.**Laktose Pepton Vand.**

Fabrikat: _____

Batchnr.: _____

Tilvirkningsdato: _____

Afvigelse(r) fra forskrift (ISO/DIS 9308-1) JA NEJ
Hvis ja, hvilken/hvilke? _____**Lauryl Tryptose Mannitol Bouillon med Tryptofan.**

Fabrikat: _____

Batchnr.: _____

Tilvirkningsdato: _____

Afvigelse(r) fra forskrift (ISO/DIS 9308-1) JA NEJ
Hvis ja, hvilken/hvilke? _____**Oxidase reagens.**

Fabrikat: _____

Batchnr.: _____

Tilvirkningsdato: _____

Afvigelse(r) fra forskrift (ISO/DIS 9308-1) JA NEJ
Hvis ja, hvilken/hvilke? _____**Kovacs' indolreagens.**

Fabrikat: _____

Batchnr.: _____

Tilvirkningsdato: _____

Afvigelse(r) fra forskrift (ISO/DIS 9308-1) JA NEJ
Hvis ja, hvilken/hvilke? _____

Er Andrade's indikator anvendt?

 JA NEJ

Bemærkninger:

RESULTATER AF 5. METODEAFPRØVNING.**Prøve A.**

Er der anvendt præinkubation ved 30°C i 4 timer ? JA NEJ

Totale antal bakterier (såvel coliforme som ikke-coliforme) ved 37°C på:

Eget substrat : _____

Tilsendt substrat (LSA): _____

Oxidasetest.

Antal testede kolonier : _____

heraf oxidasepositive : _____

Eget substrat.

Coliforme bakterier.

A	B	N	Vs	Vt	F	C = $\frac{AxNxVsxF}{B \times Vt}$

Presumptive Escherichia coli.

A	B	N	Vs	Vt	F	C = $\frac{AxNxVsxF}{B \times Vt}$

Tilsendt substrat. (LSA)

Coliforme bakterier.

A	B	N	Vs	Vt	F	C = $\frac{AxNxVsxF}{B \times Vt}$

Presumptive Escherichia coli.

A	B	N	Vs	Vt	F	C = $\frac{AxNxVsxF}{B \times Vt}$

Symbolforklaring fremgår af side 9 i ISO/DIS 9308-1.

Bemærkninger til resultater:

Kodenummer: _____

RESULTATER AF 5. METODEAPPRØVNING.

Prøve B.

Er der anvendt præinkubation ved 30°C i 4 timer ? JA NEJ

Totale antal bakterier (såvel coliforme som ikke-coliforme) ved 37°C på:

Eget substrat : _____

Tilsendt substrat (LSA): _____

Oxidasetest.

Antal testede kolonier : _____

heraf oxidasepositive : _____

Eget substrat.

Coliforme bakterier.

A	B	N	Vs	Vt	F	$C = \frac{AxNxVsxF}{B \times Vt}$

Presumptive Escherichia coli.

A	B	N	Vs	Vt	F	$C = \frac{AxNxVsxF}{B \times Vt}$

Tilsendt substrat. (LSA)

Coliforme bakterier.

A	B	N	Vs	Vt	F	$C = \frac{AxNxVsxF}{B \times Vt}$

Presumptive Escherichia coli.

A	B	N	Vs	Vt	F	$C = \frac{AxNxVsxF}{B \times Vt}$

Symbolforklaring fremgår af side 9 i ISO/DIS 9308-1.

Bemærkninger til resultater:

RESULTATER AF 5. METODEAFPRØVNING.

Prøve C.

Er der anvendt præinkubation ved 30°C i 4 timer ? JA NEJ

Totale antal bakterier (såvel coliforme som ikke-coliforme) ved 37°C på:

Eget substrat : _____

Tilsendt substrat (LSA): _____

Oxidasetest.

Antal testede kolonier : _____

heraf oxidasepositive : _____

Eget substrat.

Coliforme bakterier.

A	B	N	Vs	Vt	F	$C = \frac{AxNxVsxF}{B \times Vt}$

Presumptive Escherichia coli.

A	B	N	Vs	Vt	F	$C = \frac{AxNxVsxF}{B \times Vt}$

Tilsendt substrat. (LSA)

Coliforme bakterier.

A	B	N	Vs	Vt	F	$C = \frac{AxNxVsxF}{B \times Vt}$

Presumptive Escherichia coli.

A	B	N	Vs	Vt	F	$C = \frac{AxNxVsxF}{B \times Vt}$

Symbolforklaring fremgår af side 9 i ISO/DIS 9308-1.

Bemærkninger til resultater:

Kodenummer: _____

RESULTATER AF 5. METODEAPPRØVNING.

Prøve D.

Er der anvendt præinkubation ved 30°C i 4 timer ? JA NEJ

Totale antal bakterier (såvel coliforme som ikke-coliforme) ved 37°C på:

Eget substrat : _____

Tilsendt substrat (LSA): _____

Oxidasetest.

Antal testede kolonier : _____

heraf oxidasepositive : _____

Eget substrat.

Coliforme bakterier.

A	B	N	Vs	Vt	F	$C = \frac{AxNxVsxF}{B \times Vt}$

Presumptive Escherichia coli.

A	B	N	Vs	Vt	F	$C = \frac{AxNxVsxF}{B \times Vt}$

Tilsendt substrat. (LSA)

Coliforme bakterier.

A	B	N	Vs	Vt	F	$C = \frac{AxNxVsxF}{B \times Vt}$

Presumptive Escherichia coli.

A	B	N	Vs	Vt	F	$C = \frac{AxNxVsxF}{B \times Vt}$

Symbolforklaring fremgår af side 9 i ISO/DIS 9308-1.

Bemærkninger til resultater:

Kodenummer: _____

RESULTATER AF 5. METODEAFPRØVNING.

Bemærkninger til ISO/DIS 9308-1:

STATUS OVER FORSENDELSE OG MDTAGELSE AF ANALYSEMATERIALE.

Med undtagelse af ganske få laboratorier modtog alle analysematerialet indenfor den forventede tidsramme.

Laboratorier, der modtog analysematerialet udenfor den forventede tidsramme:

Lab.nr.	Container modtaget dato	Container åbnet dato	Temperatur i glas med rød tape °C	Starttidspunkt for fremstilling af prøve A dato	kl.
8	15/5 11.25	15/5 12.15	2,4	15/5	12.25
11	15/5 11.30	15/5 11.35	3,1	15/5	11.40
35	15/5 10.15	15/5 10.15	3,0	15/5	10.20

ANVENDTE SUBSTRATER OG REAGENSER.Laboratoriernes bemærkninger til anvendte substrater og reagenser.

Lab.nr. 8: "Phenolrødt er vanskeligt at fremstille i vandig opløsning.

Stoffet kan lige så godt tilsættes direkte ved blanding/opløsning af ingredienser."

Lab.nr. 10: "Membran Lauryl Sulfat Agar er fremstillet efter forskriften fremsendt d. 24.04.1990. D.v.s. der er brugt 76,2 g af det fremsendte substrat til 1 liter vand."

Lab.nr. 15: "Vedr. Membran Lauryl Sulfat Agar (LSA):

Substratet er strømmet før pH-indstilling p.g.a. agarindholdet. pH indstillet til 7,7 før autoklavering iflg. opskrift. pH før ophældning: 6,8."

Lab.nr. 27: "Vedrørende det tilsendte Membran Lauryl Sulfat Agar.

Vi havde desværre allerede tilberedt vores tilsendte portion efter den først tilsendte forskrift da vi modtog rettelsesbladet. Vi har således afvejet 76,2 g, som er opløst i 1 liter vand."

Lab.nr. 40: "LSA-fremstilling:

1. forsøg: 38,1 gram LSA til 1/2 liter vand. pH indstillet på 7,7, slut pH 7,8. Portionen kasseret.

2. forsøg: Samme mængde LSA til samme mængde vand, men pH ikke indstillet. Slut pH 7,5 - først herefter modtaget telefax ang. 91,2 g/l, substratet derfor lidt for "tyndt", autoklaveret 115°C i 10 min."

Lab.nr. 46: "pH i det tilsendte substrat var inden autoklaveringen 7,7 som anvist, men i det færdige substrat 6,89.

Der blev lavet en ny portion, hvor pH blev indstillet på 8,0 og som efter autoklavering havde pH 7,73. Dette blev brugt."

DELTAGENDE LABORATORIER.

Samlet oversigt over de 44 deltagende laboratorier. Rækkefølgen er uafhængig af laboratoriernes kodenummerering.

Miljø- og Levnedsmiddelkontrolen, 4200 Slagelse.

Levnedsmiddelkontrolen, 7100 Vejle.

N.Ø. Vendsyssels Levnedsmiddel- og Miljøkontrol, 9900 Frederikshavn.

Stadsdyrlægens kontor, 2000 København F.

Levnedsmiddelkontrolenheden, 6400 Sønderborg.

Levnedsmiddelkontrolen I/S, 2740 Skovlunde.

Miljø- og Levnedsmiddelkontrolenheden, 7500 Holstebro.

Levnedsmiddel- og Miljøtilsynet, 8200 Århus N.

Levnedsmiddelkontrolenheden, 7000 Fredericia.

Miljø- og Levnedsmiddelkontrolen I/S, 4600 Køge.

Miljø- og Levnedsmiddelkontrolenheden, 7700 Thisted.

Miljø- og Levnedsmiddelkontrolen, 4800 Nykøbing F.

Miljø- og Levnedsmiddelkontrolenheden, 8600 Silkeborg.

Miljø- og Levnedsmiddelkontrolen, 4300 Holbæk.

Det Fælleskommunale Laboratorium, 7400 Herning.

Miljø- og Levnedsmiddelkontrolen, 6705 Esbjerg Ø.

Levnedsmiddelkontrolen, 5700 Svendborg.

Fælleskommunal Levnedsmiddelkontrol, 2600 Glostrup.

Struer Levnedsmiddelkontrol, 7600 Struer.

Hygiejnisk Forvaltning, 9100 Aalborg.

Bornholms Levnedsmiddelkontrol, 3700 Rønne.

Miljø- og Levnedsmiddellaboratoriet, 4700 Næstved.

Miljø- og Levnedsmiddelkontrolenheden, 5220 Odense SØ.

Miljø- og Levnedsmiddelkontrolen, 3400 Hillerød.

Levnedsmiddelkontrolen I/S, 3600 Frederikssund.

Det Kommunale Laboratorium, 6200 Åbenrå.

Miljø- og Levnedsmiddel-Centret I/S, 8700 Horsens.

Miljø- og Levnedsmiddelkontrolen, 8800 Viborg.

Miljø- og Levnedsmiddelkontrolen, 4100 Ringsted.

Hjørring Kommunale Levnedsmiddelkontrol, 9800 Hjørring.
Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen, 6760 Ribe.
Randers Levnedsmiddelkontrol, 8900 Randers.
Levnedsmiddelkontrollen i København I/S, 1711 København V.
Hygiejnelaboratoriet, 6270 Tønder.
Levnedsmiddelkontrollen. Miljøhygiejnisk Laboratorium, 6100 Haderslev.
Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen, 6800 Varde.
Miljø- og Levnedsmiddelkontrollen, 3000 Helsingør.
Steins Laboratorium, 4100 Ringsted.
Steins Laboratorium, 2620 Albertslund.
A/S Qvist's Laboratorium, 8240 Risskov.
Steins Laboratorium, 7500 Holstebro.
Steins Laboratorium, 6650 Brørup.
Alfred Jørgensen, Gæringsfysiologisk Laboratorium, 1809 V.
Laboratoriet Sjælsø Vandværk, 2970 Hørsholm.

HOMOGENITETSKONTROL

Til homogenitetskontrol er der i alt udtaget 18 koncentrater 9 af hvert prøvepar, benævnt AC₁-AC₉ og BD₁-BD₉. Disse er jævnt fordelt over hele aftapningsperioden. Prøverne er fremstillet efter opbevaring af koncentraterne ved 0-5°C i 24 timer, hvorefter der er foretaget membranfiltrering (MF), udsæd på PCA, samt som det desuden fremgår af rapporten over 10. interkalibrering udsæd i MacConkey bouillon og ved opsætning af sekundærkulturer desuden i tryptovand.

	Prøverne A&C kim pr. 100 ml. 37°C/48t/PCA	Prøverne A&C kim pr. 100 ml. LSA/MF 37°C/24t	Prøverne A&C kim pr. 100 ml. MacConkey/MPN 37°C/48t (indol-positive)	37°C/24t	44°C/24t	44°C/48t
AC ₁	9.500	11.000	1.300	13.000	700	
AC ₂	11.000	9.700	1.400	4.600	790	
AC ₃	10.000	10.000	1.300	33.000	2.200	
AC ₄	10.000	11.000	1.100	17.000	2.300	
AC ₅	11.000	9.600	1.200	7.000	790	
AC ₆	11.000	9.100	1.300	13.000	4.900	
AC ₇	11.000	9.500	1.000	13.000	1.700	
AC ₈	11.000	10.000	1.200	4.900	1.700	
AC ₉	11.000	9.800	1.100	7.900	1.700	
Gennemsnit	11.000	10.000	1.200	13.000	1.900	
Standardafv.	601	646	127	8.752	1.288	

HOMOGENITETSKONTROL

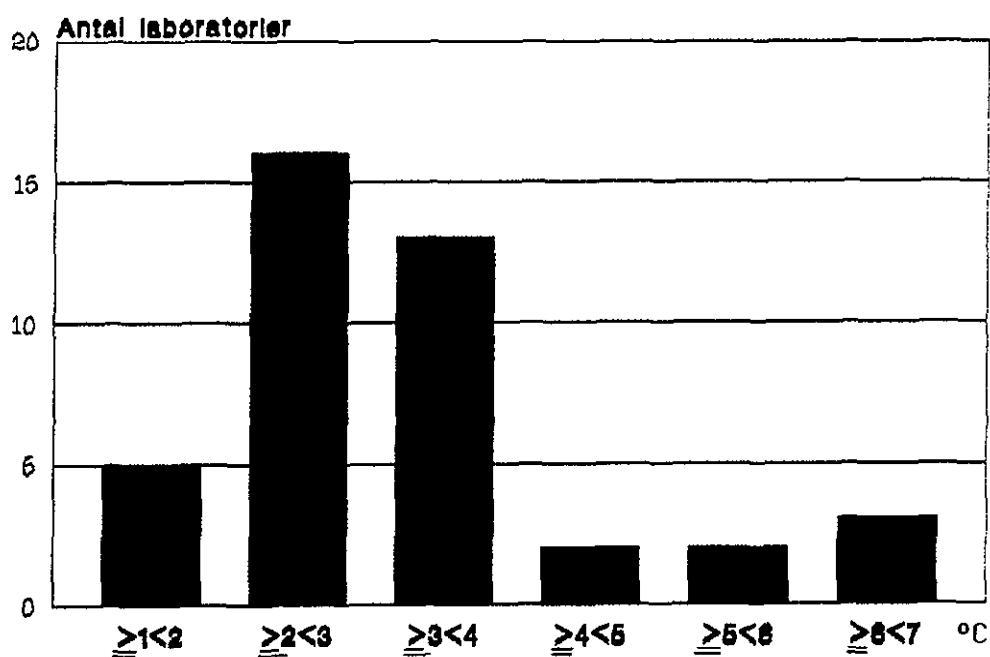
	Prøverne B&D kim pr. 100 ml. $37^{\circ}\text{C}/48\text{t}/\text{PCA}$	Prøverne B&D kim pr. 100 ml. LSA/MF $37^{\circ}\text{C}/24\text{t}$	Prøverne B&D kim pr. 100 ml. MacConkey/MPN $44^{\circ}\text{C}/24\text{t}$	Prøverne B&D $37^{\circ}\text{C}/48\text{t}$	Prøverne B&D $44^{\circ}\text{C}/48\text{t}$ (indol- positive)
BD ₁	7.500	4.000	<1	4.900	<1
BD ₂	7.400	8.900	<1	7.000	<1
BD ₃	7.800	6.200	<1	13.000	<1
BD ₄	6.900	7.100	<1	13.000	<1
BD ₅	9.000	7.300	<1	11.000	<1
BD ₆	8.000	6.300	<1	11.000	<1
BD ₇	8.100	5.200	<1	33.000	<1
BD ₈	6.600	4.500	<1	13.000	<1
BD ₉	9.200	3.500	<1	7.900	<1
Gennemsnit	7.800	5.900	<1	13.000	<1
Standardafv.	867	1.749	0	8.173	0

Efter aflæsningen er de prøver, der er membranfiltrerede testet i Laktose Pepton Vand, Lauryl Tryptose Mannitol Bouillon med Tryptofan samt ved oxidasetesten jvf. vejledning og ISO/DIS 9308-1. Dette resulterede i, at prøverne BD₁ - BD₉ ved 37°C pga. den positive oxidasetest, hver indeholdt <1 coliform pr. 100 ml. prøve.

OVERSIGT OVER TEMPERATURREGISTRERING - 5. METODEAFFRØVNING.Temperaturregistrering i rør med tape ($^{\circ}\text{C}$).

Lab. nr.	$^{\circ}\text{C}$	Lab. nr.	$^{\circ}\text{C}$	Lab. nr.	$^{\circ}\text{C}$
1	Ikke deltaget	18	1,4	36	2,8
2	Ikke deltaget	19	1	37	2,8
3	6	20	2,7	38	1,7
4	3	21	5,0	39	Ikke deltaget
5	2,5	22	3,5	40	2
6	3,9	23	Ikke deltaget	41	Ingen angivelse
7	2,2	24	1,95	42	3,0
8	2,4	25	4	44	3,0
9	Ingen angivelse	26	2,3	45	1,2
10	6	27	2,0	46	3
11	3,1	28	Ikke deltaget	47	2,8
12	Ikke deltaget	29	2,5	48	2,6
13	3	30	Ikke deltaget	49	2,8
14	3	31	3	50	2,8
15	Ingen angivelse	32	6,2	51	2
16	1,7	34	3,0	52	3,6
17	5,1	35	3,0	53	4,0

Søjlediagram over temperaturregistrering:



RESULTATER AF 5. METODEAFPROVNING.

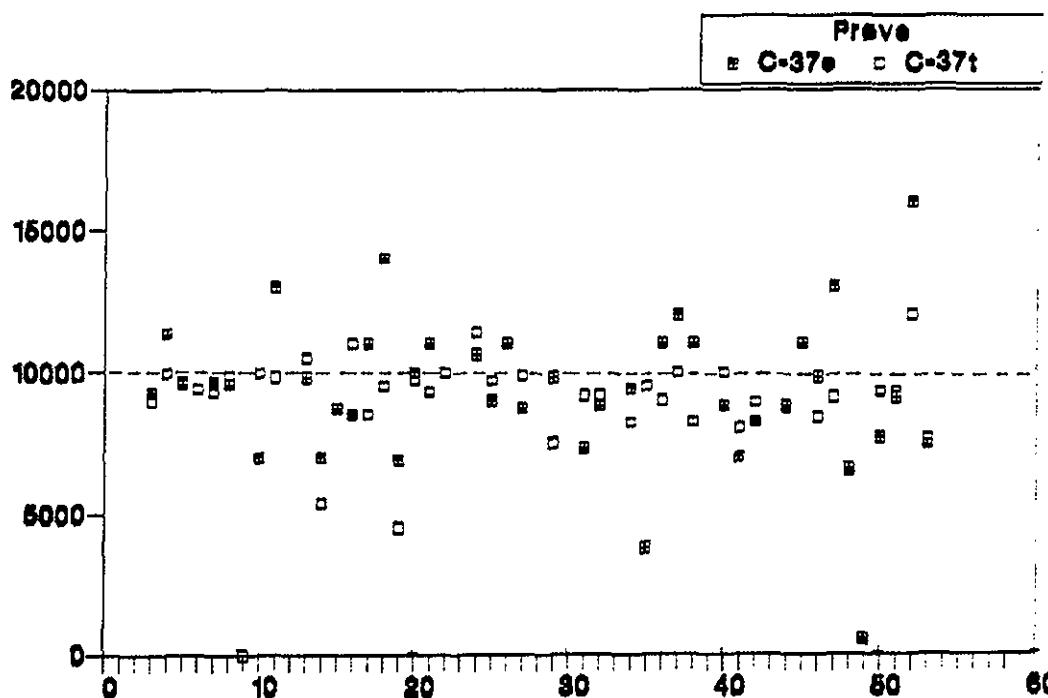
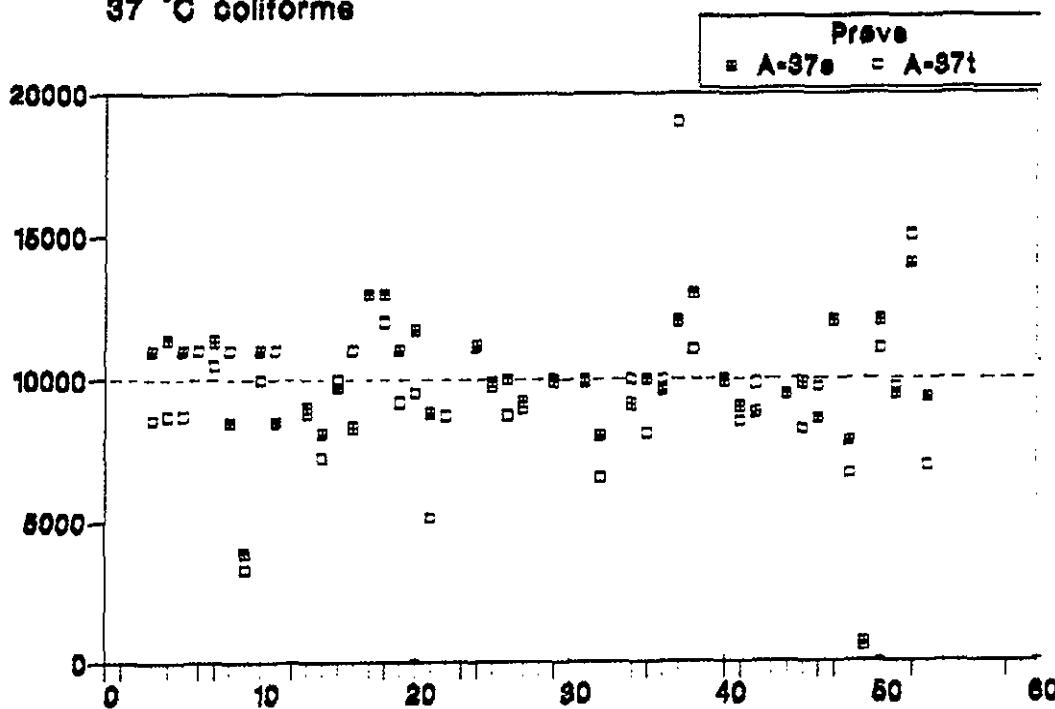
EKS.: A-37e=prove A, 37 C coliforme, eget substrat.

EKS.: A-37t=prøve A, 37 C coliforme, tilsendt substrat.

L nr A-37e A-37t C-37e C-37t A-44e A-44t C-44e C-44t B-37e B-37t D-37e D-37t B-44e B-44t D-44e D-44t

5. METODEAFPRØVNING

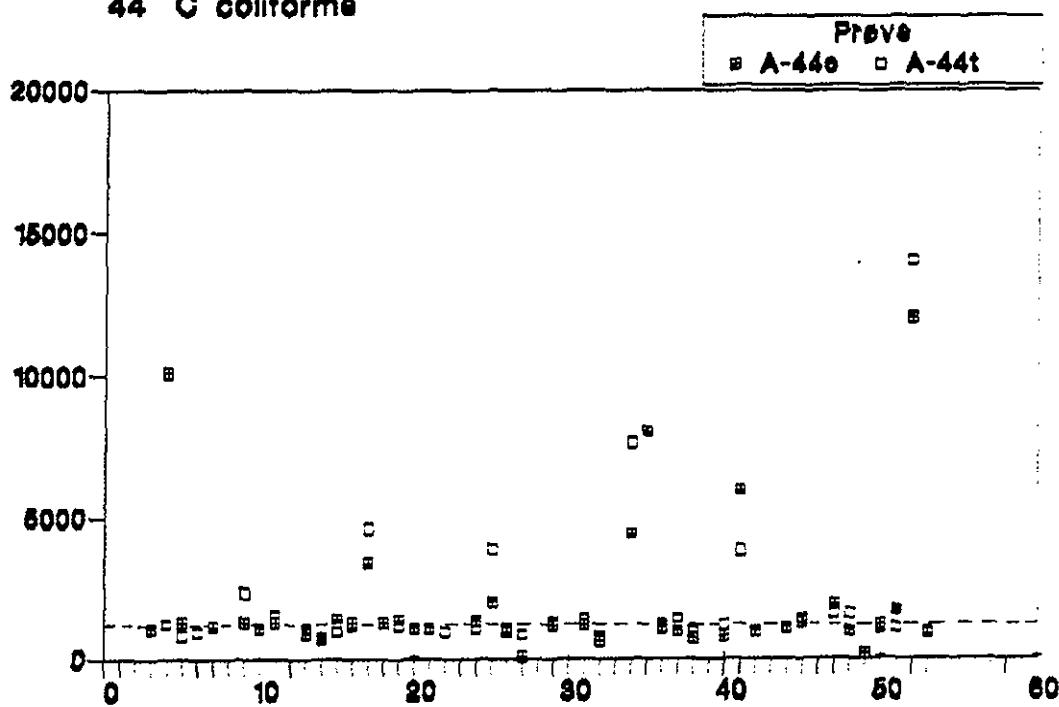
37 °C coliforme



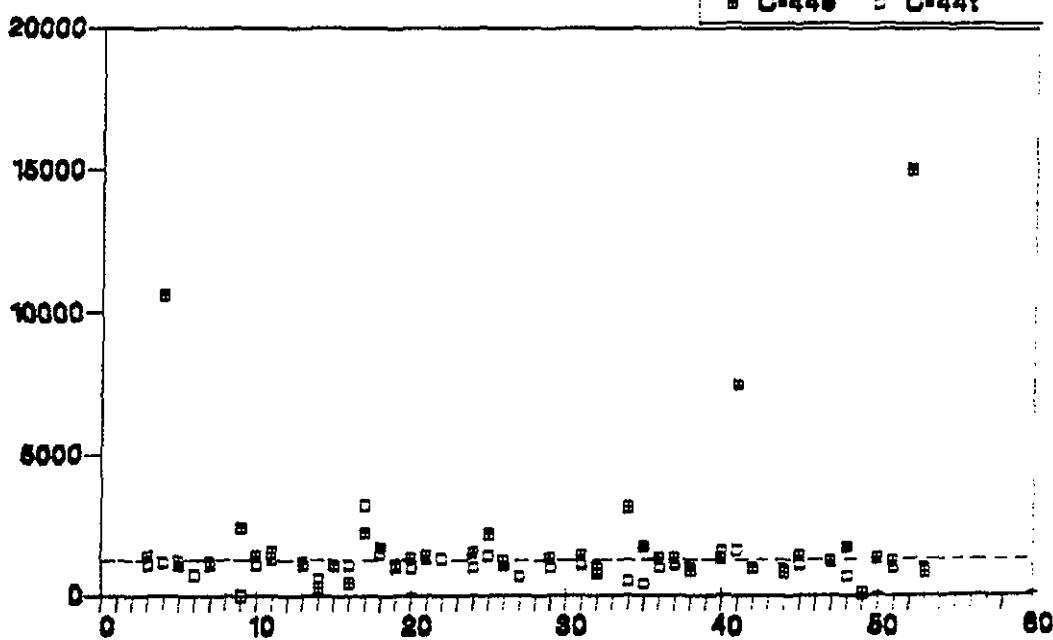
Den stiplede streg angiver Referencelaboratoriets gennemsnitsværdi.

6. METODEAFPRØVNING

44 °C coliforme



Prove
■ C-44e □ C-44t



Den stiplede streg angiver Referencelaboratoriets gennemsnitsværdi.



