

# Interkalibreringsforsøk for bakteriologiske drikkevannsundersøkelser

Av Jørgen Lassen, Kari Ormerod, Ellen Grüner og Ivar Hellesnes

Jørgen Lassen er spesiallege ved Statens Institutt for Folkehelse.

Kari Ormerod er forsker ved Norsk Institutt for Vannforskning.

Ellen Grüner er medisinsk laboratorieingeniør ved Forsvarets Mikrobiologiske Laboratorium.

Ivar Hellesnes er avdelingsveterinær ved Trondheim offentlige kjøtt- og næringsmiddelkontroll. Tidligere ansatt ved Norges Veterinærhøgskole.

Bakteriologiske drikkevannsundersøkelser i Norge utføres enten med den såkalte «Most-Probable-Number»-metoden (MPN-metoden eller «rørfortynningsmetode») eller med en membranfiltermetode (MF-metode). Disse metodene anses prinsipielt for å være likeverdige, men MPN gis likevel forrang som referansemetode.

Metodene har tidligere ikke vært standardisert. Medier, undersøkelsesprosedyrer og avlesningskriterier for hver metode kan derfor ha variert betydelig mellom ulike laboratorier. Det er derfor ikke urimelig å anta at resultatene, og dermed konklusjonene med henblikk på vannets bakteriologiske kvalitet, til dels har vært avhengig av ved hvilket laboratorium undersøkelsene er blitt foretatt.

Norsk Standardiseringsforbund utga i 1977 standardiseringsforslag for såvel prøvetaking (NS 4750) (1) som metoder for bakteriologiske drikkevannsundersøkelser (NS 4751) (2). Hensikten var å søke å innføre standardiserte metoder som kunne anvendes av alle laboratorier som arbeider med slike undersøkelser for å gjøre resultater og konklusjoner mer entydige og «objektive».

I NS 4751 er følgende metoder beskrevet:

1. MPN-metoden hvor man i den presumptive undersøkelsen anvender laktose-pepton-buljong som inkuberes ved 37°C i inntil 48 timer, og i den konfirmative og komplette undersøkelsen anvender den mer selektive brilliantgrønt-gallesaltlaktose-pepton-buljong som inkuberes ved henholdsvis 37°C og 44°C i inntil 48 timer. Ved den komplette undersøkelsen anvendes i tillegg en test for indolproduksjon ved 44°C.
2. Membranfiltermetoden hvor man anvender filtre med porestørrelse 0,45 $\mu$  og vekst på et Endomedium. Følgende varianter er angitt:
  - a) Filteret legges på Endo-agar.
  - b) Filteret legges på en næringspute som impregneres med m-Endo-buljong.
  - c) Filteret legges på prefabrikkert næringspute som inneholder en dehydrert Endo-buljong.

Fordi MPN anses for å være referansemetoden, er det denne som skal anvendes ved første gangs undersøkelser av et vann og også når det skjer uforutsette forandringer i den bakteriologisk-hygiene standard. Membranfiltermetoden anses for velegnet ved rutinekontroller.

Til tross for at det nå foreligger standardiserte fremgangsmåter for såvel prøvetaking som for underøkelsesprosedyrene, er det rimelig å anta at det kan foreligge laboratoriebetingete resultatvariasjoner. Slike variasjoner vil man ventelig kunne finne såvel ved bruk av ulike metoder ved samme laboratorium som ved bruk av samme metode ved ulike laboratorier. Variasjonene kan bero på mange faktorer, blant annet på variasjoner ved medieproduksjonen, inkubasjon, analyse og vurdering ved avlesningen, men også på personellvariasjoner. Det er derfor rimelig å anta at det vil være behov for en effektiv kontroll som tar hensyn til alle slike faktorer og som omfatter såvel interne kvalitetskontroller (f.eks. i form av «batch»-kontroller ved medieproduksjonen, steriliserings-, inkuberings- og arbeidsprosedyrekontroller) som eksterne kvalitetskontroller i form av regelmessige interkalibreringer («ringtester») mellom flest mulig laboratorier.

Det er foreløpig ikke tatt initiativ til et regelmessig ringtestopplegg når det gjelder disse typer undersøkelser i Norge, mens Sverige derimot allerede lenge har hatt et slikt opplegg som gjennomføres regelmessig 1 gang årlig i regi av Statens Bakteriologiske Laboratorium i Stockholm.

Som et prøveprosjekt for et eventuelt ringtestopplegg, er det i Oslo-regionen gjennomført en interkalibrering av bakteriologiske drikkevannsundersøkelser med følgende deltagende laboratorier.

1. Norges Veterinærhøgskole (NVH)
2. Forsvarets Mikrobiologiske Laboratorium (FML)
3. Statens Institutt for Folkehelse (SIF) og (SIF) og
4. Norsk Institutt for Vannforskning (NIVA).

Hensikten var:

1. å finne et uttrykk for resultatvariasjoner ved bruk av samme metode ved ulike laboratorier og
2. å finne et uttrykk for resultatvariasjoner ved bruk av de ulike anbefalte metodene angitt i NS 4751.

#### Materiale og metoder.

Fordi laboratoriene ligger geografisk nær hverandre og transporttiden derfor kunne gjøres meget kort, ble det anvendt naturlige vannprøver fra følgende kilder:

1. Akerselven ved henholdsvis Oset (umiddelbart etter utløpet fra Maridalsvannet), og Frysja (ca. 4—500 meter lenger ned i elven) og
2. Gjærsjøen, tatt fra henholdsvis 30 meters dyp (uttak ved Oppegård Vannverk), og fra utløpet ved Gjersjø bru.

Vannet hadde ikke gjennomgått noen form for rensning eller behandling på forhånd.

Prøvene ble tatt over to perioder for henholdsvis en preliminær og en definitiv undersøkelse. I hver periode ble det tatt 12 dobbeltprøver.

Prøvetakingen ble hver gang gjennomført av én av deltagerne. Det ble anvendt 5 liters store sterile flasker uten noen

tilsetninger, forøvrig ble prøvetakingen utført i henhold til NS 4750. Etter prøvetakingen ble vannet ristet svært godt, fordelt på 1 liters flasker og umiddelbart fordelt til de deltagende laboratorier innen et tidsrom på ca. 1 time. Prøvene ble så oppbevart på laboratoriene i kjøleskap til et avtalt tidspunkt (vanligvis 2—3 timer etter prøvetakingen) hvor alle startet undersøkelsen. I hvert laboratorium ble prøvene hver gang gjennomført av det samme personellet.

Undersøkelsene ble gjennomført i henhold til NS 4751. MPN-metoden såvel som alle tre anførte varianter av MF-metoden ble utført på alle prøvene. Mediene ble produsert på vanlig måte av alle laboratoriene, dels etter oppskrift som anført i NS 4751, dels fra dehydrerte, kommersielle produkter. Til MF-metodene ble det anvendt henholdsvis Millipore-filte HAWG 047 AO og Sartorius membranfilter med Nährkartonscheiben Endo SM 14003. Det er angitt at mediet i Sartorius dehydrerte næringspute er et Endo-medium, men det har ikke lyktes å få rede på detaljene i dette mediums sammensetning. Ifølge produsenten er dette en produsenthemmelighet. Det er derfor ikke urimelig å anta at dette mediet kan avvike noe fra de Endo-mediene som er benyttet ved de to øvrige MF-metodene.

## Resultater.

Resultatet av det preliminare oppsettet er ikke vurdert i detalj. Hovedinntrykket var at resultatene var så uakseptabelt varierende at en nærmere sammenligning ikke var nødvendig. Man antok at dette måtte bero på at laboratoriene i realiteten likevel ikke anvendte nøyaktig de samme metodene. Den påfølgende metodegjen-

nomgåingen avslørte at dette var tilfelle. Til tross for at alle laboratoriene selv mente de fulgte NS 4751, viste det seg at alle hadde gjennomført enkelte avvik. For MPN-metoden var dette tilfelle særlig for inokulasjonsmengden som ble anvendt ved den konfirmative og komplette prøven, samt for vurderingen av hva som skulle anses for å være positiv gassdannelse i Durham-røret. For MF-metodene varierte såvel valg av filtre som sammensetningen av det anvendte Endo-mediet. Videre varierte teknikken for inkubering av skåler i vannbad ved 44°C, samt avlesningskriteriene.

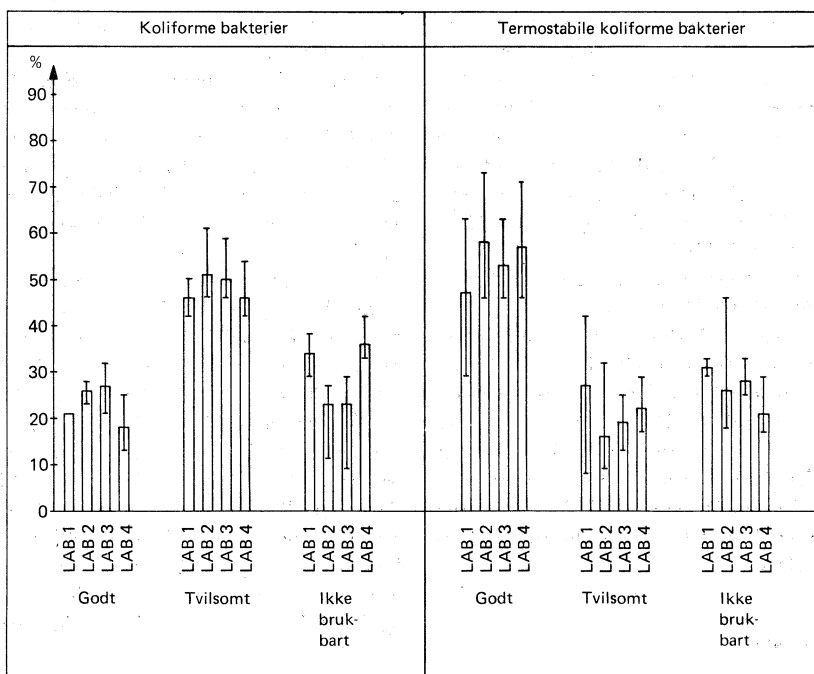
Hvert laboratoriums metodikker ble deretter korrigert og justert i henhold til NS 4751 før det definitive oppsettet ble gjennomført. Det er derfor rimelig å anta at dette oppsettet ble betydelig mer enhetlig gjennomført enn det preliminare, og det er bare resultatene fra dette oppsettet som er vurdert i det følgende.

Resultatene for de ulike metodene utført ved de ulike laboratoriene er sammenlignet med henblikk på konklusjonen for hvilken kvalitetsklasse («Godt», «Tviltsomt» og «Ikke brukbart») prøven plasseres i. Vi har tatt utgangspunkt i de bakteriologiske krav til drikkevann slik de er foreslått i NS 4751 og har i denne sammenheng anvendt de mest «liberale» kravene, nemlig for ubehandlet overflatevann når det gjelder koliforme bakterier, og for drikkevann til enkelthusholdninger når det gjelder termostabile koliforme bakterier (Tabell 1).

I figur 1 er fremstilt andelen (i %) av prøvene som faller innenfor de ulike kvalitetsklassene ved bruk av de forskjellige metodene innen samme laboratorium. Som det fremgår her er variasjonen med henblikk på konklusjonene betydelige. Trekker man konklusjonene på grunnlag av

Tabell 1. De anvendte grenseverdier for henholdsvis koliforme og termostabile koliforme bakterier.

Koliforme bakterier pr. 100 ml vann		Termostabile koliforme bakterier pr. 100 ml vann	
Godt:	< 1	Godt:	< 1
Tvilsomt:	2—30	Tvilsomt:	1—2
Ikke brukbart:	> 30	Ikke brukbart:	> 2



Figur 1. Prosentandelen av prøver som faller innenfor de forskjellige kvalitetsklassene for drikkevann, bedømt ved hvert enkelt laboratorium ved bruk av de ulike metodene. Konklusjonen er trukket på grunnlag av retningslinjer som anført i NS 4751 for henholdsvis ubehandlet overflatevann og vann til enkelthusholdning.

Søylene representerer gjennomsnittsverdien, den vertikale streken markerer variasjonsområdet for alle metodene.

LAB 1—4: Laboratorium 1 til 4.

antall koliforme bakterier vil f.eks. Laboratorium 4 som gjennomsnitt for alle 4 metodene plassere 18% av prøvene i kvalitetsklassen «Godt», varierende fra 13% med den mest sensitive metoden til 25% med den minst sensitive metoden. Laboratorium 3 vil i gjennomsnitt plassere 27% av prøvene i denne kvalitetsklassen, varierende fra 21% til 32% for henholdsvis den mest og minst sensitive metoden.

Mens Laboratorium 4 karakteriserer i gjennomsnitt 36% av prøvene som «Ikke bruktbart» (varierende fra 33% til 43% avhengig av metoden), plasserer Laboratorium 3 i gjennomsnitt bare 23% i denne klassen (varierende helt fra 9% til 29% for de forskjellige metodene).

Trekker man konklusjonene på grunnlag av antall termostabile koliforme bakterier, er variasjonene med henblikk på konklusjonene enda større. Laboratorium 1 vil således i gjennomsnitt for alle metodene plassere 47% av prøvene i kvalitetsklassen «Godt» på dette grunnlag, varierende fra 29% med den mest sensitive metoden til 63% med den minst sensitive. Laboratorium 2 vil gjennomsnittlig plassere 58% av prøvene i denne kvalitetsklassen, varierende fra 46% til 73% avhengig av metoden.

Det er ingen helt klar forskjell i variasjonsbredden mellom de enkelte laboratorier. Laboratorium 1 synes å ha den minste variasjonen mellom sine metoder når det gjelder vurdering av koliforme bakterier, men synes derimot å ha den høyeste variasjonsbredden ved vurderingen av termostabile koliforme bakterier.

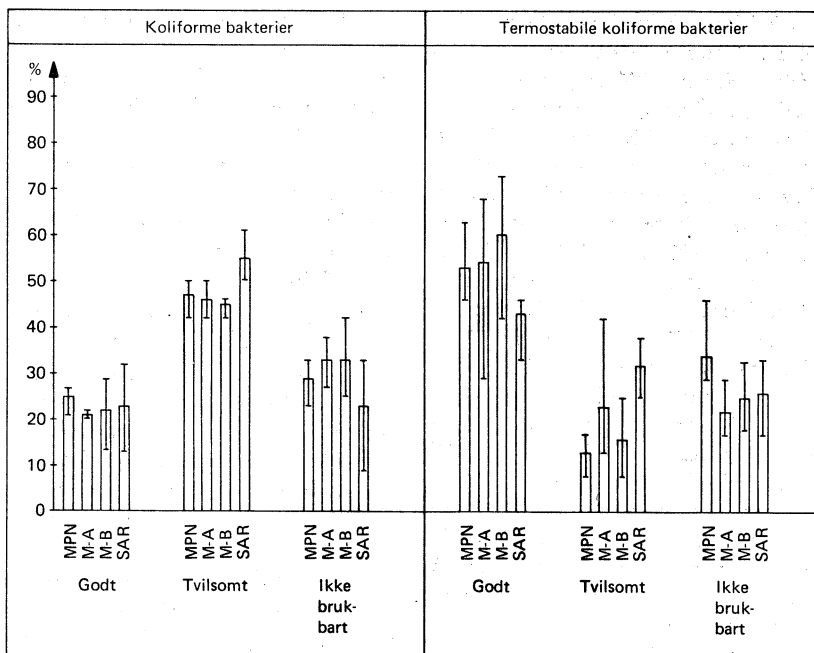
I Figur 2 er på tilsvarende måte fremstilt andelen av prøvene som faller innenfor de forskjellige kvalitetsklassene ved bruk av samme metode ved de ulike laboratorier. Variasjonene er her i samme størrelsesorden som ved bruk av de ulike

metoder innen samme laboratorium. Ved bruk av Sartorius næringspute vil ved vurderingen av koliforme bakterier, andelen av prøver som faller innen kvalitetsklassen «Godt» variere mellom 13 og 32%. Ved vurderingen av termostabile koliforme bakterier vil andelen ved denne metoden variere mellom 33 og 46%, ved bruk av Millipore agar-metoden mellom 29 og 68%.

Ved vurdering av koliforme bakterier er variasjonen noe større ved bruk av Sartorius næringspute enn ved de øvrige metoder. Ved vurdering av termostabile koliforme bakterier er variasjonen noe større for de to Millipore-metodene. Ved begge parametrene er variasjonen ved bruk av MPN-metoden temmelig jevnbyrdig med den beste MF-metoden.

I Figur 3 er de forskjellige metodene sammenlignet med henblikk på overensstemmende og avvikende konklusjoner såvel ved vurdering av koliforme som av termostabile koliforme bakterier. De avvikende konklusjonene er inndelt i avvik mellom henholdsvis «Godt» og «Tvilksomt» (+ ↔ ±), «Tvilksomt» og «Ikke bruktbart» (± ↔ ÷) og «Godt» og «Ikke bruktbart» (+ ↔ ÷).

Ved vurdering av koliforme bakterier stemmer i gjennomsnitt 80% av konklusjonene overens (med en spredning fra 71 til 86% for de forskjellige laboratoriene). Mellom membranfiltermetodene innbyrdes er det en noe større grad av overensstemmelse (fra 80 til 86%) enn mellom membranfiltermetodene og MPN-metoden (fra 74 til 80%). Mellom membranfiltermetodene innbyrdes finnes det ved bruk av denne parameteren ikke avvik mellom «Godt» og «Ikke bruktbart», mens slike avvik finnes i 1–2% av konklusjonene når MPN-metoden sammenlig-



Figur 2. Prosentandelen av prøver som faller innenfor de forskjellige kvalitetsklassene for drikkevann, bedømt for hver enkelt metode utført ved de ulike laboratoriene.

MPN: Rørfortynningsmetoden.

M—A: Membranfiltermetode med bruk av Millipore-agar.

M—B: Membranfiltermetode med bruk av Millipore-buljong.

SAR: Membranfiltermetode med bruk av Sartorius dehydrerte næringspute.

Grunnlag for konklusjonene og øvrig bruk av symboler som i Figur 1.

nes med de ulike membranfiltermetodene.

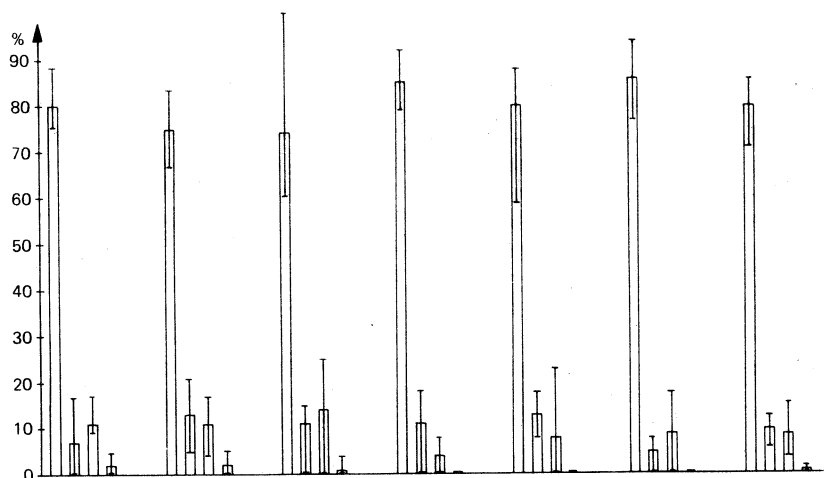
Ved vurdering av termotabile koliforme bakterier er det i gjennomsnitt bare 66% av konklusjonene som stemmer overens (med en spredning fra 62 til 67% for de forskjellige laboratoriene). Hele 7% viste et avvik mellom «Godt» og «Ikke brukbart» (med en spredning fra 3 til 14% for de forskjellige laboratorier). Også her er det bedre overensstemmelse mellom membranfiltermetodene innbyrdes (fra 67 til 73%) enn mellom

disse og MPN-metoden (fra 60 til 63%).

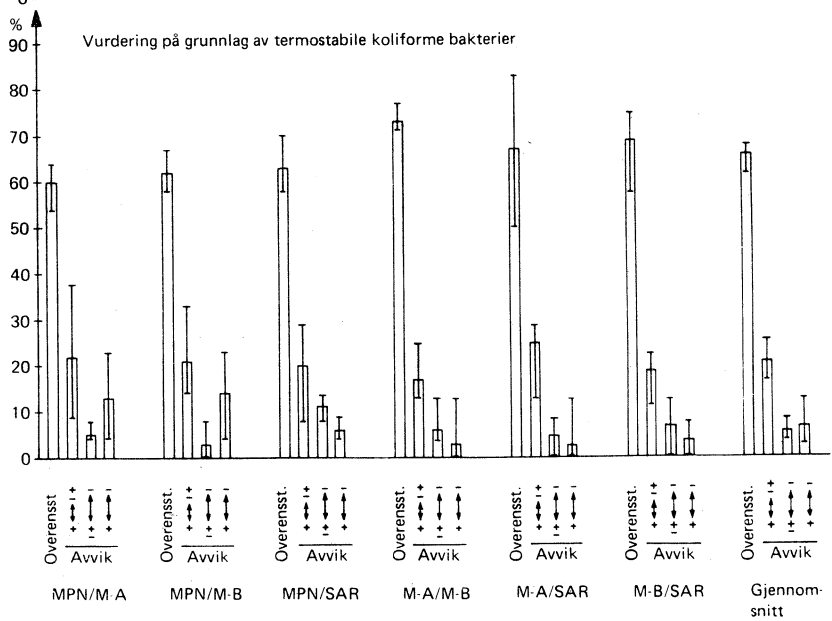
I Figur 4 er på tilsvarende måte foretatt en sammenligning av overensstemmende og avvikende konklusjoner mellom de enkelte laboratorier uansett anvendt metode.

Ved vurdering av koliforme bakterier er det i gjennomsnitt 81% av konklusjonene som stemmer overens (med en spredning fra 75 til 86% for de forskjellige metoder).

Vurdering på grunnlag av koliforme bakterier



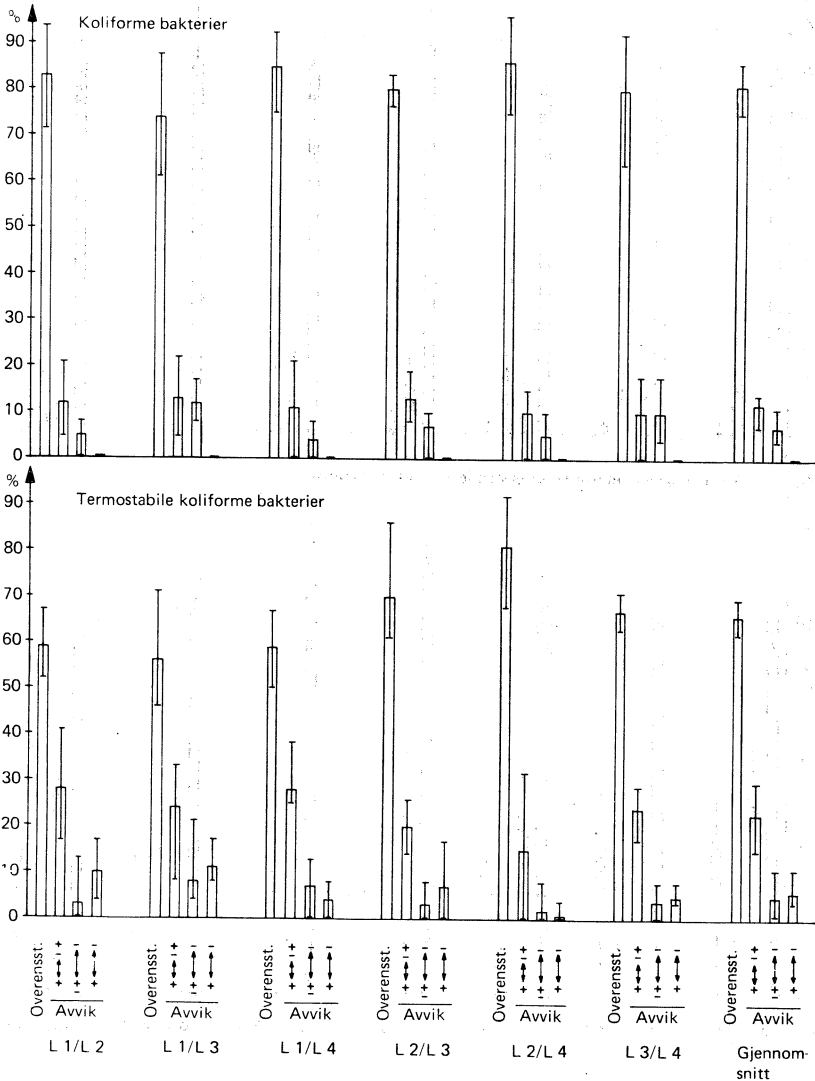
Vurdering på grunnlag av termostabile koliforme bakterier



Figur 3. Variasjon mellom metodene. Prosentandelen av henholdsvis overensstemmende og avvikende konklusjoner ved bruk av de ulike metoder ved samme laboratorium når drikkevannet vurderes på grunnlag av koliforme (øvre del av figuren) og termostabile koliforme bakterier (nedre del av figuren).

- + ↔ ±: Avvik mellom «Godt» og «Tvilsoomt».
- ± ↔ ÷: Avvik mellom «Tvilsoomt» og «Ikke brukbart».
- + ↔ -: Avvik mellom «Godt» og «Ikke brukbart».

Grunnlag for konklusjonene og øvrig bruk av symboler som i Figur 2.



Figur 4. Variasjon mellom laboratoriene. Prosentandelen av henholdsvis overensstemmende og avvikende konklusjoner ved bruk av samme metode ved de ulike laboratoriene når drikkevannet vurderes på grunnlag av koliforme (øvre del av figuren) og termostabile koliforme bakterier (nedre del av figuren). L 1 — L 4: Laboratorium 1 til 4.

Grunnlag for konklusjonene og øvrig bruk av symboler som i Figur 3.



Andelen av overensstemmende konklusjoner i gjennomsnitt varierer fra 74% mellom laboratorium 1 og 3 til 86% mellom laboratorium 2 og 4, men andelen viser til dels betydelig variasjon for de enkelte metoder. Andelen av overensstemmende konklusjoner for den minst overensstemmende metoden mellom laboratorium 1 og 3 er således bare 61%, mens den for den mest overensstemmende metoden mellom laboratorium 2 og 4 er 96%. Ikke mellom noen laboratorier forelå det ved vurdering av denne parameteren et avvik mellom «Godt» og «Ikke brukbart».

Ved vurdering av termostabile koliforme bakterier er andelen av overensstemmende konklusjoner i gjennomsnitt 66% (med en variasjon fra 62 til 70% for de enkelte metoder). Andelen av overensstemmende konklusjoner i gjennomsnitt varierer her fra 56% (laboratorium 1 og 3) til 81% (laboratorium 2 og 4). Avhengig av metoden varierte imidlertid andelen overensstemmende konklusjoner fra 46% (den minst overensstemmende metoden for laboratorium 1 og 3) til 92% (den mest overensstemmende metoden for laboratorium 2 og 4).

## Diskusjon.

For å minimalisere feil som kan skje under prøvetaking og transport, har man ved interkalibrering av bakteriologiske drikkevannsanalyser ofte anvendt arbitrært forurensete vannprøver. Dette er vannprøver som er tilsatt bestemte bakteriespecies i en bestemt konsentrasjon, og hvor man med forskjellige metoder søker å holde bakterietallet konstant. Den manipuleringen som her finner sted vil imidlertid i seg selv kunne påvirke resultatet og avspeiler derfor ikke nødven-

digvis metodenes stabilitet og reproduserbarhet når det gjelder naturlige vannprøver som kan inneholde en bred sammensatt bakteriefloa i forskjellige vekstfaser.

For di de deltagende laboratorier i den foreliggende interkalibreringsanalysen lå geografisk nær hverandre og transporttiden derfor var meget kort, anså man det som en fordel å kunne anvende naturlige vannprøver fra ubehandlede vannkilder.

Ved det første preliminnære oppsettet, mente alle laboratoriene at de fulgte prosedyrene slik disse var anført i Norsk Standard NS 4751, eventuelt at de «få og små» modifiseringer som den enkelte hadde tillatt seg, ville være uten betydning for resultatet. Da man på grunn av uakseptabelt avvikende resultater i dette oppsettet hadde en felles metodegjennomgang, viste det seg at ingen av de fire laboratoriene helt ut fulgte NS 4751. De små avvik man hadde tillatt seg med henblikk på medieproduksjon, undersøkelsesprosedyrer og avlesningskriterier syntes å være tilstrekkelig til å føre til betydelige resultatvariasjoner. Det er derfor åpenbart av stor viktighet at laboratorier som utfører denne type undersøkelser er ytterst påpasselige med å følge metodikken slik den er angitt i NS 4751, og at de ikke lager egen-produserte modifiseringer av denne. På den annen side synes det også nødvendig at metodebeskrivelsene i NS 4751 på en del punkter presiseres, kanskje særlig med henblikk på avlesningskriterier.

Også ved det definitive oppsettet, som fant sted etter en felles nøye metodegjennomgang og hvor resultatene umiddelbart ble ansett for å være vesentlig mer i overensstemmelse enn ved det prelimi-

nære oppsettet, er variasjonene i funnene betydelige.

Ved å sammenligne resultatene med henblikk på konklusjonene for vannets bakteriologiske kvalitet etter de mest liberale retningslinjer angitt i NS 4751, stemmer ca. 80% av konklusjonene overens når man vurderer koliforme bakterier og ca. 66% når man vurderer de termostabile koliforme bakterier. Andelen av overensstemmende/ikke-overensstemmende konklusjoner er av samme størrelsesorden når man sammenligner både den enkelte metode utført ved de ulike laboratorier og de ulike metoder utført ved samme laboratorium. At andelen av ikke-overensstemmende konklusjoner er så meget større ved vurdering av termostabile koliforme bakterier, er ikke betinget av at det foreligger større absolutte avvik i funnene, men av at grensene for kvalitetsklassene her er betydelig snevære.

Andelen av ikke-overensstemmende konklusjoner er noe større når MPN-metoden sammenlignes med de ulike MF-metodene enn når disse sammenlignes innbyrdes. Ved vurdering av koliforme bakterier er det således bare når MPN-metoden sammenlignes med MF-metodene at man finner avvik mellom henholdsvis «Godt» og «Ikke brukbart» (med et gjennomsnitt på inntil 2% av prøvene og med en variasjon fra 0—5% for de enkelte laboratorier). Mellom MF-metodene innbyrdes fantes det derimot for denne parameteren ikke et så stort avvik.

Når man sammenligner konklusjonene på basis av termostabile koliforme bakterier foreligger et avvik mellom henholdsvis «Godt» og «Ikke brukbart» i gjennomsnittlig 6—13% av prøvene når MPN-metoden sammenlignes med MF-meto-

dene, i gjennomsnittlig 3—4% når MF-metodene sammenlignes innbyrdes.

Den større variasjonen mellom MPN-metodene innbyrdes er ikke overraskende. Ved bruk av MPN-metoden vil man teoretisk forvente en viss over-estimering av antall bakterier (3). Dette synes likevel ikke å ha gjort seg gjeldende i denne undersøkelsen, idet MPN-metoden ikke har vært mer «sensitiv» enn de øvrige. Det er imidlertid nemlig å forklare det større avviket mellom MPN- og MF-metodene ved at det her dreier seg om prinsipielt to forskjellige metoder som ikke nødvendigvis fanger inn nøyaktig den samme bakterieflorea i vannet.

Årsakene til de betydelige avvikene mellom såvel ulike metoder som ulike laboratorier kan være mangfoldige. For termostabile koliforme bakterier er inkuberingstemperaturen en selektiv faktor, og således vil små forskjeller her kunne resultere i avvikende resultater, ikke minst ved undersøkelser som anvender Endo-medier. Disse mediene er utarbeidet for inkuberingstemperaturer på 35—37°C. Når inkuberingstemperaturen heves til 44°C vil forholdsvis små variasjoner mellom forskjellige «batcher» av mediet, bruk av forskjellige typer Endo-medier og små avvik fra den stipulerte inkuberingstemperaturen kunne påvirke resultatene i betydelig grad.

Den samlede andelen av ikke-overensstemmende konklusjoner synes likevel å være forbausende høy. Dette gjelder ved sammenligningen såvel mellom de ulike metoder utført ved samme laboratorium som mellom samme metode utført ved de ulike laboratorier, og er desto mer forbausende som undersøkelsene ble utført etter en størst mulig grad av metodestandardisering. Konklusjonen med henblikk på vannets bakteriologiske kvalitet

ei således ikke bare avhengig av vannets reelle kvalitet, men til dels også av hvilket laboratorium som undersøker prøven og hvilken metode som anvendes. Da variasjonene er av samme størrelsesorden både når metodene og laboratoriene sammenlignes innbyrdes, vil det være av like stor betydning med en ytterst nøye og detaljert standardisering av såvel meto-

dene som sådanne som av den tekniske gjennomføringen av undersøkelsene i laboratoriene. I denne sammenheng vil utstrakt bruk av løpende interne kvalitetskontroller være nødvendig og sannsynligvis vil også etablering av eksterne kvalitetskontroller, f.eks. i form av et «ring-test»-opplegg som skissert her, være nyttige.

#### REFERANSER

1. Norsk Standard 4750. Vannundersøkelser. Prøvetaking for bakteriologisk undersøkelse av drikkevann. Norsk Standardiseringsforbund, Oslo, 1976.
2. Norsk Standard 4751. Vannundersøkelse. Metoder for bakteriologisk undersøkelse av drikkevann. Norsk Standardiseringsforbund, Oslo, 1976.
3. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 13th edition. American Public Health Association, Inc., New York 1974.