

Naturstyrelsens Referencelaboratorium for Mikrobiologiske Miljøanalyser

Til: Naturstyrelsen

cc:

Fra: Carsten Grønbæk

Dato: 21. maj 2014

QA: Inger Guldbæk

Emne: Vurdering af alternativ metode til ISO 7899-2 til bestemmelse af enterokokker i drikkevand

Ifølge Drikkevandsdirektivet, Rådets Direktiv 98/83/EF af 3. november 1998 om kvaliteten af drikkevand artikel 7, stk. 5, litra b, kan der anvendes andre metoder end de metoder, der er anført som referencemetoder i bilag III, Del 1, såfremt det kan påvises, at de resultater, der opnås herved, er mindst lige så pålidelige som dem, der opnås ved de angivne metoder. Medlemsstater, der anvender alternative metoder, skal ifølge direktivet meddele Kommissionen alle relevante oplysninger vedrørende disse metoder og deres ækvivalens. Et sådant ækvivalensforsøg er udført af Idexx med henblik på at vise ækvivalens mellem den alternative metode kaldet Enterolertmetoden og referencemetoden anført i drikkevandsdirektivet. Resultaterne af ækvivalensforsøget er evalueret i det nedenstående.

Drikkevandsdirektivets bilag III, Del 1 anfører ISO 7899-2 som referencemetode for bestemmelse af enterokokker. I overensstemmelse hermed kræver dansk lovgivning¹, at metoden DS/EN ISO 7899-2:2000 (MF) skal anvendes ved bestemmelse af enterokokker i drikkevand med påvisningsgrænse 1 CFU/100 ml og anvendelsesområde <1 – 2000 cfu/100 ml.

Omfang af ækvivalensstudiet

Materialet til dokumentation er ækvivalens er sammenholdt med kriterierne for dokumentation af ækvivalens mellem to mikrobiologiske metoder angivet i ISO 17994:2004. Materialet opfylder de givne kriterier med følgende:

- Metoden er beregnet til påvisning af samme organismer.
- Undersøgelsen er udført i henhold til skriftlig protokol.
- Der er gennemført træning forud for studiet.
- De deltagende laboratorier er alle akkrediterede.
- Der anvendes konfirmerede data fra begge metoder.
- Forsøget er udført over et stort geografisk område.
- Der er anvendt både spiked drikkevand og spiked desinficeret drikkevand.

¹ Bekendtgørelse om kvalitetskrav til miljømålinger.

- Prøverne er spikede med 20-50 cfu/100 ml.
- 7 laboratorier har deltaget i studiet.
- Positive fund er konfirmerede.
- Databehandling.
- Rapportering.

Det er Referencelaboratoriet vurdering, at det fremsendte materiale er dækkende til at vurdere ækvivalens for Enterolertmetoden i forhold til referencemetoden i overensstemmelse med kriterierne angivet i ISO 17994.

Resultater af ækvivalensstudiet

En metode er ækvivalent med referencemetoden, når den i henhold til ISO 17994 kan vises at være mindst lige så pålidelig.

Ved referencemetoden påvises enterokokker som de mikroorganismer, der kan vokse på Slanetz og Bartleys agar som røde kolonier, og som kan konfirmeres ved dyrkning på galdeesculinagar, hvor de danner sorte kolonier ved spaltning af esculin.

Ved Enterolertmetoden² påvises enterokokker udelukkende som de mikroorganismer, der besidder β -glucosidase enzymaktivitet. Når enterokokker omsætter 4-methylumbelliferone- β -D-glucoside ved hjælp af β -glucosidase frigives 4-methylumbelliferone som fluorescerer. Enterolertmetoden giver et MPN resultat baseret på tilstedeværelse eller fravær af fluorescens i 51 individuelle brønde², som indeholder en blanding af prøve og substrat.

Ækvivalensstudiet viser, at Enterolertmetoden ved analyse af ikke-desinificeret drikkevand giver signifikant højere fund end reference metoden og med en gennemsnitlig relativ forskel på 20,4 %. Det kan forklares ved, at det flydende vækstmedium anvendt i Enterolertmetoden bedre regenererer stressede og beskadigede celler fremfor det faste substrat i referencemetoden. Der forekommer tilfælde, hvor enterokokker udviser enzymaktivitet, men ikke er i stand til at vokse frem på dyrkningsmediet. En anden forskel er, at Enterolertmetoden anvender mere anaerob inkubation i lukket QuantiTray end referencemetodens inkubation af filtret på en agaroverflade i en petriskål. Membranfiltrering i referencemetoden resulterer i usikkerhed forårsaget af variationer i kvaliteten af membranfiltret, utilstrækkelig kontakt mellem filteret og agaroverfladen, og på konfirmeringssubstratet galdeesculinagaren vil intensiteten af den positive reaktion (sortfarvning) afhænge af kolonistørrelsen og celletætheden og dermed øge subjektiviteten ved aflæsningen. Det betyder alt i alt, at Enterolertmetoden har en større følsomhed end referencemetoden.

Ækvivalensstudiet viser også, at der ved Enterolertmetoden forekommer ca. 0,3 % falsk positive enterokokker, hvilket skyldes, at andre nærtbeslægtede bakteriearter også udviser β -glucosidase aktivitet. I ækvivalensstudiet er der tale om streptokokker tilhørende Lancefield gruppe D streptokokker. Referencemetoden finder enterokokker i almindelighed og ikke udelukkende intestinale enterokokker. Det er således anført i indledningen til ISO 7899-2 at *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* og *E. hirae* kan påvises ved metoden. Yderligere kan påvises andre enterococcus arter og nogle arter af *Streptococcus*, hovedsagelig *S. bovis* og *S. equinus*. Disse streptococcus arter overlever ikke længe i vand og tælles sandsynligvis ikke kvantitativ. Ved undersøgelse af vand kan enterokokker betragtes som indikatorer på fækal forurening. Det skal dog bemærkes at nogle enterokokker påvist i vand af og til kan have anden oprindelse.

² Enterolert består af en ampul med pulver som skal blandes med 100 ml prøve, Blandingen hældes i en bakke, som når den lukkes ved sammensvejsning bliver til 51 "brønde" svarende til 51 delprøver. Efter inkubering aflæser bakken og resultatet udregnes ved MPN-teknik baseret på 51 delprøver.

På et niveau, der kan måle 1 CFU per 100 ml, svarende til kontrol af drikkevandsbekendtgørelsens krav om at der ikke må kunne påvises enterokokker, er usikkerheden ved Enterolertmetoden fra 0,3 til 5,6 MPN/100 ml. Ved referencemetoden findes usikkerheden på resultatet 1 CFU pr. 100 ml at være 0,7 til 1,4 cfu/100 ml. På dette niveau er usikkerheden således større for Enterolertmetoden end for referencemetoden, dette tilskrives MPN teknikken.

I henhold til ISO 17994 er kriteriet for godkendelse af alternativ metode, at den gennemsnitlige relative differens mellem de konfirmerede resultater ved referencemetoden og den alternative metode ikke påvises at være forskellige ved statistisk analyse af resultaterne. Enterolertmetoden opfylder dette kriterium og må derfor anses for at være ækvivalent med referencemetoden. Ækvivalens opnås uanset, at der forekommer falsk positive prøver og uanset, at konfidensintervallet omkring påvisningsgrænsen (1CFU) er større end for referencemetoden.

Enterolertmetoden er, set fra et analytisk synspunkt, bedre end referencemetoden, fordi den finder flere bakterier. Kriteriet for ækvivalens i henhold til ISO 17994 er, at den alternative metode er mindst lige så god som referencemetoden, dvs. finder mindst lige så mange bakterier. At man ved metoden finder flere positive prøver end ved referencemetoden, er i den sammenhæng ikke et problem., Det fortæller, at Enterolertmetoden er bedre til at påvise mikroorganismene end referencemetoden.

Tekniske fordele og ulemper ved den alternative metode, Enterolert

Fordele ved Enterolertmetoden i forhold til referencemetoden ISO 7899-2:

- Samme påvisningsgrænse som referencemetoden
- Samme anvendelsesområde som referencemetoden
- Ingen produktion af medier
- Ingen verifikationer
- Hurtigere end referencemetoden: For negative resultater 24 timer mod 48 timer ved referencemetoden. For positive prøver kræver ISO 7899-2 to ekstra døgn.
- Mindre personaleforbrug end ved referencemetoden, da der hverken skal produceres eller kontrolleres substrater, og fordi der ingen konfirmation skal foretages.
- Hurtig og præcis aflæsning, da der kun tælles blå fluorescerende brønde og ikke kolonier.
- Længere holdbarhed af de færdigfremstillede medier end de brugsklare medier anvendt i referencemetoden.

Ulemper ved Enterolertmetoden i forhold til referencemetoden ISO 7899-2:

- Der er kun én leverandør af analysekittet.
- Der synes ikke umiddelbart at være analyse-mæssige ulemper ved anvendelse af Enterolertmetoden. Dette baseres på Eurofins' erfaringer som deltager i afprøvning af Enterolertmetoden på badevand i forbindelse med ækvivalensstudiet udført af Idexx i 2007.

Anvendelse af Enterolertmetoden til drikkevandsprøver i Danmark

Dansk drikkevand adskiller sig fra drikkevand i andre europæiske lande ved kun at bestå af grundvand, som ikke bliver desinficeret ved tilsætning af klor.

Ækvivalensstudiet omfatter både vand med og uden klor, og det er Referencelaboratoriets vurdering, at metoden derfor kan anvendes til drikkevand i Danmark.

Enterokokker forekommer typisk i drikkevand i forbindelse med forureninger, og forekomst i drikkevand tyder på fækal forurening, idet bakterierne forekommer i menneskers og dyrs tarmkanal. Som udgangspunkt vurderes der ikke at være forskelle på danske og udenlandske forhold, når det gælder forureningens art. Enterococcus faecalis og Enterococcus faecium vil almindeligvis være forbundet med fækal forurening af human oprindelse og begge typer detekteres ved Enterolertmetoden.

Idet metoden er mere følsom, jf. ovenstående, må man ved anvendelse af Enterolertmetoden forvente højere fund af enterokokker. Danmark har ikke deltaget i nærværende afprøvning af Enterolertmetoden på drikkevand, og det er derfor uvist, hvor stor forskellen vil være for dansk drikkevand. Det er også uvist, om højere fund vil resultere i flere fund. Spørgsmålet er, om man med Enterolertmetoden vil finde enterokokker i lavt niveau, som man grundet referencemetodens ringere følsomhed ikke tidligere har fundet, svarende til de erfaringer, man har fået med anvendelse af Colilertmetoden i forbindelse med påvisning af coliforme bakterier. I så fald vil metodeskift hos vandforsyningerne kunne resultere i flere opfølgninger og afhjælpning med korrigerende og forebyggende handlinger, uden at den sundhedsmæssige kvalitet af drikkevandet vil være forskellig fra målinger med referencemetoden. Idet måling af enterokokker i henhold til nugældende lovgivning kun foretages i tilfælde af fund af E. coli sker det med lav frekvens og problemet vurderes ikke at kunne få samme omfang som med coliforme bakterier.

Den kortere analysetid vil muliggøre hurtigere opfølgning og afhjælpning af eventuelle problemer.

Konklusion

Det er referencelaboratoriets vurdering, at Enterolertmetoden er ækvivalent med referencemetoden ISO 7899-2 for bestemmelse af enterokokker i drikkevand i Danmark.

Påvisningsgrænsen 1 CFU/100 ml og anvendelsesområdet fra <1 til 2000 CFU/100ml er det samme for Enterolertmetoden og referencemetoden ISO 7899-2. Enterolertmetoden er mere følsom end referencemetoden ISO 7899-2, men ækvivalensstudiet viser at der forekommer falsk positive resultater ved anvendelse af enterolertmetoden i et omfang på 0,3 %. Måleusikkerheden er for Enterolertmetoden ved 1 CFU pr. 100 ml større end ved referencemetoden, men dette kompenseres i nogen grad af at Enterolertmetoden er mere følsom.

Analyseteknisk er der flest fordele ved anvendelse af Enterolertmetoden frem for referencemetoden. Enterolertmetoden resulterer i hurtigere resultater end referencemetoden, fordi der ikke kræves konfirmeringstest, metoden er specifik og det endda med større sensitivitet. Den kortere analysetid giver mulighed for hurtigere reaktion i tilfælde af overskridelser.

Der kan forventes højere fund af enterokokker ved anvendelse af Enterolertmetoden end ved anvendelse af referencemetoden ISO 7899-2. Analyseteknisk er det ikke et problem, for det er et udtryk for, at metoden er bedre egnet til påvisning af enterokokker. Om det højere fund vil få større betydning for vandforsyningerne, kan ikke vurderes på det foreliggende grundlag, men almindeligvis vil flere fund kræve flere korrigerende og forebyggende handlinger hos vandforsyningerne. At anvendelse af enterolertmetoden resulterer i højere fund end referencemetoden er ikke nødvendigvis ensbetydende med, at anvendelse af metoden vil resultere i flere fund.