



Hodnocení výsledků PT/V/3/2025 a Novinky v mikrobiologii vody

RNDr. Dana Baudišová, Ph.D.

Program

Příprava a hodnocení PT#V/3/2025

- Příprava a výběr vzorků
- Hodnocení výsledků
- Diskuse k jednotlivým ukazatelům

Novinky v mikrobiologii vody

- Nové normy zatím (od minulého semináře) nejsou (schváleny)
- Validace mikrobiologických metod a nejistoty stanovení
- Kontrola kvality membránových filtrů
- Intestinální enterokoky, E. coli



Příprava PT #V/3/2025



Vzorek A – Organotrofní mikroorganismy

Cíl:

- Nenulové hodnoty
- Nechceme *Bacillus a aktinomyceity*

Lokalita – park Na Jezerce, Praha 4

			PK 22	PK 36
			KTJ/ml	KTJ/ml
2025				
Jezerka	25.03.2025		1130	410
Jezerka	30.04.2025		1170	112



Vzorek B a C

– indikátory fekálního znečištění

Povrchová voda o různém stupni fekálního znečištění- rozhodování ze tří lokalit

		KOLI	EC	ENT	FC	Clostr
2025		KTJ/10 ml	KTJ/10 ml	KTJ/10 ml	KTJ/10 ml	KTJ/10 ml
Botič jez (U Lípy)	07.01.2025	328	114			
Botič jez (U Lípy)	20.01.2025	235	41			
Botič jez (U Lípy)	25.03.2025	>100	50	17	41	10
Vltava Sedlec	26.03.2025	>100	1	1	13	41
Rokytko Hrdlořezy	26.03.2025	>100	10	21	8	14
Botič jez (U Lípy)	30.03.2025	303	21		21	
Rokytko Hrdlořezy	30.03.2025			2		9



Vzorek D (podmíněné patogeny)

Vzorek D – uměle připravený vzorek. Bakteriální kmeny (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* izolované z biokoupališť a ověřené metodou MALDI TOF) byly 24 hodin při $(36 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ kultivovány na KA. Poté byla na základě opakovaného testování připravena suspenze o vhodné denzitě. Příslušný objem této suspenze byl dále přidán do 6 litrů fyziologického roztoku z odstáté pitné vody (předem otestované na obsah volného chloru a pH) ve sterilní nádobě a vše bylo důkladně zhomogenizováno a za stálého míchání ihned rozplněno.



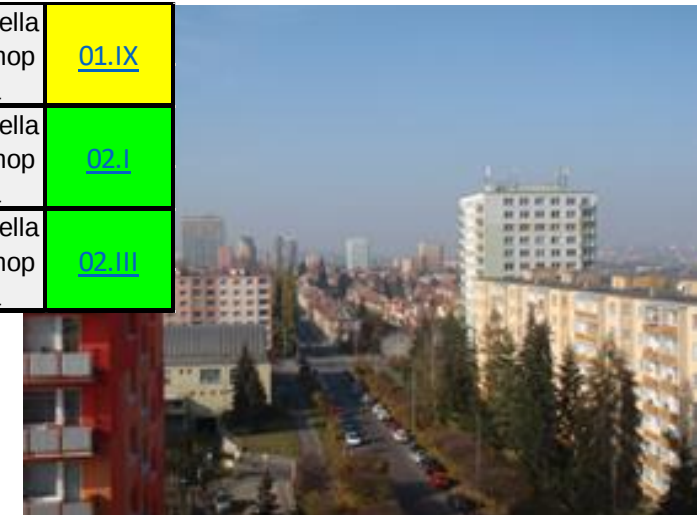
C12 (+++) (A)	PA18	Pseudomonas aeruginosa	IL31	Pseudomonas aeruginosa	IL27
D1 (++) (A)	PA15	Pseudomonas aeruginosa	IL29	Pseudomonas aeruginosa	IL17
C8 (++) (A)	R24A	Staphylococcus aureus	IL26	Staphylococcus aureus	IL21
C9 (++) (A)	R31	Staphylococcus aureus	IL15	Staphylococcus aureus	02.VII

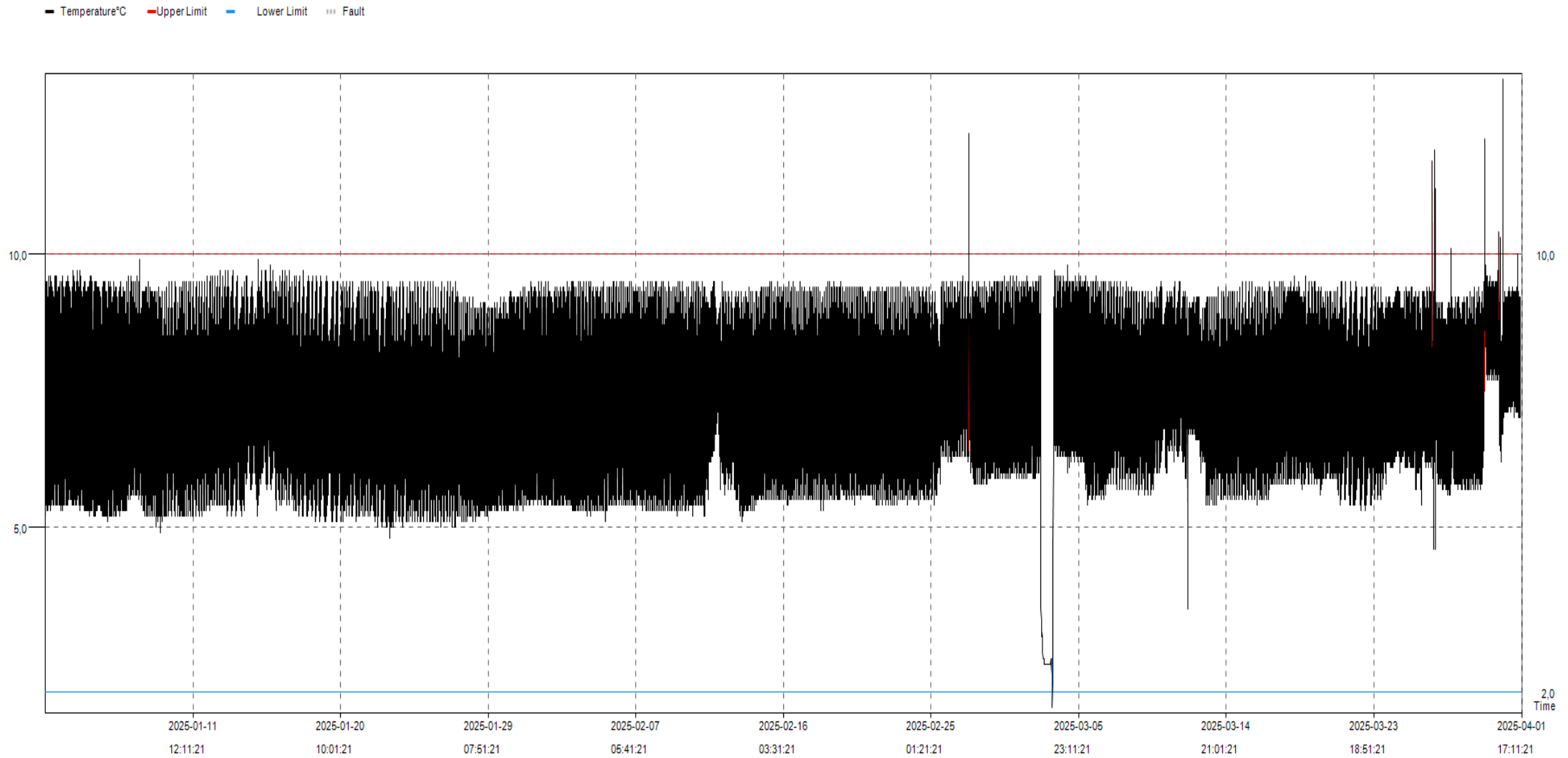
Vzorek E – legionely

Vzorek E – Přirozený vzorek teplé vody. V březnu a dubnu 2024 bylo provedeno ověření potenciálního zdroje vody, což je teplá užitková voda (v panelovém domě v Praze 10). Vzorek byl odebrán po dvouminutovém odtočení do 2*3 litrové nádoby. Po zchlazení na laboratorní teplotu byla ověřena absence volného chloru, vzorek byl smíchán, zhomogenizován a za stálého míchání ihned rozplněn.

		WT GVPC 0,5 ml	WT BCYE 0,5 ml
2025		KTJ	KTJ
Jahodová	20.1.	12	17
Jahodová	24.3.	9	
SZÚ	24.3.	35	
Jahodová	30.3.	3	7

B4 (++) (A)	ORL1	Legionella pneumop hila	02.XII	Legionella pneumop hila	01.IX
B5 (++) (A)	2	Legionella pneumop hila	11.24	Legionella pneumop hila	02.I
B6 (++) (A)	3	Legionella pneumop hila	11.17	Legionella pneumop hila	02.III





PT - #V/3/2025 - vyhodnocení

Pro stanovení vztažných hodnot u ukazatelů použity **většinou** výsledky všech zúčastněných laboratoří. Vztažná hodnota byla vypočítána jako robustní průměr z výsledků všech zúčastněných laboratoří.

Hodnota cílové směrodatné odchylky (σ) byla stanovena jako robustní směrodatná odchylka 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 odchylka.

V případech, kdy byla vztažná hodnota velmi nízká, rovna nebo menší než 10 (a nejednalo se o metodu nejpravděpodobnějšího počtu), bylo pro meze pro správné hodnoty použito Poissonovo rozdělení (99% hladina významnosti). Pro výpočet byla využita funkce POISSON z programu MS Excel. Vztažná odchylka pak byla vypočítána jako polovina rozdílu mezi vztažnou hodnotou a spodní, resp. horní hranicí intervalu. Z-score je v tomto případě uvedeno pro grafické znázornění výsledků.

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 odchylky.

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

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
PK 22°C	1384	664-2103	77 %
PK 36°C	91,6	21-162	90%

- Transport vzorku
- Vhodné ředění - letos nutné, u ředění u PK 22 až 100* , více paralelních stanovení u 36°C a správné počítání z něj!
- Temperace vzorku (3* více než hodina, ale významný velký vliv nebyl zaznamenán)
- Teplota zalévání – dle ČSN EN ISO 6222 (45 +/- 1)°C

1 (–) Actinomyces timonensis CCUG 44999
CCUG 1.21 1654

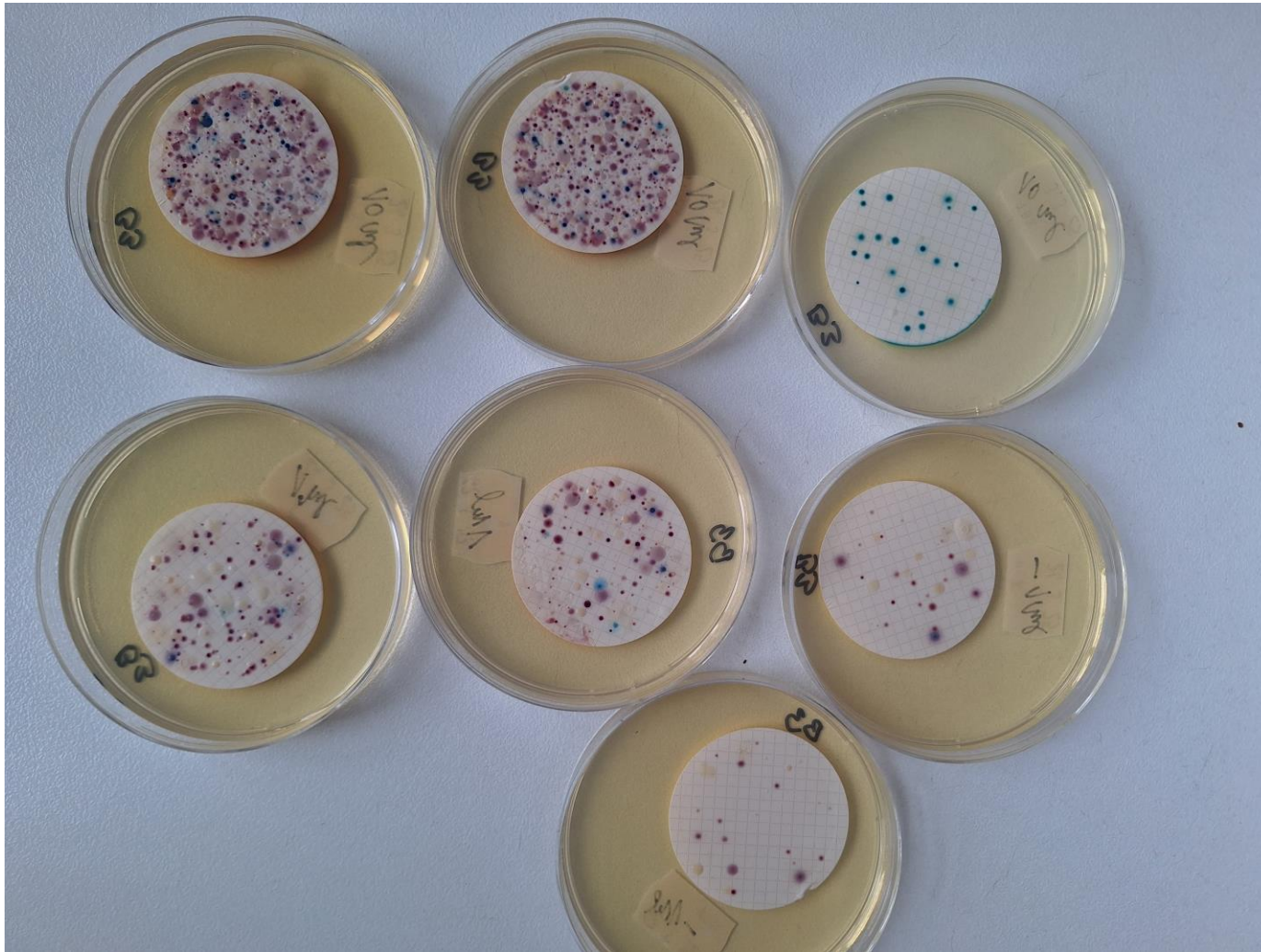


Actinomyces spp. , 36°C

Indikátory fekálního znečištění

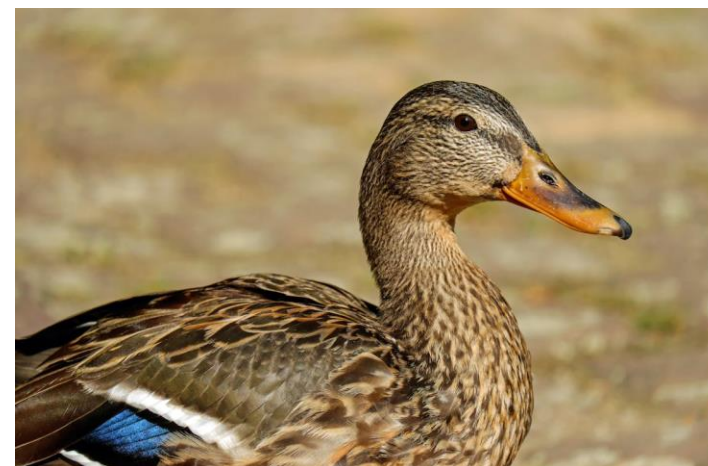
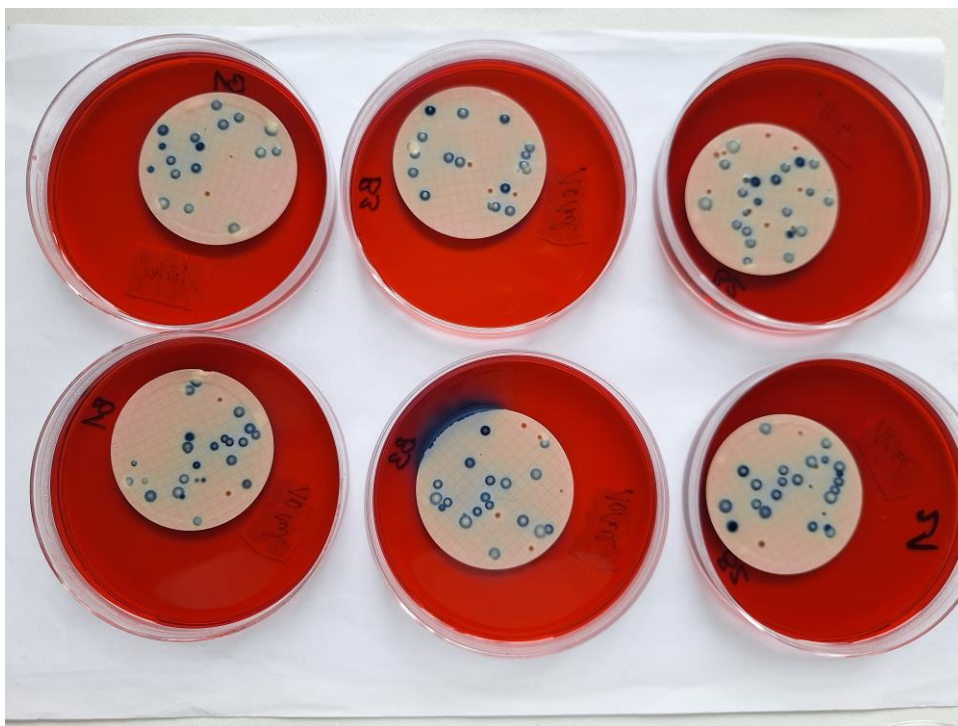
	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
KB (TC) ČSN 757837	211	47-376	100 %
KB (TC) ČSN EN ISO 9308-1	182	73-291	81 %
KB (TC) ČSN EN ISO 9308-2	208	170-245	100 %
ECOLI ČSN EN ISO 9308-1	22	9-35	96 %
ECOLI ČSN EN ISO 9308-2	17	10-25	100 %
ECOLI ČSN 757835	16	7-26	95 %

Pozn. Colilert 18 vers COLIKAT 6:2, výsledky se nelišily



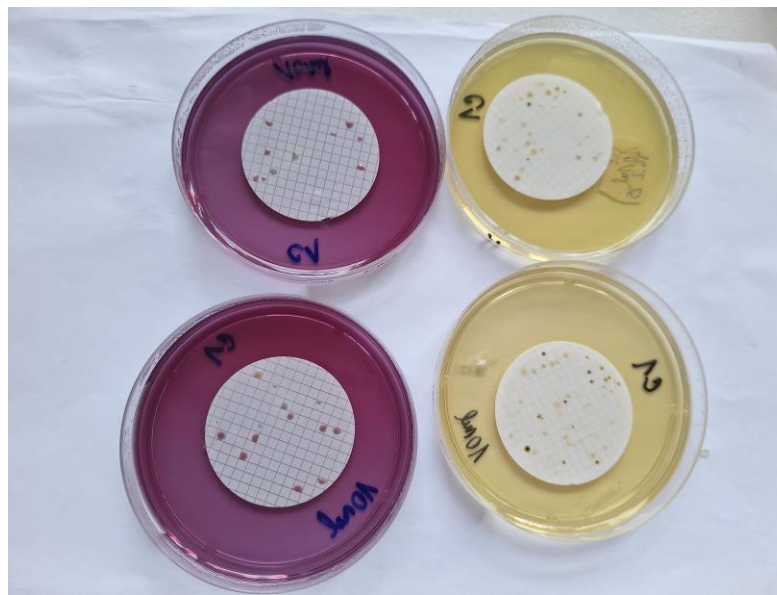
Indikátory fekálního znečištění II

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
TKB (FC)	30	9-51	91 %
Enterokoky	3	0,5	97 %



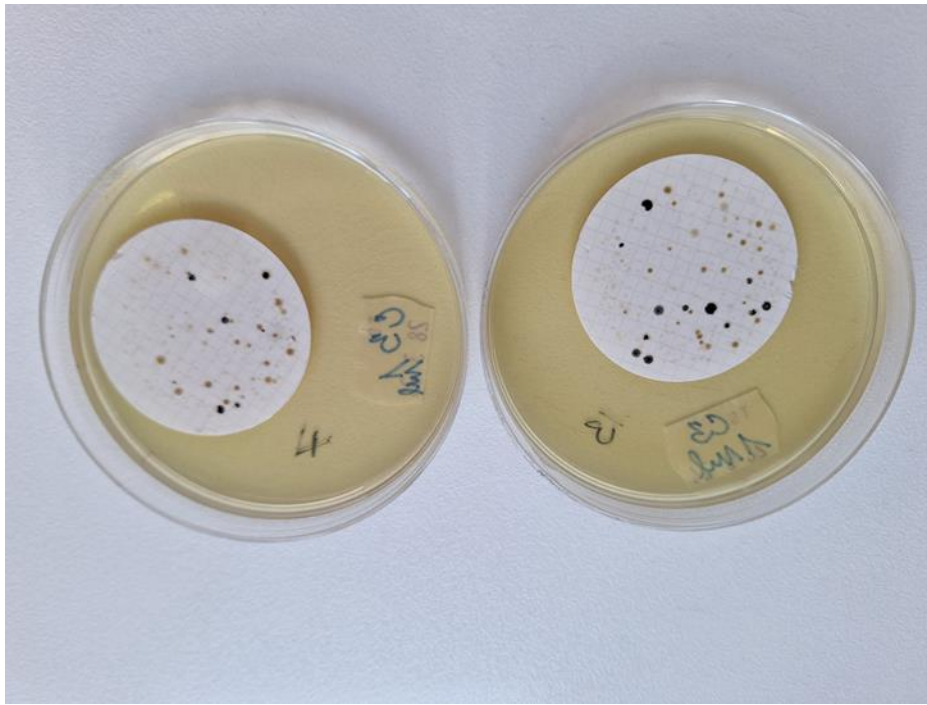
Klostridia (*C. perfringens*)

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
CP - ČSN EN ISO 14189	17	8-26	100 %
CP - Vyhl. 252/2004 Sb.	9	4-15	75 %
Siřičitany redukující anaeroby	50	25-75	86 %

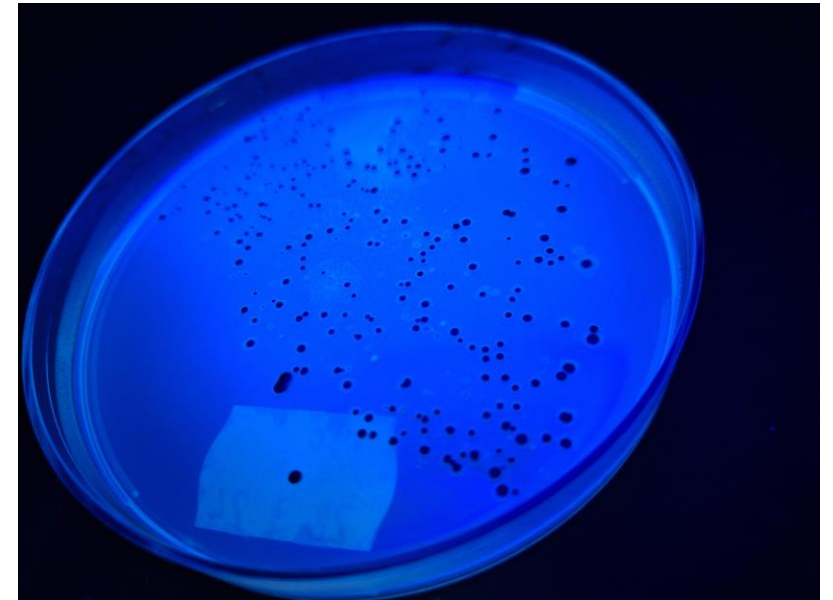
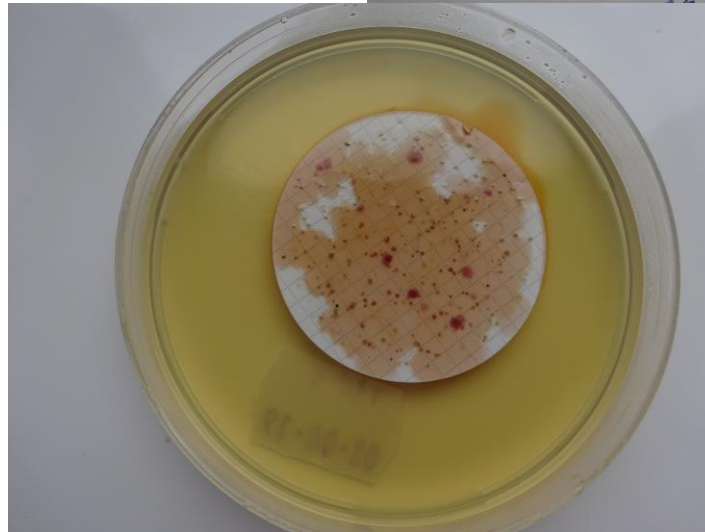


Clostridium perfringens

- Osud významnost ukazatele se bude muset dořešit, mCP končí (jako standardizovaná metoda) – lze používat pro surové vody 4 účastníci
- CP dle ČSN EN ISO 14189: 16 účastníků 😊 - všichni uspěli
- Výrobce činidla na kyselou fosfatázu : Himedia (uvedli 10), Sifin (uvedlo 6),
dále nehodnoceno
- Siřičitany redukující anaeroby – nutná změna normy

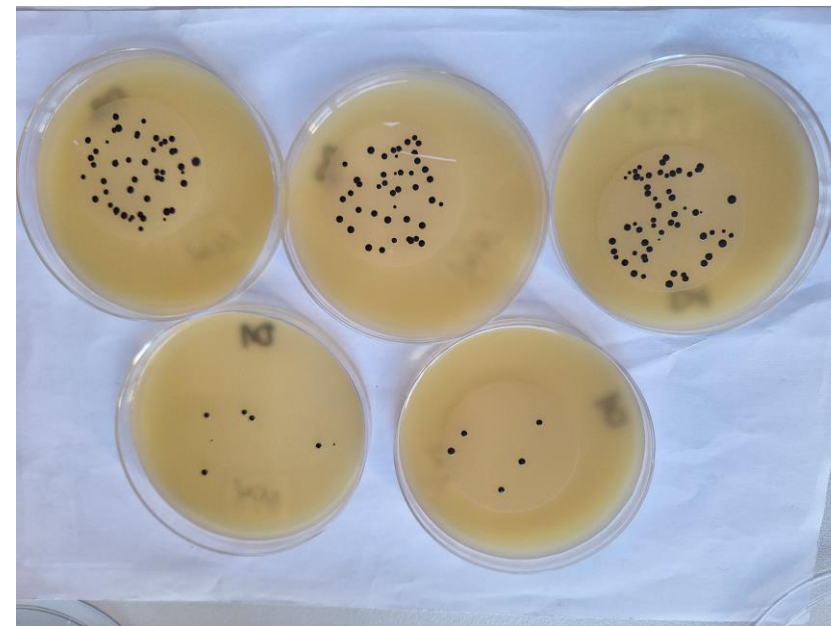
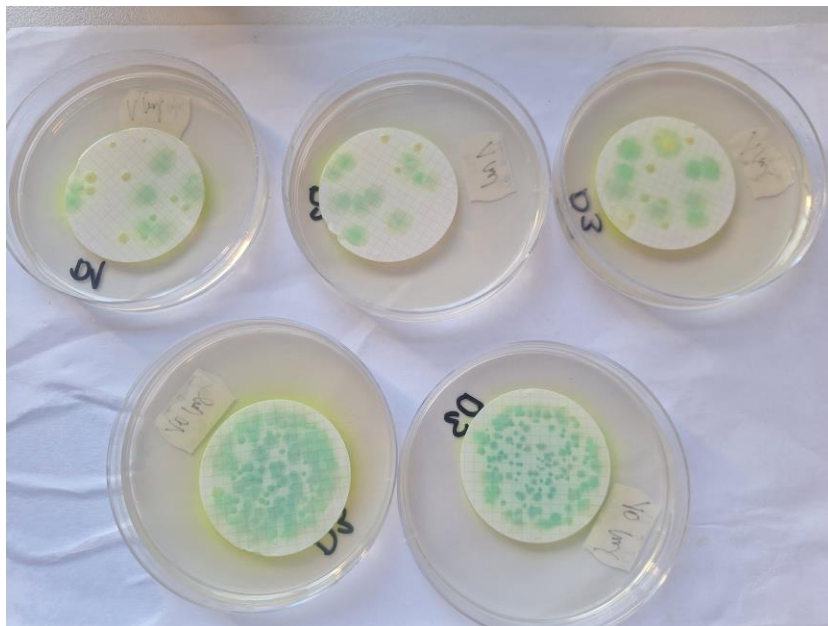


Centrifugace,
filtrace



Podmíněně patogenní bakterie

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
<i>P. aeruginosa</i>	Nelze hodnotit		
<i>S. aureus</i>	56	34-77	85 %
<i>Legionella spp.</i>	97	39-156	100 %

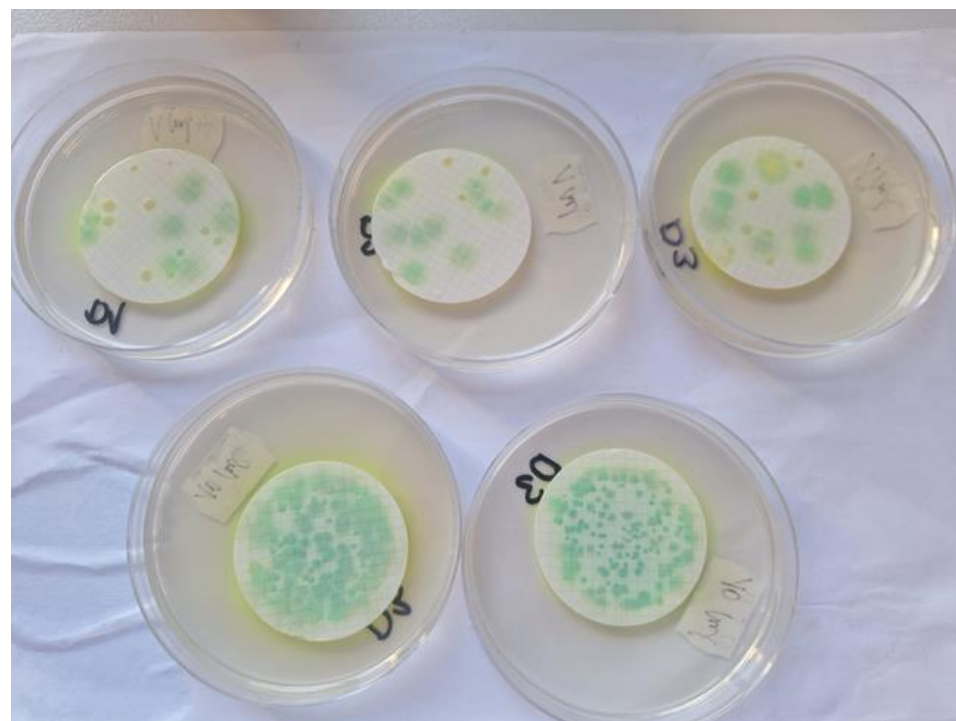


V	lab	výsledek (KTJ/1 ml)	z-score	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
	0975	0.00	-3.33									
	0313	2.00	-3.21									
	0333	22.00	-1.98									
	0314	29.00	-1.55									
	1172	50.00	-0.26									
	1070	52.00	-0.14									
	0960	55.00	0.05									
	1013	55.00	0.05									
	0716	66.00	0.73									
	0741	68.00	0.85									
	0641	70.00	0.97									
	0936	72.00	1.09									
	1054	120.00	4.05									
	0526	192.00	8.47									

počet laboratoří: 14

vztažná hodnota: 54,2 KTJ/1 ml

NEHODNOCENO



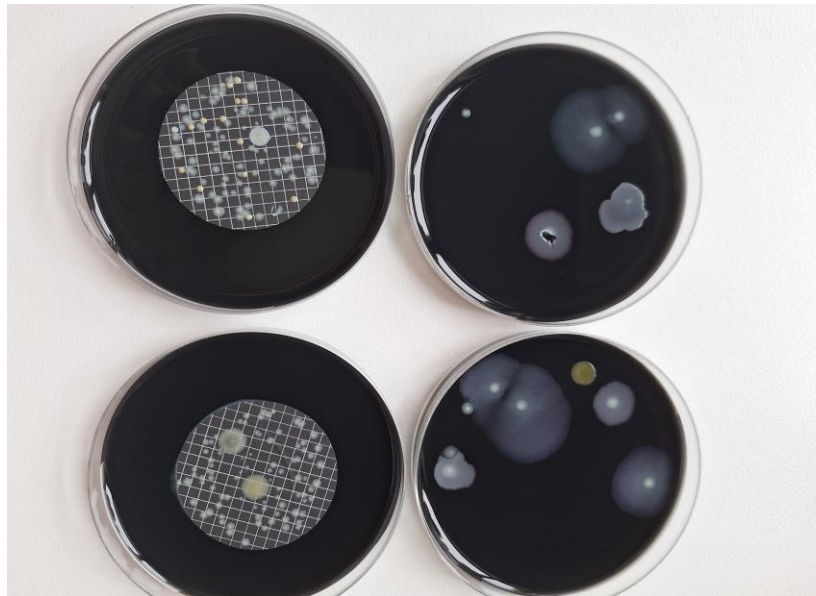
Stanovení legionel

Stanovilo účastníků 11

Uvedena průměrná hodnota 10*

Uvedena maximální 1 (10 ml BCYE)

1 laboratoř zaznamenala (uvedla) rozdíl mezi kyselým promytím a bez promytí, další uvedla, že nebyly rozdíly



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.

Uvedené nejistoty stanovení lze využít především při hodnocení úspěšných či neúspěšných výsledků jednotlivými účastníky.

2025

- Celkem uvedlo údaje o nejistotách 26 účastníků tj. 84 %.
- Je také nutno připustit, že na protokolu nebylo uvedeno hodnocení výsledku resp. porovnání s limitem.
- Většina laboratoří (19) uváděla relativní nejistotu (v %), i když v některých případech znak % chyběl, bylo to patrné. 1 laboratoř uvedla „hodnotu“, 3 laboratoře uvedly konfidenční meze a tři laboratoře kombinaci relativní nejistoty a konfidenčních mezí.
- Rozmezí všech uvedených relativních nejistot bylo 10 – 67 %; nutno konstatovat, že nejistoty v mikrobiologii vody pod 20 % jsou nerealistické a neodpovídají rozložení mikroorganismů (částic) ve vzorku. V jednom případě byla uvedena i nejistota stanovení 150 %, ale to bylo vztaženo k hodnotě 2 KTJ, tudíž zcela na místě.

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

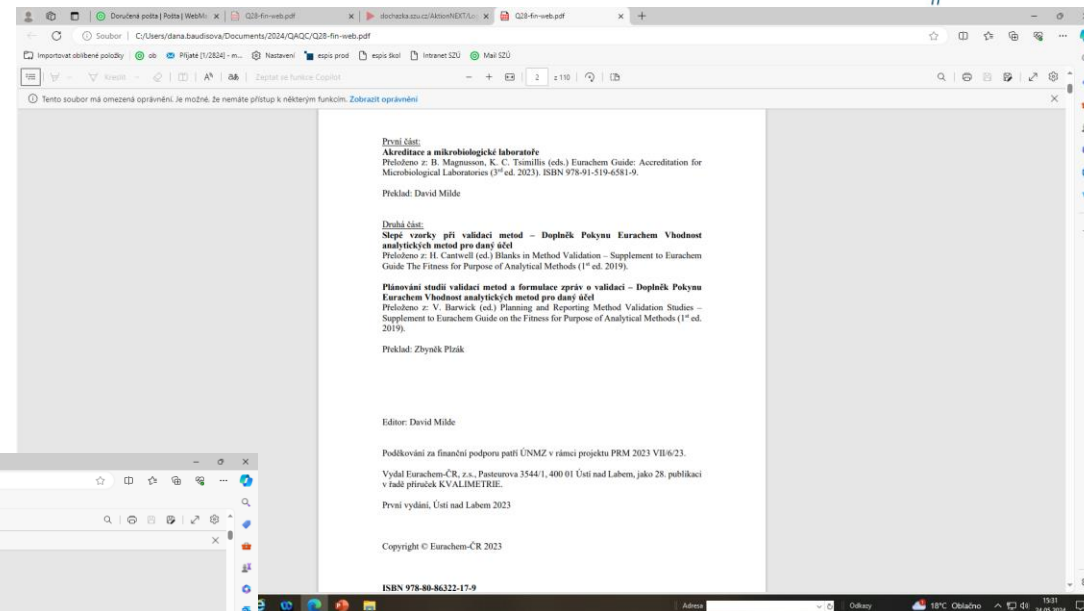
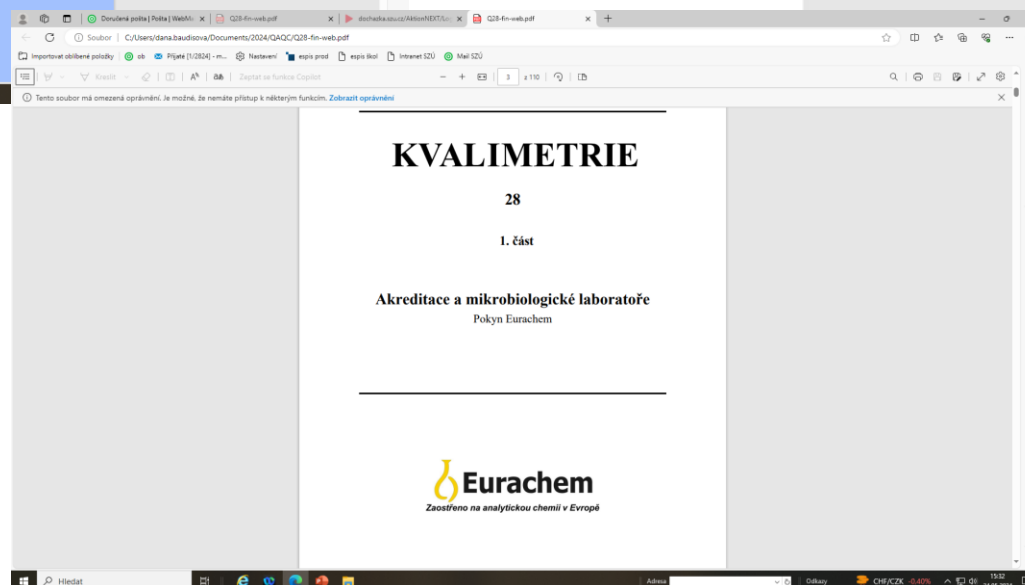
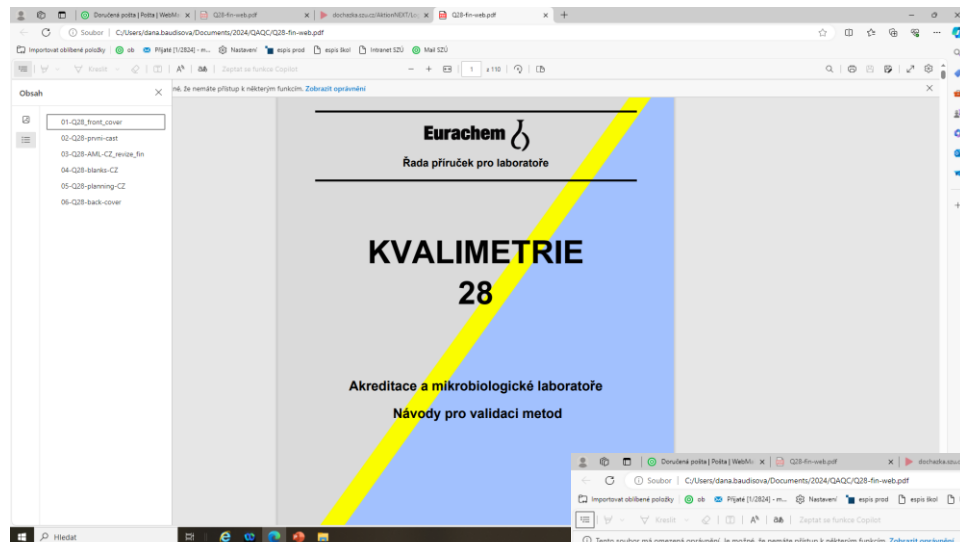
Hodnocení výsledků

- 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 systémové a nesystémové, identifikace rušivých vlivů.
- Logická správnost výsledků.

Novinky v mikrobiologii vody

- Kvalimetrie 28: Validace metod a nejistoty stanovení
- Kontrola membránových filtrů dle ČSN EN 7704
- Intestinální enterokoky v pitných vodách – další analýzy
- Stanovení *E. coli* v přírodních koupacích vodách

Obečné práce v mikrobiologické laboratoři



Návody na validaci metod

Obecně v mikrobiologii vody není mnoho třeba

Verifikace ale ano!

Nejdůležitější činnost v mikrobiologické laboratoři !

Nejistoty měření – převážná část výsledků pod mezí stanovitelnosti:

Pozor na přesné výsledky z jednorázových pokusů aplikované na nevhodný pracovní rozsah!

Výběr metod pro vhodný účel

- Co chceme sledovat?
- Co OPRAVDU chceme sledovat?
- Jsme vázáni legislativou?



- Mikrobiologické metody jsou **uzanční** (smluvené) a **normované** (*nejen ukazatel, ale i metoda resp. princip; pozor na „ekvivalenci metod“*)

Standardizované metody jsou validované

..... Nebo se za to alespoň považují

V nových normách bývají uvedeny nejdůležitější validační parametry:

- Citlivost
- Specifičnost
- Falešně pozitivní výsledky
- Falešně negativní výsledky
- Produktivita
- Selektivita
- Opakovatelnost
- Reprodukovatelnost

V mikrobiologii vody je velmi problematická
„linearita“

Verifikace metod v mikrobiologických laboratořích

Myšleno kontroly vedoucí k pravidelné verifikaci použitých metod

- **Kontrola živných médií** – produktivita, selektivita, specifičnost
- **Společné počítání výsledků (paralelní odečty)** – kontrola sporných výsledků konfirmačními testy
- **Opakovatelnost** – v mikrobiologii vody ukazuje POUZE na intenzitu promíchání vzorků
- **Reprodukovatelnost** (vnitrolaboratorní) - podmínky lze splnit jen částečně (stejná média, prostředí, přístroje)

Podrobnosti viz Kvalimetrie 28, diskutabilní je používání „obohacených vzorků“ zejména pro testování podílu falešně pozitivních a negativních výsledků

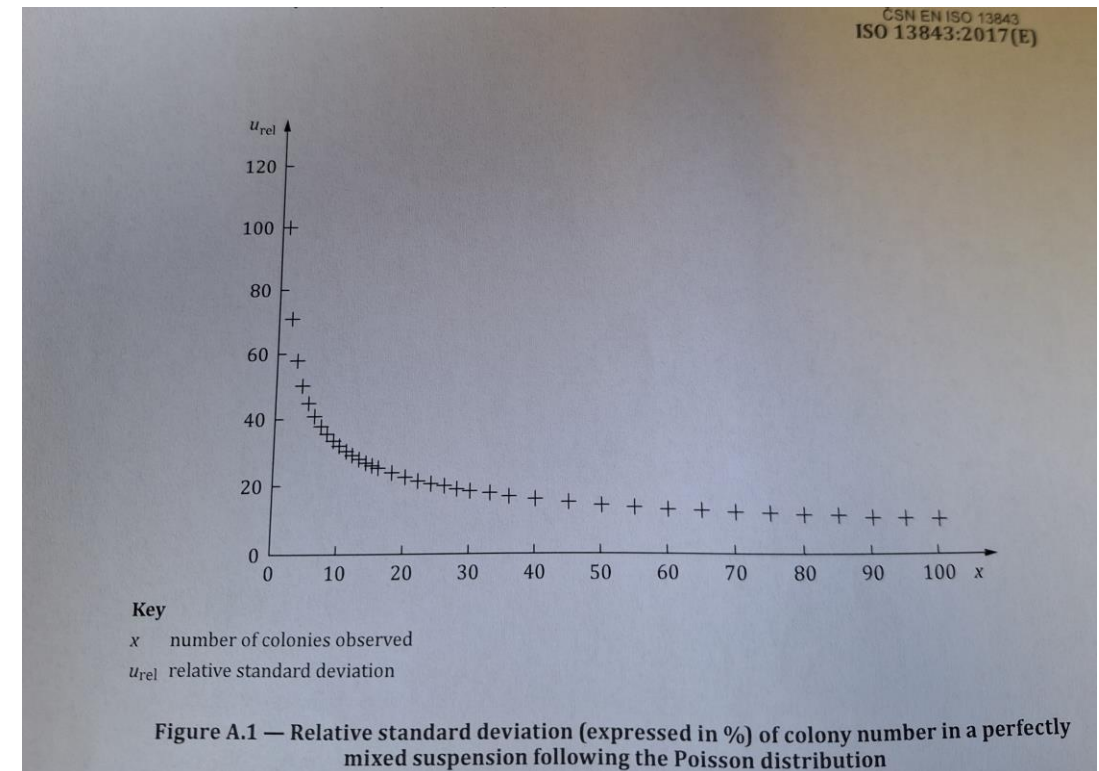
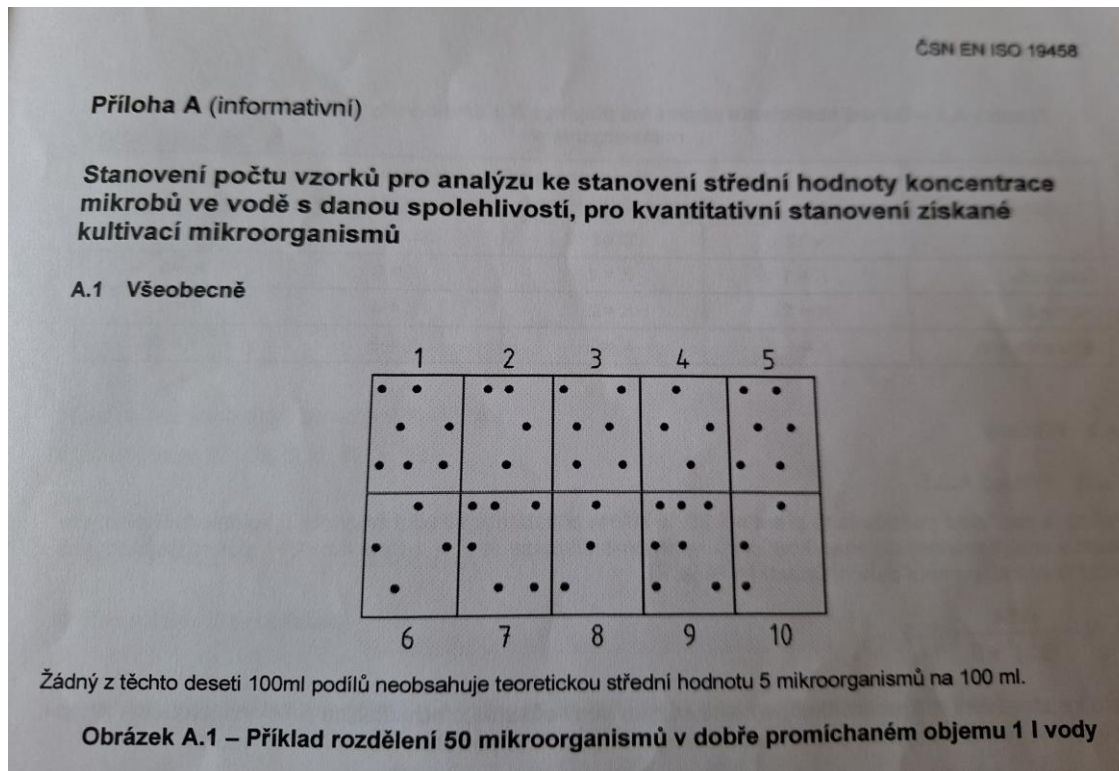
Další důležité charakteristiky mikrobiologických metod



- **Mez detekce resp. mez stanovitelnosti**
- Mez detekce se dodnes diskutuje - 0 je číslo!
- legislativní předpisy např. vyhláška MZ 252/2004 Sb. požaduje zpracovat u některých mikrobiologických ukazatelů 100 ml s výsledkem „0 „
- Mez stanovitelnosti – odvíjí se od počtu vyrostlých kolonií na detektoru (Petriho misky),

Obvykle 15 – 20 KTJ na detektoru

Distribuce mikroorganismů ve vodě



Příklad konfidenčních mezí Poissonova rozdělení a relativní směrodatné odchylky

P - 0,95	1	2	3	4	5
Poissonovo rozdělení	0,0 - 5,6	0,2 - 7,2	0,6 - 8,8	1,1 - 10,2	1,6 - 11,7
Relativní směrodatná odchylka	140 %	132 %	128 %	108 %	107 %

Nejistoty stanovení mikrobiologických ukazatelů

- Nejistota měření je parametr přidružený k výsledku měření, který představuje rozsah hodnot, které lze důvodně přisoudit měřené veličině (Kvalimetrie 28)
- Musí být pravdivé / realistické
- Musí zahrnovat specifika mikrobiologických stanovení a zároveň konkrétní kritická úskalí metod (y)
- Musí být pravidelně ověřované, zejména při změně relevantních podmínek
- V legislativě mikrobiologie vody nejsou zahrnovány pro hodnocení výsledků

Smysl mají nejistoty pouze u výsledků nad mezí stanovitelnosti (*převážná část výsledků pod mezí stanovitelnosti*)

Stanovení nejistot – dva uváděné přístupy

Per partes (hlavní složky co přispívají k nejistotě - tj. distribuce částic, technické kroky, konfirmace, matrice) a začít u 25 %

Celostní přístup (celkový rozptyl, míra variability) nízké výsledky – lépe se prakticky dělá (vhodné pro potraviny, nikoliv pro vodu) – **Pozor na přesné výsledky z jednorázových pokusů aplikované na nevhodný pracovní rozsah!**



		Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Nejistota
počty kolonií při 36°C	KTJ/ml	272	130	1	1	45%
počty kolonií při 22°C	KTJ/ml	205	63	6	1	23%

Kvalimetrie 28: Příloha C – Uvádění konfidenčních intervalů

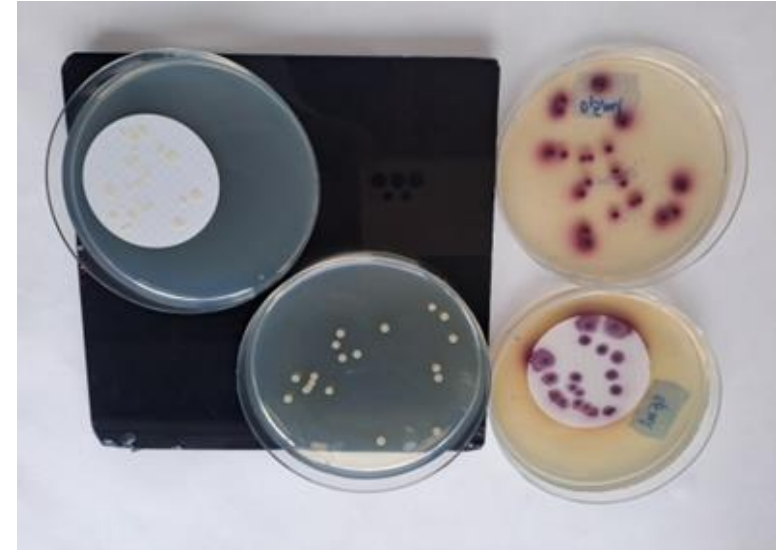


Velmi vhodný parametr, ale nezaměňovat

A screenshot of a PDF document titled 'Příloha C – Uvádění konfidenčních intervalů' (Appendix C – Reporting of confidence intervals). The document is displayed in a web browser window. The header of the document includes 'Akreditace a mikrobiologické laboratoře' (Accreditation and microbiological laboratories) on the left and 'Pokyn Eurachem' (Eurachem Guideline) on the right. The main title 'Příloha C – Uvádění konfidenčních intervalů' is centered. Below it, the section 'C1 Účel' (C1 Purpose) is highlighted. The text describes the purpose of the appendix: to present the calculation of asymmetric confidence intervals for microbiological methods. It references ISO 29201 [26] and ISO 8199 [51] for water matrices, ISO 19036 [34] for food matrices, and G108 [60] for both. It states that if the expanded uncertainty is greater than 30–40%, asymmetric confidence intervals should be used instead of just reporting the expanded uncertainty. An example is given: '50 KTJ ± 42 %' can be reported as '50 [33, 76] KTJ', where 33–76 is the asymmetric confidence interval for the result 50 KTJ. The browser window shows the file path 'C:/Users/dana.baudisova/Documents/2024/QAQC/Q28-fin-web.pdf' and a zoom level of 300%.

Norma ČSN EN ISO 7704

- Testování membránových filtrů
- Závaznost (??)
- Účelnost pro laboratoře (?)
- Analýza rizik?
- Počty KTJ? Použití CRM?



Vhodné pro speciální případy:

- Zaškolení pracovníků – práce s kulturami, přesnost přípravy kultur

Doporučení technické komise pro ČIA (minimální požadavky)



1. Laboratoř je povinna otestovat dostatečný záchyt membránových filtrů pro všechny stanovované ukazatele v rozsahu akreditace a používaná média postupem dle ČSN EN ISO 7704.
2. Testy je třeba opakovat v případě nastalých změn (dodavatel membránových filtrů či kultivačních médií, a dále v případě jakýchkoliv pozorovaných odchylek, opakovaně nízkých záchytů při zkoušení způsobilosti apod.).
3. V případě, že výrobce není certifikovaný podle normy ISO 9001, je třeba otestovat každou šarži membránových filtrů.
4. V případě, že laboratoř kupuje filtry již s certifikátem dle ČSN EN ISO 7704, další testy provádět nemusí.

Příklad *Staphylococcus aureus*

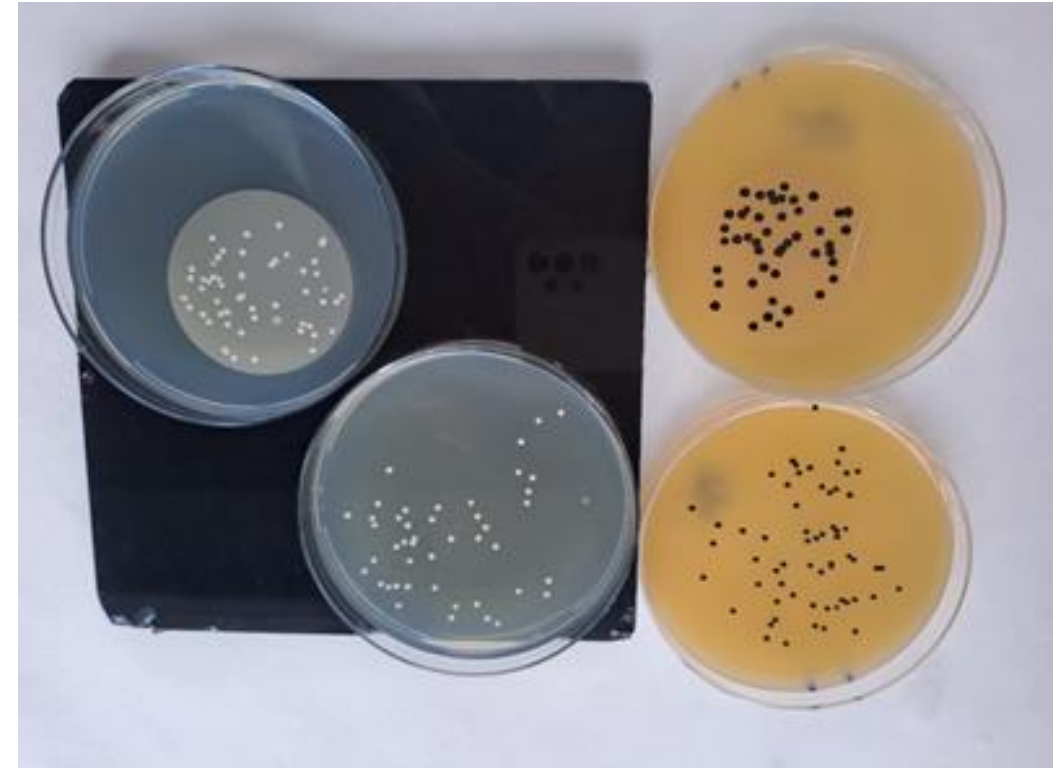
S. aureus 3953

BP šarže VM945706040

TYA 424181

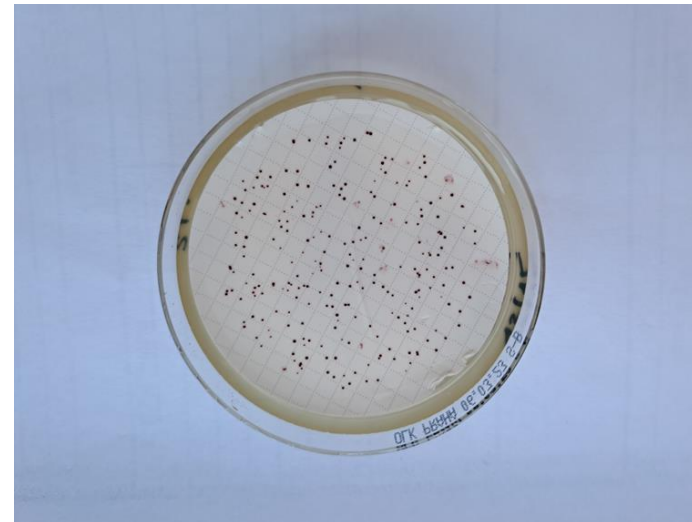
známá koncentrace kmenu (11-15), ředění -5 , -6

BP		TYA		
MF	PV	MF	PV	
11.10. (-6)	50	64	56	49
11.10. (-5)	14	6	17	5
	78%			



Intestinální enterokoky

- Jsou (měly by být) součástí i kráceného rozboru pitné vody
- Více analýz – více záchytů - **Posílejte kmeny 😊!** ... v roce 2023 se ještě neoprojevilo
- ČSN EN ISO 7899-2 *E. faecalis, faecium, durans a hirae* (2 hodiny konfirmace)
- Enterolert DW: *Enterococcus spp.*
- Letos dokončíme – VB 2026(?)



C7
(++) (A)

E2421

Aerococcus
viridans

2.14

Enterokoky naše průběžné výsledky z pitných vod

Intestinální enterokoky

N=81

Po 2 hodinách na ŽEA negativní (10 %)

97,5 % pozitivních na Enterolertu DW

Druhy:

faecium 28, *casseliflavus* 18,
hirae 14, *faecium* 9, *mundtii* 6,
durans 4, *gallinarum* 2, *moraviensis* 1

Další druhy izolované z média SB

N=40

6 ŽEA pozitivní (15 %)

4 pozitivní na Enterolertu DW (10 %)

Druhy

Aerococcus viridans (37)

Lactobacillus plantarum (1) – ten bývá vždy ŽEA +

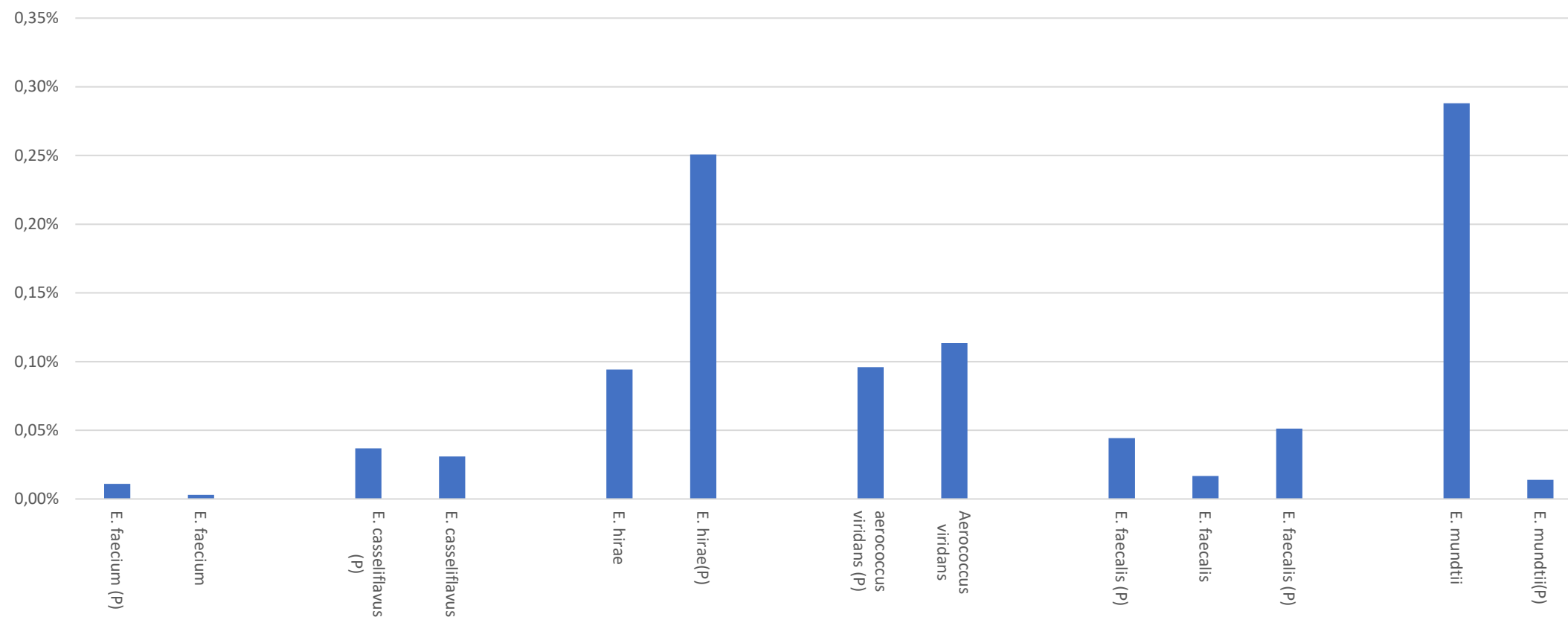
Streptococcus infantarius (1)

Carnaroibacteirum maltaromaticum (1)

a další “mrtvolky” – nevyrostly ani nereagovaly

Citlivost různých druhů enterokoků k volnému chloru

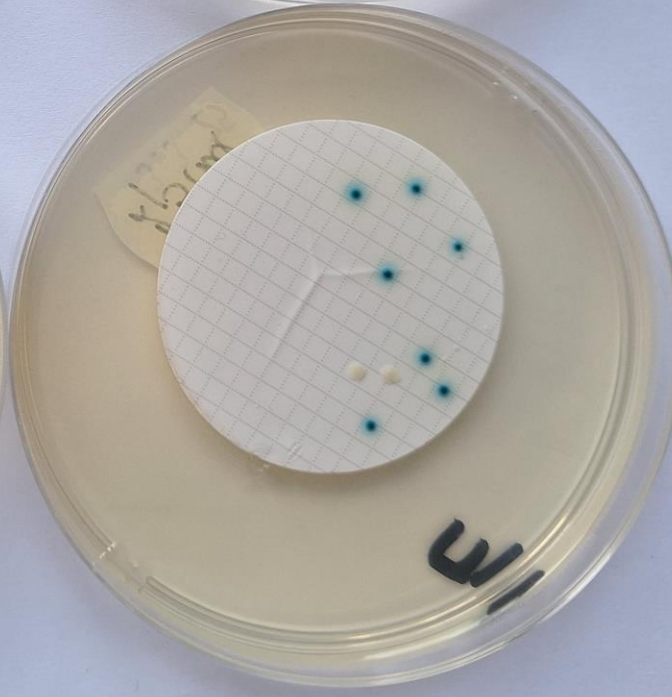
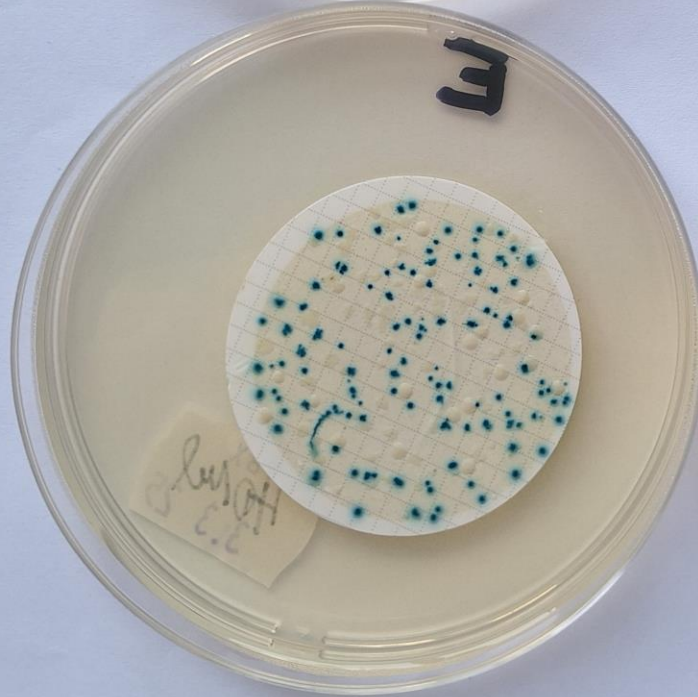
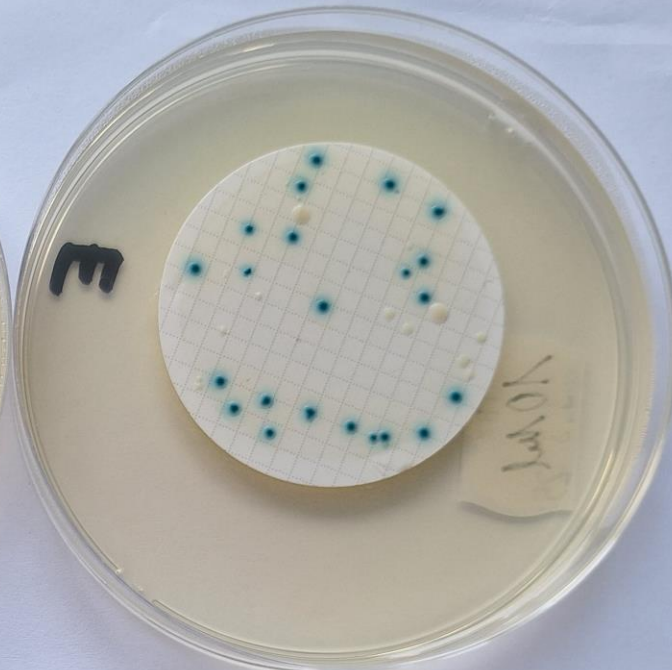
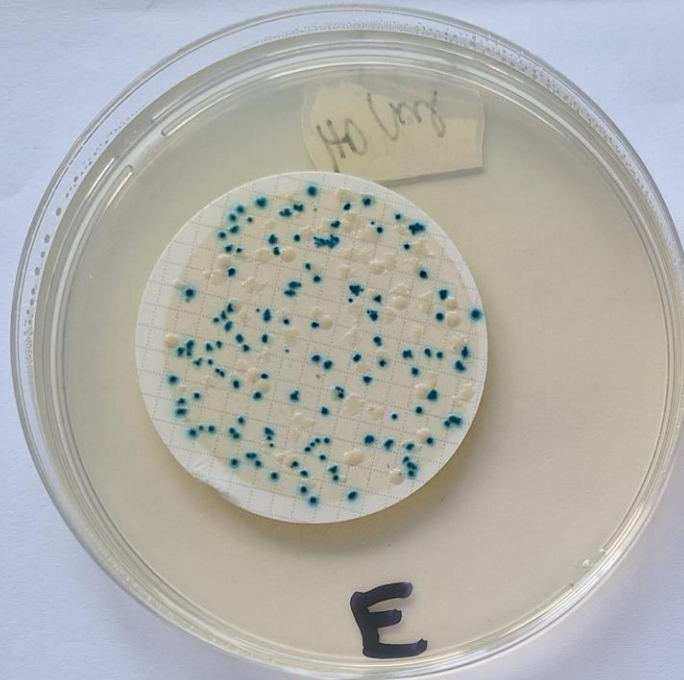
zbytek po 1 minutě působení Cl₂ (0,15-0,17 mg/l)



Stanovení *E. coli* v přírodních koupacích vodách



- Připravuje se EN ISO 9308-4 ve fázi validace metody
- TBX agar, 4 h při 36°C a 21 h při 44°C , u sladkých vod pouze změna teploty
- Mezilaboratorní studie – v první fázi 20 laboratoří (reprodukovatelnost metody, umělé vzorky)
- Druhá fáze – stabilita vzorků – doba zpracování začíná teď
- PT V3 2025 průměr ze 3 vzorků 24 KTJ/10 ml (ostatní metody : 22, 17, 16) - vešlo by se do rozmezí správných hodnot



Reprodukovatelnost výsledků

	Concentration in vials (cfu/ml)					
	E. coli ¹	E. coli + background ¹	Background ²	Background ³		
	ISO/DIS 9308-4	Spread plate TSA 44°C	Spread plate TSA 44°C - ISO/DIS 9308-4 targets*	ISO/DIS 9308-4 (n=4) ^{3a}	TBX 37°C (n=1) ^{3b}	TBX 43°C (n=1) ^{3b}
vial A = G	235 ± 34	1464 ± 173	1228 ± 170	379 ± 62	1722	1426
vial B = H	0	0	0	0	0	n.t.
vial C = E	1220 ± 136	2442 ± 240	1222 ± 274	401 ± 50	1408	1399
vial D = F	0	1201 ± 97	1201 ± 97	386 ± 49	1637	n.t.
1. Results from homogeneity test manufacturer (Biosisto BV) based on 20 vials						
2. Result obtained by subtracting the target counts from the total counts for each tested vial						
3. Background flora contains high concentration E. cloacae WR3, low concentration K. pneumoniae and P. shigelloides; in our hands, E. cloacae WR3 does not grow on TBX at 44C, but it does on TSA; the other 2 species can grow on TBX as well as TSA at 44C						
3a. RIVM data based on 4 vials, spiked water samples following ring trial protocol						
3b. RIVM data based on 1 (37C) or 2 (43C) vials, spiked water samples						

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 pozdním podzimním/zimním termínem

PROSBA O VYPLNĚNÍ ZPĚTNÉ VAZBY!

PROSBA o enterokoky z pitné vody

Zajímavosti z praxe



Děkuji za pozornost

dana.baudisova@szu.cz +420 226 708 575

