

Miljøstyrelsens Referencelaboratorium for Kemiske og Mikrobiologiske Miljømålinger

NOTAT

Til: Følgegruppen for Miljøstyrelsens Referencelaboratorium

CC:

Fra: Peter Høj Medom

Dato: 12-12-2024

QA: Anne Richter og Mette Østergaard Filsø

Emne: MM0001 - Specificering af inkubationstemperatur og -tid i metodedatabladet.
Hensyntagen til, at MM0002 bestemmer samme parameter.

Problemstilling

Referencelaboratoriets metodedatablad MM0001 /1/ foreskriver anvendelse af analysemetoderne ISO 9308-2, Colilert 18 eller Colilert 24 til bestemmelse af *E. coli* og coliforme bakterier i drikkevand. Desuden kan metoderne anvendes til bestemmelse af *E. coli* i bassinvand i forbindelse med opfølgning på høje kimtal. Ifølge ISO 9308-2 /2/ er inkubationsforholdene $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i 18-22 timer, hvor Colilert 18 /3/ og Colilert 24 /4/ har en inkubationstemperatur på $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ i henholdsvis 18-22 timer og 24-28 timer i henhold til IDEXX (se oversigt i Tabel 1).

Tabel 1: Inkubationsbetingelser for metoderne angivet i metodedatablad MM0001.

Metoder	Tid	Temperatur	MPN-bakker
ISO 9308-2	18-22 timer	$36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	Quanti-Tray/ Quanti-Tray2000
Colilert 18	18-22 timer	$35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	Quanti-Tray/ Quanti-Tray2000
Colilert 24	24-28 timer	$35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	Quanti-Tray/ Quanti-Tray2000

Metodedatablad MM0001 /1/ angiver ikke specifikke inkubationsforhold for analysemetoderne ISO 9308-2, Colilert 18 eller Colilert 24, selvom der forekommer visse forskelle mellem dem. Dette notat undersøger inkubationsforholdenes indvirkning på væksten af coliforme bakterier med henblik på at komme med anbefalinger til, om inkubationstemperatur og -tid skal specificeres i metodedatablad MM0001. Det undersøges desuden, om der er behov for specificering af krav til opbevaringstemperatur og -tid mellem prøvetagning og analyse.

Da metodedatablad MM0002 /17/ også bruges til bestemmelse af *E. coli* og coliforme bakterier, skal der tages hensyn til, om de foreslåede ændringer også får betydning for dette metodedatablad.

Baggrund

Metoder

Metoderne angivet i metodedatablad MM0001 anvender defineret substrat teknologi (DST) til at detektere coliforme bakterier og *E. coli* /2, 3, 4/. Her udnyttes det, at coliforme bakterier har enzymet β -galactosidase, som ved metabolisering af ortho-nitrophenyl-galactoside (ONPG) danner et produkt, der udløser et farveskift til gult. Derudover indeholder *Escherichia coli* enzymet β -glucuronidase, som ved metabolisering af 4-methylumbelliferyl glucuronide (MUG) danner et fluorescerende produkt. Antallet af coliforme bakterier og *E. coli* kan kvantificeres som henholdsvis antal gule brønde (coliforme bakterier) og antal gule fluorescerende brønde (*E. coli*) i Quanti-Tray eller Quanti-Tray/2000.

Ifølge ISO 9308-2 /2/ kan aflæsningen foregå mellem 18-22 timer. Brøndene deles op i fire kategorier:

- 1) Mellem 18-22 timer: Brønde, som er mindst lige så gule som Quanti-Tray comparator betragtes som værende positive for Coliforme bakterier.
- 2) Mellem 18-22 timer: Brønde, hvor 1) er gældende, og som udviser nogen grad af fluorescens, betragtes som værende positive for *E. coli*.
- 3) Mellem 18-22 timer: Brønde, som er gule, men dog mindre gule end Quanti-Tray comparator, skal inkuberes i op til 22 timer inden aflæsning foretages. Hvis der er forekomst af brønde med svag gulfarvning, kan aflæsningen ikke afsluttes, førend 1) bliver gældende (positivt fund) eller der er gået 22 timer (negativt fund).
- 4) Mellem 18-22 timer: Brønde, som ikke udviser gulfarvning, vil betragtes som værende negative.

Hos IDEXX angives det, at aflæsningen kan foretages efter 18 timer ved Colilert 18, men inkubationen kan foregå i op til 22 timer (18-22 timer), hvor resultaterne vil være valide /3/. Det samme gælder for Colilert 24, hvor aflæsningen kan foretages efter alt fra 24-28 timer. Hos IDEXX vurderes det, at alle brønde i Quanti-Tray eller Quanti-Tray/2000, som er mindst lige så gule som Quanti-Tray comparator mellem 18-22 timer (Colilert 18) og 24-28 timer (Colilert 24) er positive uden yderlig vurdering af brønde, hvor gulfarvning er mindre end Quanti-Tray comparator /4/.

Colilert 18 og Colilert 24 blev implementeret i forbindelse med et metodeskift, hvor DS 2255 blev erstattet med Colilert 18 og 24 til bestemmelse af coliforme bakterier og *E. coli* i drikkevand. På daværende tidspunkt var inkubationsforholdene for Colilert 18 og 24 henholdsvis 18 timer og 24 timer ved $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ /5/. Validering af Colilert 18 er foregået i henhold til ISO 17944 og ISO 13843 af IDEXX, hvor inkubationsforholdene har været $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i 18-22 timer /6,7/. Colilert 18 er efterfølgende blevet internationalt evalueret og udgivet som ISO 9308-2 med inkubationstemperatur og -tid på henholdsvis $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ og 18-22 timer /2/. Ud fra Colilert 18-valideringen fra IDEXX fremkom det, at der var en lille forøgelse af antal positive fund (brønde) for *Klebsiella pneumoniae* efter 22 timer i forhold til efter 18 timer. Derudover var der en større forøgelse af antal positive brønde for *Citrobacter freundii* efter 22 timer i forhold til efter 18 timer. Det blev i denne sammenhæng antaget, at stammen for *Citrobacter freundii* var mere langsomt voksende og havde svagere enzym aktivitet end andre coliforme bakterier /7/.

I 2020 blev der også foretaget en AFNOR-validering af Colilert 18, hvor metoden blev valideret op imod ISO 9308-1, som er en membranfiltreringsmetode til bestemmelse af *E. coli* og coliforme bakterier og er angivet i metodedatablad MM0002 /17/. Under metodesammenligningen blev der podet med *E. coli* og *Citrobacter freundii*, hvor inkubationsforholdene var $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i 18-22 timer. Resultaterne efter Colilert 18 var under disse forhold tilfredsstillende i sammenligning med ISO 9308-1. I interlaboratoriestudiet under denne validering blev prøverne podet med *E. coli*, og aflæsningen af prøverne blev foretaget

efter 18 timer ved $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for Colilert 18. Resultaterne var igen tilfredsstillende i forhold til ISO 9308-1 /11/.

Definition af coliforme bakterier

Ifølge WHO /8/ defineres coliforme bakterier som værende aerobt og fakultativt anaerobt, Gram-negative, ikke spordannende og laktosefermenterende bakterier. Som en del af laktosefermenteringen produceres enzymet β -galactosidase. Gruppen coliforme bakterier indeholder mange flere slægter end de traditionelle, så som *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* og *Enterobacter*. Den indeholder blandt andet også slægter som *Serratia* og *Hafnia*. Det betyder, at gruppen af coliforme bakterier både indeholder arter, som har fækalooprindelse og arter, der forekommer naturligt i miljøet. Coliforme bakterier kan dermed ikke anvendes som en entydig indikator for fækale patogene bakterier, men fund af coliforme bakterier vil give en indikation af forholdene i vandledningsnettet i forhold til renlighed. Desuden har coliforme bakterier potentiale til at danne biofilm i vandledningsnettet.

Slægter som blandt andet *Citrobacter* og *Klebsiella* er kendt for at indeholde thermotolerante coliforme bakterier (ligesom *E. coli*) og kan forekomme i miljøet (f.eks. i vand og jord) såvel som i mennesker og dyr /8, 9, 10/. *Citrobacter spp.* er et opportunistisk patogen og er blandt andet associeret med nosokomielle blodinfektioner og intraabdominal absces. *C. freundii* antages at stå for mere end 80 % af infektionerne hos svækkede indlagte patienter /9/. *Klebsiella pneumoniae* er også et opportunistisk patogen og kan kolonisere i luft- og fordøjelsesveje hos mennesker, hvilket kan føre til infektioner /10/. *Serratia*, én af de ikke-traditionelle slægter, forekommer normalt i vand og jord, men er også associeret med planter, insekter og dyr. Antallet af humane infektioner, som skyldes *Serratia spp.* er relativt lavt, hvor *S. marcescens* står for langt størstedelen af dem. *S. marcescens* er blandt andet associeret med infektioner i centralnervesystemet (meningitis), urin- og luftveje, samt infektioner i blodbanen /12/. Ifølge nyere studier er der dog en stigning i antal sager vedrørende multiresistens og nosokomielle infektioner associeret med *S. marcescens* /15/.

Miljøfaktorer påvirkning på coliforme bakterier

I henhold til ISO 9308-2 /2/ må opbevaringstiden fra prøveudtagning til analysestart være 18 timer, hvis prøven opbevares ved $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$. I særlige tilfælde må opbevaringstiden være 24 timer ved $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Ifølge ISO 19458 /13/ må disse opbevaringsbetingelser ikke overskrides, da det kan have en signifikant betydning for overlevelsen af mikrofloraen, da vand er et næringsfattigt miljø.

Temperatur og manglende næring er stressfaktorer, som kan give anledning til, at bakterieceller enten går til eller bliver beskadigede /14/. Stressfaktorer påvirker den bakterielle vækst, og nogle bakterier er mere langsomt voksende og/eller har en længere tilpasningsperiode til et nyt miljø end andre bakterier. Desuden kan miljøet, hvor bakterier stammer fra, have en indvirkning på den bakterielle vækst, og indvirkningen kan være forskellig blandt bakterier i samme bakteriepopulation /16/.

Løsning

Inkubationstemperatur og -tid

Gruppen af coliforme bakterier består af flere forskellige slægter, som forekommer naturligt i miljøet og/eller kan være af fækal oprindelse. Denne gruppe er ikke særlig godt defineret, og det må derfor forventes, at der vil være stor variation med hensyn til den bakterielle vækst og enzymatisk aktivitet. Nogle coliforme bakterier er mere associerede med humane infektioner end andre, men analysemetoderne vil kun kunne påvise det totale antal coliforme bakterier.

Referencelaboratoriet vurderer, at der skal tages hensyn til, at nogle coliforme bakterier kan være mere langsomt voksende og/eller har en svagere enzymatisk aktivitet. For tidlig aflæsning kan potentielt resultere i falske negative resultater eller underestimering af

resultatet, hvilket kan have stor betydning, da coliforme bakterier kan indikere, at der er tale om en fækal forurening og/eller der er problemer med renligheden i systemet. I denne sammenhæng vurderes det, at aflæsningsproceduren angivet i ISO 9308-2, hvor der tages hensyn til svagt gulfarvede brønde, bør følges. Det vil betyde, at aflæsningen i nogle tilfælde ikke kan afsluttes, før der er gået 22 timer.

Referencelaboratoriet anbefaler, at Colilert 18 og Colilert 24 fjernes som referencer fra metodedatabladet MM0001, da disse metoder ikke tager hensyn til svagt gulfarvede brønde, samt for at opnå en ensretning af inkubationstemperaturer og aflæsningstid, da disse to faktorer har stor betydning for resultatet.

Det anbefales, at aflæsningsproceduren i ISO 9308-2 følges for at tage hensyn til langsomt voksende coliforme bakterier. Inkubationsforhold og aflæsningskarakteristika bør angives i metodedatabladet for at sikre en ensartet aflæsning.

Opbevaringstemperatur og -tid

I henhold til ISO 9308-2 /2/ må opbevaringstiden fra prøveudtagning til analysestart være 18 timer, når prøven opbevares ved $5 \pm 3^\circ\text{C}$. I særlige tilfælde må opbevaringstiden være 24 timer ved $5 \pm 3^\circ\text{C}$. For at undgå stressede coliforme bakterier anbefales det, at opbevaringstiden på 24 timer ved $5 \pm 3^\circ\text{C}$ ikke overskrides. Derfor bør dette også fremgå af metodedatabladet MM0001. Ved overskridelse af opbevaringstiden skal overskridelsen noteres på certifikatet (jf. ISO 9308-2 /2/). Kommentaren om opbevaringstid bør også angives i MM0002, som beskriver målemetoden ISO 9308-1 til bestemmelse af coliforme bakterier og *E. coli* i drikkevand.

Høring

Notatet samt udkast til metodedatabladene MM0001 og MM0002 har været i høring hos Referencelaboratoriets følgegruppe, Overvågningens Laboratiegruppe, Det Marine Fagdatacenter, Fagdatacenter for Ferskvand, Fagdatacenter for grundvand og boringer, De danske analyselaboratorier og Styrelsen for patientsikkerhed.

Hvad har høring givet anledning til

Det anerkendes, at selvom analyse af prøver efter 24 timer ikke er anbefalelsesværdigt, så bør metodedatabladene ikke forholde sig til, hvad der kan akkrediteres. Kommentaren omkring, at resultater kun kan afrapporteres uakkrediteret ved overskridelse af opbevaringsbetingelserne er derfor fjernet.

Det forslås, at inkubationstemperaturintervallet præciseres yderligere end de 36 ± 2 grader samt at det præciseres, fra hvornår inkubationstiden starter. Referencelaboratoriet fremsatte en høring til de danske analyselaboratorier /18/ for at indhente viden om, hvad der kan lade sig gøre i praksis. På baggrund af dette blev metodedatabladet MM0001 opdateret med præcisering af inkubationstemperatur, samt angivelse af inkubationstidens start.

Der stilles spørgsmål ved, om der tages tilstrækkeligt hensyn til langsomtvoksende *Serratia spp.* ved den valgte inkubationstemperatur og -tid. Referencelaboratoriet vurderer, at hensyntagen til svagt gule brønde vil mindske denne udfordring, men ikke fjerne den helt. Drikkevandsdirektivet /19/ henviser til ISO 9308-2 for analyse af coliforme bakterier, derfor vælger Referencelaboratoriet at fastholde fremgangsmåden fra denne standard.

Der nævnes, at det kan være en udfordring for nogle laboratorier at overholde kravet om 30 minutters stabiliseringstid for inkubatoren. Referencelaboratoriet påpeger, at størstedelen af høringssvarene på den udsendte høring /18/ meldte en stabiliseringstid på 30 minutter eller derunder. Det vurderes derfor at være praktisk muligt at opnå. Da en kort stabiliseringstid er vigtig for at få enslydende resultater mellem laboratorier, fastholdes kravet.

Der spørges ind til, om prøverne kan opvarmes på vandbad eller henstå til opnåelse af stuetemperatur inden tilsætning af substrat. ISO 9308-2 /2/ forholder sig ikke til prøvernes temperatur mellem opbevaring og inkubation. Dog beskriver ISO 19458 /13/, at bakterie

aktiviteten i prøven er proportional med temperaturen. Det er derfor referencelaboratoriets anbefaling, at prøvehåndteringen inden inkubation holdes kort og uden unødigt opvarmning af prøven.

Forskel fra i dag

Colilert 18 og Colilert 24 fjernes fra metodedatablad MM0001, således at ISO 9308-2 er den eneste godkendte metode. Ydermere opdateres MM0001 med følgende beskrivelse:

Inkubationsforhold: $36^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ i 18-22 timer.

Aflæsningskarakteristika (efter 18-22 timer):

Inkubationstiden regnes fra det øjeblik, prøverne lægges i inkubatoren. Inkubatorens temperatur skal være stabiliseret på de $36^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ inden for 30 min efter ilægning.

- 1) Brønde, som er mindst lige så gule som Quanti-Tray comparator betragtes som værende positive for Coliforme bakterier.*
- 2) Brønde, hvor 1) er gældende, og som udviser nogen grad af fluorescens, betragtes som værende positive for E. coli.*
- 3) Brønde, som er gule, men dog mindre gule end Quanti-Tray comparator, skal inkubere videre i op til 22 timer inden aflæsning foretages. Hvis der er forekomst af brønde med svag gulfarvning, kan aflæsningen ikke afsluttes, førend 1) bliver gældende (positivt fund), eller der er gået 22 timer (negativt fund).*
- 4) Brønde, som ikke udviser gulfarvning, betragtes som værende negative.*

MM0001 og MM0002 opdateres med følgende beskrivelse:

Opbevaring: Prøven opbevares koldt ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$) med højst 24 timer mellem prøvetagning og analyse.

Der anbefales en indkøringsperiode på 6 måneder for at give laboratorierne mulighed for at efterkomme ændringerne.

Referencer

- /1/ Referencelaboratoriets metodedatablade. MM0001. E. coli og coliforme bakterier. Tilgængelig på: <https://www.reference-lab.dk/metodedatablade/metodedatablade-mikrobiologi/> [Tilgået d. 20 november, 2024]
- /2/ ISO 9308-2. Water quality – Enumeration of *Escherichia coli* og coliform bacteria - part 2: Most probable number method, 2012
- /3/ IDEXX. Colilert-18*. Simultaneously detects both total coliforms and *Escherichia coli* in water, or fecal coliforms in wastewater, giving you results in 18 hours. Tilgængelig på: <https://www.idexx.com/en/> [Tilgået d. 20 november, 2024]
- /4/ IDEXX. Colilert*. The Colilert test simultaneously detects or quantifies both total coliforms and *Escherichia coli*, with results in 24 hours. Tilgængelig på: <https://www.idexx.com/en/> [Tilgået d. 20 november, 2024]
- /5/ Guldbæk, Inger. Bagge, Linda. Miljøstyrelsen. Vurdering af metodeskifte for coliforme bakterier i drikkevand. Miljøprojekt Nr. 1162, 2007.
- /6/ IDEXX. Intralaboratory Equivalence Study. According to ISO 17994: Colilert®-18 Vs ISO 9308-1.

- /7/ IDEXX. Validation of Colilert®-18/Quanti-Tray® for the Enumeration of E. coli and Coliform Bacteria from Water. January 2008.
- /8/ World Health Organization. Guidelines for Drinking water Quality. 4th edition.
- /9/ Jabeen, Ishrat. Islam, Sohikul. Hassan A. K. M., Imrul. Tasnim, Zerine. Shuvo R., Sabbir. A brief insight into Citrobacter species - a growing threat to public health. Frontiers in Antibiotics, December 2023. doi: <https://doi.org/10.3389/frabi.2023.1276982>.
- /10/ Chang D, Sharma L, Dela Cruz CS, Zhang D. Clinical Epidemiology, Risk Factors, and Control Strategies of Klebsiella pneumoniae Infection. Front Microbiol. 2021 Dec 22; 12:750662. doi: 10.3389/fmicb.2021.750662. PMID: 34992583; PMCID: PMC8724557.
- /11/ AFNOR. Colilert 18 / Quanti-Tray. Assestation number: IDX 33/01-11/09 for the enumeration of Escherichia coli and coliforms in drinking water (except bottle waters). 2020.
- /12/ Mahlen SD. Serratia infections: from military experiments to current practice. Clin Microbiol Rev. 2011 Oct;24(4):755-91. doi: 10.1128/CMR.00017-11. PMID: 21976608; PMCID: PMC3194826.
- /13/ ISO 19458. Water quality – Sampling for microbiological analysis, 2006.
- /14/ Fakruddin M, Mannan KS, Andrews S. Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. ISRN Microbiol. 2013 Sep 26;2013:703813. doi: 10.1155/2013/703813. PMID: 24191231; PMCID: PMC3804398.
- /15/ Williams, D.J., Grimont, P.A.D., Cazares, A. et al. The genus Serratia revisited by genomics. Nat Commun 13, 5195 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32929-2>
- /16/ Hamill, P.G., Stevenson, A., McMullan, P.E. et al. Microbial lag phase can be indicative of, or independent from, cellular stress. Sci Rep 10, 5948 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62552-4>
- /17/ Referencelaboratoriets metodedatablade. MM0002. E. coli og coliforme bakterier. Tilgængelig på: <https://www.reference-lab.dk/metodedatablade/metodedatablade-mikrobiologi/> [Tilgået d. 20. november, 2024]
- /18/ MM0001 og MM0002: Inkuberingstid og -temperatur (Høring 2025). Tilgængelig på: <https://www.reference-lab.dk/rapporter/rapporter-mikrobiologi/forarbejder-til-metodedatablade/> [Tilgået d. 19. maj 2025]
- /19/ Europa-parlamentets og rådets direktiv (EU) 2020/2184 af 16. december 2020 om kvaliteten af drikkevand (omarbejdning)