

**Hodnocení výsledků
PT/V/3/2019
a
Novinky v mikrobiologii vody**

RNDr. Dana Baudišová, Ph.D.
Státní zdravotní ústav
20.6. 2019 Praha

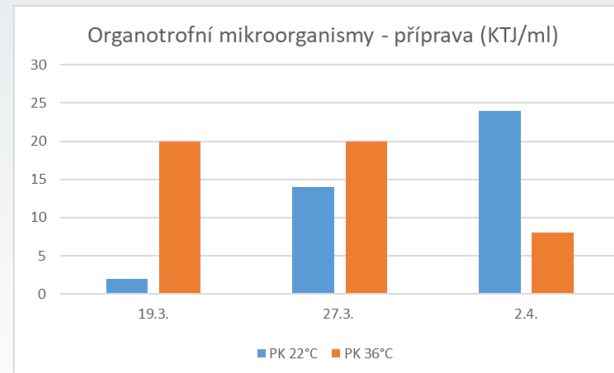


Příprava PT - #V/3/2019



Vzorek A – organotrofní mikroorganismy

- Počty kolonií při 36°C a 22°C
- V loňském roce opakovaně nízký počet (Poissonovo rozdělení)
- Hledání jiného zdroje / pramen Topolka, Praha 4
- Teplá užitková voda v SZÚ (odtočení optimalizováno na 2 minuty, kontrola volného chlóru, zchlazení, homogenizace)



Vzorek B a C

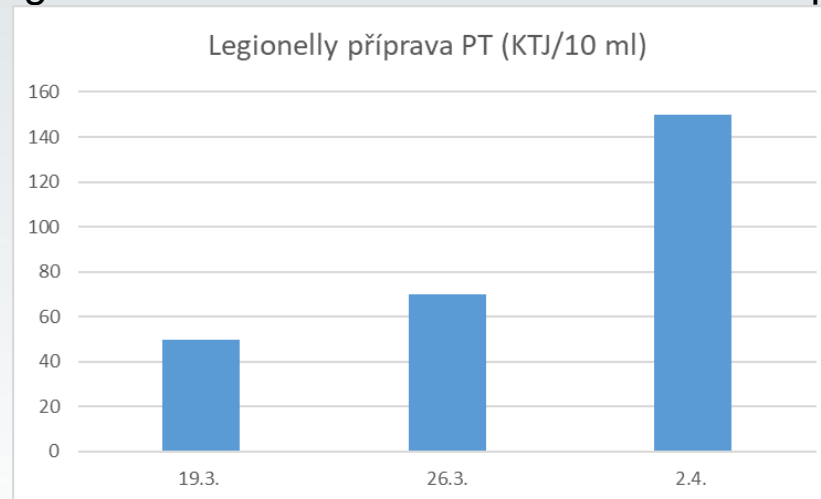
– indikátory fekálního znečištění

- Povrchová voda o různém stupni fekálního znečištění (Vltava Podbaba, Vltava Sedlec). Významné změny fekálního znečištění v týdnu před PT (sucho a následné změny průtoků v dolní Vltavě).
- Problém současného stanovení koliformních bakterií a *E. coli* (dostatek *E. coli*, přerostlé filtry). Vhodnost přepočtu na 10 ml? Změny v rozložení ukazatelů? **POZOR na nabídku PT v roce 2020!**



Vzorek D a E (patogeny)

- **Vzorek D** – uměle připravený vzorek. Bakteriální kmeny (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) byly 24 hodin při $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ kultivovány na neselektivním médiu (tryptózový agar s kvasničným extraktem). Poté byla na základě opakovaného testování připravena suspenze o vhodné denzitě. Příslušný objem této suspenze byl dále přidán do 5 litrů odstáté pitné vody (předem otestované na obsah volného chlóru a počet kolonií při 22°C a 36°C) ve sterilní nádobě a vše bylo důkladně zhomogenizováno a za stálého míchání ihned rozplněno.
- **Vzorek E** - přírodní vzorek teplé vody (shodný se vzorkem A): V březnu 2019 bylo provedeno o ověření potenciálního zdroje vody, což je teplá užitková voda (SZÚ, místnost 111). Vzorek byl 8.4.2019 odebrán po dvouminutovém odtočení do sterilní 10 litrové nádoby. Po zchlazení na laboratorní teplotu byla ověřena absence volného chlóru a vzorek byl zhomogenizován a za stálého míchání ihned rozplněn.



PT - #V/3/2019 - vyhodnocení

- Pro stanovení vztažných hodnot u ukazatelů použity výsledky všech zúčastněných laboratoří. Vztažná hodnota byla vypočítána jako robustní průměr z výsledků všech zúčastněných laboratoří.
- Hodnota cílové směrodatné odchytky (σ) byla stanovena jako robustní směrodatná odchytky souboru výsledků všech účastníků, která mohla být při zohlednění dalších faktorů rozšířena.
- Následně pak každému výsledku laboratoře (X) bylo přiřazeno z-score vypočtené podle vztahu: $z = (X - x) / \sigma$, kde je x vztažná hodnota a σ cílová směrodatná odchytky.
- Z-score je interpretováno následujícím způsobem: $|z| \leq 2$ jako uspokojivé, $2 < |z| \leq 3$ jako sporné a $|z| > 3$ jako neuspokojivé. Z-score charakterizuje přesnost dat produkovaných laboratoří a je definováno jako systematická chyba laboratoře vztažená na cílovou hodnotu směrodatné odchytky.

Kontrolní vzorky ze SZÚ byly využity pouze k potvrzení homogenity a stability vzorků (výsledky jsou uvedeny ve zprávě (tab.1). Nebyly využity ke stanovení vztažné hodnoty.

Organotrofní mikroorganismy

- Narostlé kolonie byly drobné a bylo nutné je počítat pod lupou s bočním osvětlením.
- V případě pochyb, zda-li se opravdu jedná o kolonii bakterií, je vhodné ověření pod mikroskopem.
- Vzhledem k tomu, že se jednalo o vzorek teplé vody, byly počty kolonií při 22°C nižší než počty kolonií při 36°C.

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
PK 22°C	20	7-33	94 %
PK 36°C	33,6	8,4-58,8	76,5%

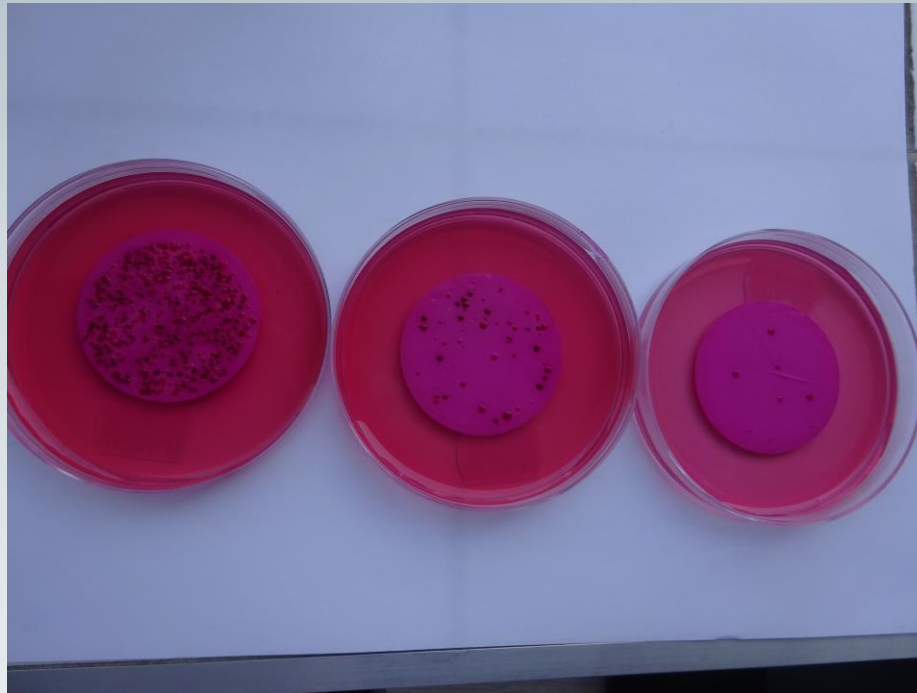
Indikátory fekálního znečištění

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
KB (TC) ČSN 757837	254	147 - 361	71,5 %
KB (TC) ČSN EN ISO 9308-1 (CCA)	186,6	65,4 - 307,8	100 %
KB (TC) ČSN EN ISO 9308-2 (Colilert)254,6	254,6	155,3 - 353,8	100 %
ECOLI ČSN EN ISO 9308-1 (CCA)	9,3	4,7 - 13,9	93 %
ECOLI ČSN EN ISO 9308-1 (Colilert)	7,67	2,54 - 12,8	100 %
FC (TKB)	13,8	4,2-23,4	75 %
ENTEROKOKY	10,7	5 – 16,4	93 %

Koliformní bakterie

- Stanovení koliformních bakterií na Endo agaru. Tato metoda je určena výhradně pro stanovení koliformních bakterií v nedezinfikovaných vodách. (Aktuální využití?) Vztažná hodnota byla vypočtena jako robustní průměr z údajů účastníků, kteří pracovali s vhodným ředěním (tj. doporučeným rozmezím počtů kolonií na detektoru (v tomto případě membránový filtr) dle ČSN EN ISO 8199, 8.2.5.1. NP). Zejména membránový filtr s vysokým obsahem doprovodné mikroflóry výsledky stanovení koliformních bakterií významně podhodnocuje.
- Při stanovení koliformních bakterií na CCA nebyl typ agaru (výrobce) při hodnocení zohledňován zejména proto, že ne všichni účastníci tento údaj uvedli. Jedna laboratoř uvedla použití YEA agar (Xebiotics), což musí být omyl (jedná se o agar s kvasničným extraktem). Hodnota TC i *E. coli* byla víceméně „střední“.
- Při stanovení koliformních bakterií metodou Colilert® 18 - Quanti Tray se výsledek udává jako „nejpravděpodobnější počet“ koliformních bakterií (MPN). Vztažná hodnota byla vypočtena jako robustní průměr z údajů účastníků, kteří dodali kvantitativní výsledek. Výsledek $\geq 200,5$ byl uznán jako správný, neboť v Pokynech k provedení PT/ V - 3 / 2019 – mikrobiologický rozbor vody bylo doporučováno pouze jedno ředění (10 ml). Je však nutno upozornit na fakt, že pro Quanti-Tray (51 komůrek) platí rozsah koncentrací pouze 1 až 200 organismů ve 100 ml, zatímco pro Quanti-Tray/2000 (96 komůrek) je rozsah koncentrací pouze od 1 do 2 419 organismů ve 100 ml vzorku. Toto je třeba při volbách ředění zohledňovat.

Koliformní bakterie na Endo agaru



V	lab	výsledek (KTJ/10 ml)	z-score	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
!	741	64	-3.56									
X	992	180	-1.39									
X	859	190	-1,20									
X	1326	270	0.30									
X	1275	280	0,49									
X	442	296	0.79									
!	1305	1000	13.99									

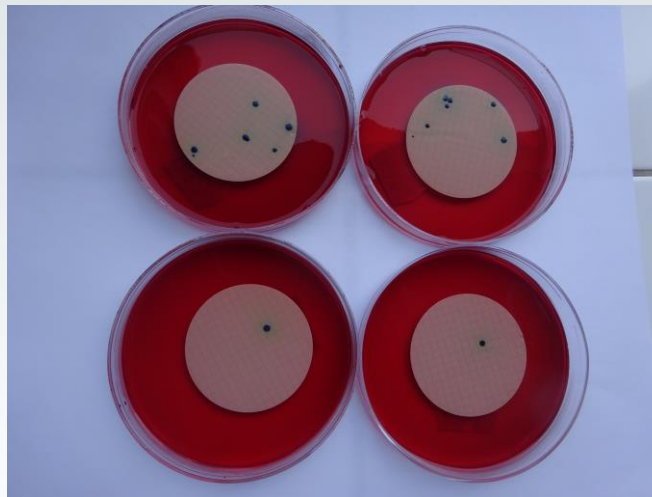
počet laboratoří: 7
z toho vyhovuje: 5
z toho nevyhovuje: 2

vztažná hodnota: 254 KTJ/10 ml
vztažná odchylka: ±42%
interval správných hodnot: 147,4 - 360,6 KTJ/10 ml

X- vyhovuje, ? - spomá, ! - nevyhovuje

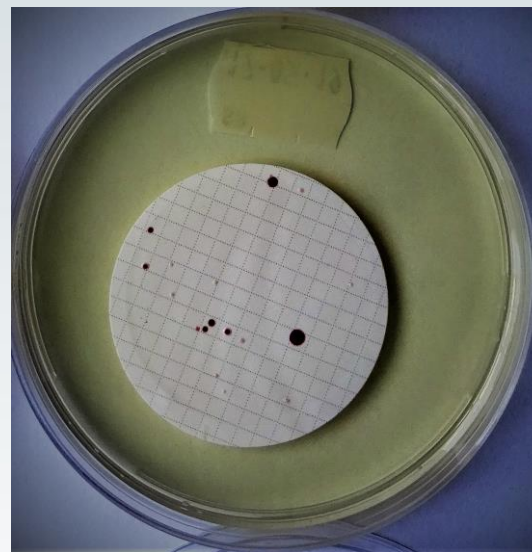
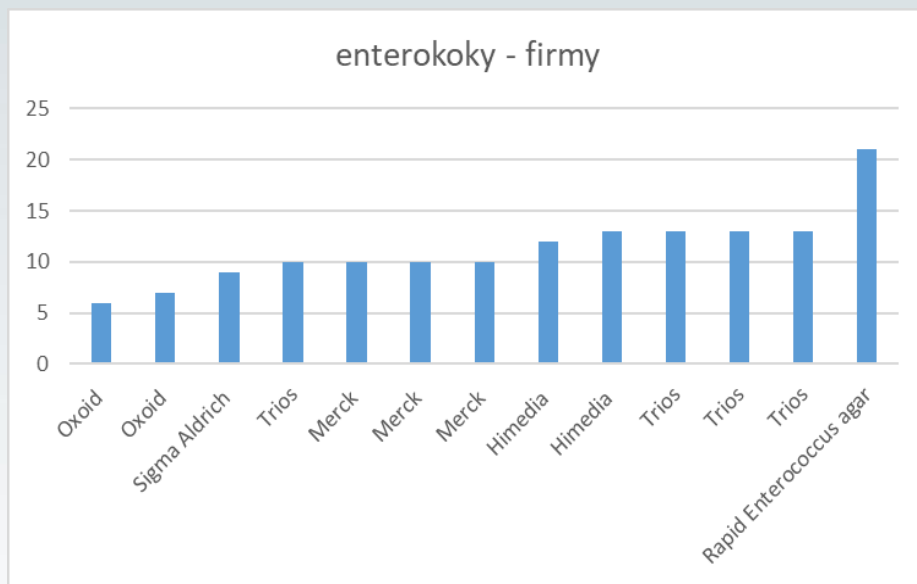
Termotolerantní koliformní bakterie a *E. coli*:

- Při stanovení *E. coli* na CCA nebyl typ agaru (výrobce) při hodnocení zohledňován zejména proto, že ne všichni účastníci tento údaj uvedli. Jedna laboratoř uvedla výsledek *E. coli* „mezi termotolerantními koliformními bakteriemi za pomoci MUG). Hodnota však byla víceméně „střední“.
- V příštím roce tento ukazatel: „*E. coli* dle ČSN 757835“ zřejmě zařadíme.



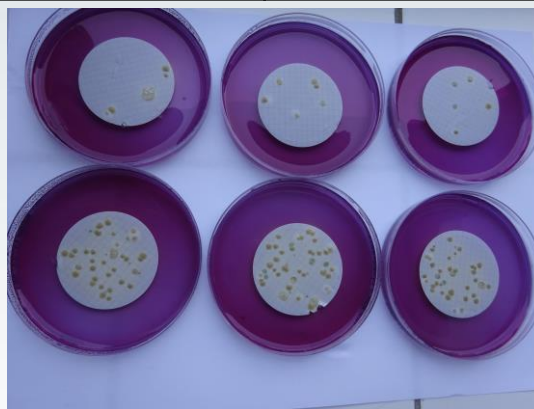
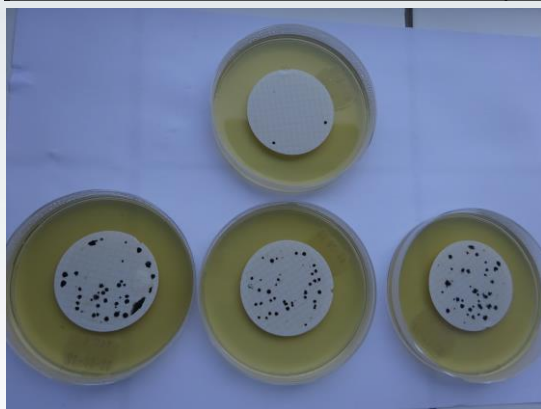
Intestinální enterokoky

- 12 laboratoří (85 %) uvedlo výrobce. Výsledky jsou poměrně vyrovnané (Himedia 2*, Trios 3*, Rapid Enterococcus agar 1*, Sigma Aldrich 1*, Merck 3*, Oxoid 2*).
- *Rapid Enterococcus agar je chromogenní médium, založené na jiném principu než ČSN EN ISO 7899-2. Tato laboratoř získala výsledky, které se nevešly do rozmezí správných hodnot (vyšší).*



Klostridia (*C. perfringens*)

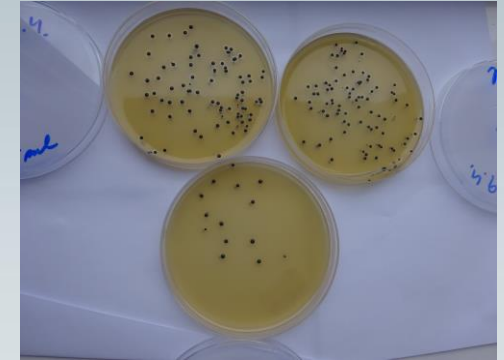
	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
CP - ČSN EN ISO 14189	33,4	22,2 - 44,6	80 %
CP - vyhl. 252/2004 Sb.	21,6	3 - 39,9	100 %
Siřičitany redukující anaeroby (klostridia)	88,5	43,4 – 133,6	83,3 %



C. perfringens

- Velmi málo účastníků na metodu dle ČSN EN ISO 14189. Po implementaci Směrnice EU na pitnou vodu do české legislativy již nebude alternativní metoda, ani „oddechový čas“. Pro nás je to sice „nová norma, ale ISO 14189 je z roku 2013 a letos probíhá již revize. Tož uvidíme
- „Nové činidlo“ na kyselou fosfatázu (německá firma SIFIN, zvlášť pufr a zvlášť 6 ampulí s chemikáliemi, cena 3000 Kč za 6 ampulí, dodává Eurex Medica). Prý to funguje i na primokultury.

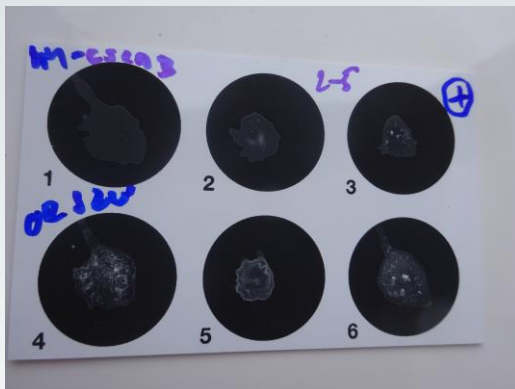
Patogenní bakterie



	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
<i>P. aeruginosa</i>	3769	1458 – 5879	100 %
<i>S. aureus</i>	1514	1332 – 1695	87,5 %
<i>Legionella</i> spp.	73,2	31,5 - 114,9	88,9 %

Patogenní bakterie

- Na rozdíl od bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* nebyla při přípravě vzorků na stanovení *Legionella* spp. použita čistá kultura (sbírkový kmen), ale přirozená kontaminace teplé vody (SZÚ, budova 5, místnost 111). V letošním roce však byl nedostatek doprovodné mikroflóry ☹.
- Povinná kontrola médií (BCYE, BCYE-cys, BCYE +ATB, GVPC) na legionely podle ČSN EN ISO 11731 již od loňského roku! **Pozor, předepsané kmeny legionel je nutno skladovat v "mrazáku" !nikoliv v lednici!**

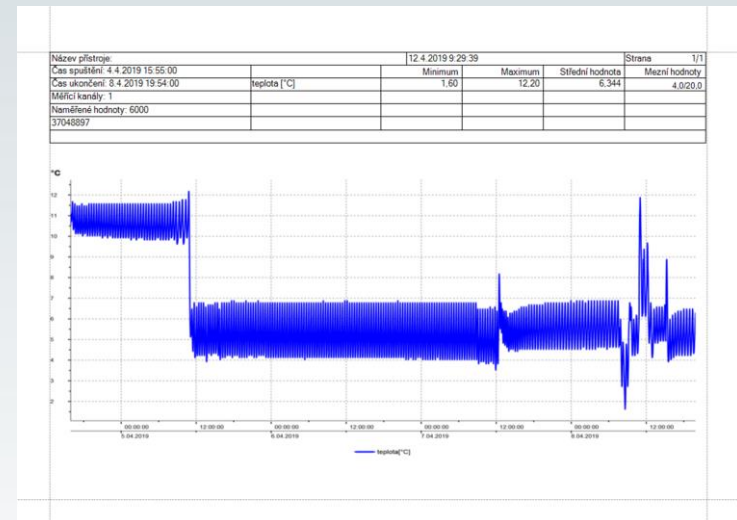


Nejistoty stanovení

- V případě, že je výsledek nad mezí stanovitelnosti (min 10 KTJ, lépe 15, někdy dokonce 30 KTJ) by měla být uvedena nejistota stanovení (povinnost při interpretaci výsledků)
- Pro stanovení vztažné hodnoty a intervalu správných hodnot nebyly nejistoty stanovení brány v úvahu.
- Celkem uvedlo údaje o nejistotách 14 účastníků tj (70 %). Naprostá většina uváděla relativní nejistotu (v %). Nejistotu v případě nízkých hodnot (pod mezí stanovitelnosti) zohlednilo (např. neuvedlo, nebo uvedlo jako širší rozmezí hodnot) 55 % účastníků.
- Většina nejistot (93 %) u hodnot nad mezí stanovitelnosti byla uvedena jako relativní nejistota (tj. v procentech).
- Rozmezí uvedené relativní nejistoty bylo 20 - 61 %; průměrná relativní nejistota byla 34 %.

Možné chyby při OR

- Dodržovat teplotu při transportu vzorků 2-8°C.
- Pozor na teplotu lednic (chladicích brašen)!
- Dodržovat určenou dobu zpracování!
- Dodržovat předepsané postupy – složení médií apod. Lze si samozřejmě ověřit i svoje média, ale bez záruky.
- Správné jednotky
- Správně vyplněný protokol



Hodnocení výsledků

- **Výsledky nepřeceňovat, ale ani nepodceňovat**
- Výsledky probrat (zpětná vazba), zhodnotit možné chyby (vertikální audit vzorku), provést o tom **záznam**, mít k dispozici v pracovních listech všechna primární data.
- Při hodnocení využít **nejistoty** výsledku (vlastní).
- Důležité jsou **trendy výsledků** (opakované hodnoty nad nebo pod vztažnou hodnotou), rozlišit možné chyby **systemové a nesystemové**, identifikace **rušivých vlivů**.
- Logická správnost výsledků.

Novinky v mikrobiologii vody

- Revize směrnice EU o pitné vodě
- Nové (resp. aktualizované normy):
především ČSN EN ISO 8199
- Zavádění hodnocení rizik v laboratořích mikrobiologie vody

Revize Směrnice o pitné vodě

(verze leden 2019; ještě se může změnit)

Annex I - Část A: Mikrobiologické parametry

- Enterokoky
- *E. coli*

Část C: Indikátory

- *Clostridium perfringens* včetně spor (pouze při ovlivnění povrchovými vodami)
- Koliformní bakterie
- Počty kolonií při 22°C (bez abnormálních změn)
- Somatické kolifágy – není dořešené (indikátor úpravy vody, v surové vodě?, limit? metoda?)

Část D: Parametry pro rizikovou analýzu domovních rozvodů

„Legionela“ (jedná se tedy o nám známý ukazatel „*Legionela species*“) a má limitní hodnotu <1000 CFU/l s následující poznámkou: „*This parametric value is not set as a health target, but as a trigger value that can determine risk assessment and remedial action. Such actions could be considered even below the parametric value, e.g. in case of infections and outbreaks. In these cases the source of infection should be confirmed and the species to which it belongs should be identified.*“

ČSN EN ISO 8199 - Kvalita vod - Obecné požadavky a návod pro stanovení mikroorganismů kultivačními metodami

Vaše cena s DPH

545 Kč

Vaše cena bez DPH

Označení normy:	ČSN EN ISO 8199
Třídící znak:	757810
Katalogové číslo:	507696
Vydáno:	1.6.2019
Počet stran:	56
Převzetí:	Norma je vydána v českém jazyce (popř. ve slovenském jazyce pouze u norem vydaných před rokem 1993)

Informace o normě

Stručný popis normy – anotace

ČSN EN ISO 8199

ČSN EN ISO 8199 Tento dokument specifikuje požadavky a popisuje návody na pracovní postupy společné pro všechny metody mikrobiologických vyšetření vody, zejména pro přípravu vzorků, kultivačních médií, přístrojů a laboratorního skla, pokud v příslušné normě není uvedeno jinak. Je zde také popsána řada různých způsobů pro detekci a stanovení počtu mikroorganismů a kritéria pro volbu vhodného postupu. Tento dokument je určen hlavně pro bakterie, kvasinky a plísňe, ale některé aspekty jsou použitelné také pro bakteriofágy, viry a parazity. Nezahrnuje postupy, které nejsou založeny na kultivaci mikroorganismů, například metody polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR).

Novinky – obecně

- Byly doplněny kapitoly obsahující termíny a definice, metody detekce (kvalitativní metody), výkonnostní charakteristiky a řízení analytické kvality (AQC)
- Články týkající se přípravy kultivačních médií a zředovacích roztoků a QC byly aktualizovány v souladu s ISO 11133 a přesunuty do nové přílohy D.
- Článek týkající se obecného návodu pro výpočet výsledků pro metody na pevných kultivačních médiích byl aktualizován v souladu se změnami v ISO 7218:2007/Amd.1:2013[9], na které byly založeny příslušné kapitoly a články v druhém vydání. Byly však provedeny úpravy, které zohledňují postupy v mikrobiologii vody (např. membránovou filtraci) a dovolují jiná ředění než desetinásobné ředění.
- Byla doplněna příloha B, která poskytuje návod pro konfidenční intervaly při počítání ve speciálních případech, vztahující se k aktualizaci článku o obecném návodu pro výpočet výsledků pro metody na pevných kultivačních médiích;
- Byla doplněna příloha C, která popisuje výpočty pro dvě Petriho misky na ředění, vztahující se k aktualizaci článku o obecném návodu pro výpočet výsledků pro metody na pevných kultivačních médiích;
- Byl rozšířen článek týkající se stanovení počtu mikroorganismů s použitím tekutých kultivačních médií a zahrnuje další pokyny pro použití počítačových programů pro MPN. Dřívější příloha B obsahující tabulky MPN byla vypuštěna.

Konkrétní příklady

- Změna tolerance objemů a hmotností na (+/-2) %; 5 % je povoleno pouze v případě, že je prokázáno, že to nevadí
- Nová kapitola sterilizace a dekontaminace
- Odběr vzorků podle ČSN EN ISO 19458 – zmiňován speciálně přídavek neutralizačního činidla do vzorkovnic
- Uvedena možnost jiného než desetinásobného ředění
- Stěry
- Roztopené a zchlazené médium může být o teplotě 44-47°C ☹️
- Možnost očkování na povrch média 0,1 ml až 0,5 ml 😊
- Maximální počet kolonií (cílových a necílových) na membránovém filtru 80 😊
- Dodány jsou konfidenční intervaly pro stanovení počtu s jednou miskou na ředění, případně s malými počty (příloha B4)
-

Zavádění a hodnocení rizik v mikrobiologické laboratoři

- Požadavek „nové“ normy ČSN EN ISO 17025: 2018
- Nemělo by to být záležitostí pouze vedení laboratoře

Kapitoly normy, které „rizika“ zmiňují:

4.1. Nestrannost

7.10. Neshodná práce

8.5. Opatření k zohlednění rizik a příležitostí

8.6. Zlepšování

8.7. Nápravná opatření

8.9. Přezkoumávání systému managementu

..... ALE lze využít mnohem šířeji

Vlastní proces analýzy a řízení rizik

- Identifikace rizika
- Hodnocení rizika (závažnost a výskyt) - lze využít různé matice např. ČSN EN 15975-2, nebo FMEA, apod.).

Pravděpodobnost výskytu/ následky	Nevýznamné	Malé	Střední	Velké
A jisté	1	2	3	3
B pravděpodobné	1	2	2	3
C méně pravděpodobné	1	2	2	3
D nepravděpodobné	1	1	2	2
E vzácné	1	1	1	2

Pro významná rizika je nutné připravit nápravná opatření (a nastavení limitů). Následuje kontrola plnění náprav a pravidelné přezkoumávání rizik

Pozn. Řada „kontrol“ může být snížena nebo eliminována po procesu analýzy rizik

Vhodné oblasti pro analýzu a řízení rizik v mikrobiologické laboratoři

- 6.2. Pracovníci (školení, samostudium, validace/verifikace metod)
- 6.3. **Prostory a podmínky prostředí** (seznam a četnost kontrol)
- 6.4. **Vybavení** (počet vzorků vers. dostatečné vybavení, problémy, např. „teplotní mapa v termostatu nebo v lednici“)
- 6.5. Metrologická návaznost (požadavky na kalibraci měřidel – relevantní přesnosti apod.)
- 6.6. Externě poskytované produkty a služby (hodnocení a výběr dodavatelů)
- 7.2. Výběr, verifikace a validace metod (existují samozřejmě i problémové metody)
- 7.7. **Zajišťování platnosti výsledků** (účast v PT, duplicitní vzorky, referenční kmeny)
- 7.8. Uvádění výsledků (systémy kontrol přepisů apod., nejistoty)

Největší „problémy“ v našich mikrobiologických laboratořích

- Prostředí a jeho monitoring (zejména nedostatečné vyhodnocování výsledků, v některých případech lze kontroly významně zredukovat)
- Nedostatečné zařazování duplicitních a slepých stanovení (vede k menší kontrole platnosti výsledků)
- Referenční materiály (expirace, nesprávné používání pracovních kultur apod.)
- Produktivita médií (v některých případech jsou i „normovaná“ – např. mFCa mCP; nedostatečně kontrolována)
- Devitalizace mikroorganismů ve vzorku a v průběhu analýzy (velké laboratoře se svozy nedodržují dobu zpracování výsledků, nerovnoměrné rozložení teploty v lednicích a termostatech, apod.)
- Nesprávný nebo nedostatečný výběr kolonií pro konfirmaci
- Smysluplnost a přehlednost záznamů

Dva možné přístupy

Analýza procesů

- Přezkoumání nabídek a smluv
- Příjem vzorků
- Zacházení se vzorkem (*vlastní analýza: sem patří víceméně kontaminace, falešné výsledky, špatná kultivace apod.*)
- Platnost výsledků (*kontroly, vhodný materiál, přístroje apod.*)

Analýza zdrojů

- Pracovníci
- Vzorky
- Prostředí
- Zkoušky
- Zařízení, měřidla
- Software

Příklady (ale např. i jiné metody, Kadavá 2019, modifikovaná metoda FMEA)

Pravděpodobnost vyskytnutí následky	Nevýznamné	Malé	Střední	Velké
A jisté	1	2	3	3
B pravděpodobné	1	2	2	3
C méně pravděpodobné	1	2	2	3
D nepravděpodobné	1	1	2	2
E vzácné	1	1	1	2

Položka	Zdroj /následek	Výskyt	Následky	Výsledek	Opatření
Kontaminace vzorku během analýzy	Nevhodné prostředí laboratoře	Jisté	Střední	3	Návrh na investici – laminární box, před každou prací desinfekce prostředí (včetně UV), omezit pohyb osob
	Kontaminace lednic	Nepravděpodobné	Nevýznamné	1	NENÍ , vzhledem k pilotním výsledkům není třeba pravidelná kontrola kontaminace lednic (stěr, spad)
	Kontaminace termostatů	Vzácné	Malé	1	NENÍ , vzhledem k pilotním výsledkům není třeba pravidelná kontrola kontaminace termostatů (stěr, spad)
Nevhodné prostředí	Kontaminace vzorku během analýzy	Jisté	Střední	3	Návrh na investici – laminární box, před každou prací desinfekce prostředí (včetně UV), omezit pohyb osob

V tomto případě by potenciální kontaminace lednic a termostatů patřila do kapitoly zařízení

Nabídka naší spolupráce

Zájemce o mikrobiologické metody proškolíme :

- v menších skupinách max 6 lidí
- součástí školení je praktická část
- pro začátečníky i pokročilé
- počítáme s podzimním termínem

Spolupráce v oblasti koliformních bakterií na CCA agaru z pitných vod

Zajímavosti z praxe

Děkuji za pozornost

