

Mezilaboratorní porovnávání - „Nové mikrobiologické metody k analýzám koupacích vod“

Ve dnech 17.-18.9. 2012 probíhalo mezilaboratorní porovnávání nových mikrobiologických metod k mikrobiologickým analýzám koupacích vod. Celkem se zúčastnilo 8 laboratoří plus 2 laboratoře referenční (VÚV TGM, v.v.i a SZÚ). Byly distribuovány 2 vzorky povrchových vod- vzorek A byl odebrán z Vltavy v Praze 6 – Podbabě (povrchová voda s nízkým obsahem doprovodné mikroflóry) a vzorek B z lokality rybník Šeberák (Praha 4) – oficiální koupací profil. Vzorek B tak představoval typickou „vodu ke koupání“ s vysokým obsahem doprovodné mikroflóry. Každá laboratoř otestovala vzorek standardními metodami používanými v laboratořích a podle vlastního výběru nově testované metody. Nutno poznamenat, že nové metody k analýzám koupacích vod byly pro řadu účastníků neznámé, neměly s nimi žádnou vlastní praktickou zkušenost a proto je nutno i toto mezilaboratorní porovnání chápat jinak (orientačně), než ta porovnání, organizovaná na metodách, v laboratořích již zavedených.

Jako standardní metoda používaná ke stanovení *E. coli* byla 8* uvedena metoda dle normy ČSN EN ISO 9308-1, 1* metoda dle ČSN 757835 a 1* Colilert Quanti-Tray. U stanovení intestinálních enterokoků byla standardně vždy použita metoda dle ČSN EN ISO 7899-2, z hlediska zastoupení firem to bylo 3* Himedia, 3* Merck, 1*Oxoid, 1* Biokar, 1* Trios a 1* nebyla firma použitého SB agaru uvedena. Kromě vzorků byly laboratořím předány podrobné postupy jak nové metody provádět a veškerý potřebný laboratorní materiál. Compass ccAgar byl bohužel z organizačních důvodů testován pouze v referenčních laboratořích. Testované metody a počet účastníků jsou uvedeny v tabulce 1. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 2 a 3, čísla 1-10 uvádějí kódy laboratoří. Výsledky byly dále statisticky zpracovány, a jsou uvedeny v tabulkách 4 a 5. Jsou uvedeny minimum, maximum, aritmetický průměr a variační koeficient – RSD (relativní směrodatná odchylka, tj. podíl rozptylu na průměru). Dále jsou uvedeny meze pravděpodobného rozložení výsledků 95 % (+/- 2 směrodatné odchylky z aritmetického průměru). Rozdíly v záchytu *E. coli* a enterokoků jednotlivými metodami (geometrický průměr) jsou uvedeny na obrázcích 1 a 4.

Tabulka 1: Seznam testovaných metod a počet účastníků.

	Počet účastníků
Escherichia coli	
ČSN EN ISO 9308-3	6
Chromocult Coliformen agar – dále CCM (Merck)	10
Rapid 2 E. coli Agar (Biorad)	10
Compass ccAgar – dále Compass (Biokar Diagnostics)	2
Intestinální enterokoky	
ČSN EN ISO 7899-1	6
Enterolert E	4
Enterolert DW	4

Tabulka 2: Výsledky analýz u vzorku A - primární data (KTJ/100 ml)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>E. coli</i>										
Standardní	500	200	100	300	225	200	100	70	Méně 50	133,8
9308-3	195	179				143	177		109	143
CCM	150	150	175	350	25	50	150	130	225	50
Rapid 2 ECOLI	200	150	150	300	100	125	150	320	250	400
Compass									200	250
Enterokoky										
Standardní	40	100	30	30	43	75	68	40	50	50
7899-1	30	Méně 15				30	61		46	Méně 15
Enterolert E			10					10	10	31
Enterolert DW			41					40	10	31

Tabulka 3: Výsledky analýz u vzorku B - primární data (KTJ/100 ml)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>E. coli</i>										
Standardní	220	200	Méně 10	250	přerostlé	260	přerostlé	80	130	48,4
9308-3	519	332				327	324		309	307
CCM	120	130	10	120	130	110	přerostlé	160	145	200
Rapid 2 ECOLI	240	170	30	180	240	240	přerostlé	230	190	200
Compass									172	260
Enterokoky										
Standardní	70	40	22	13	40	55	41	54	40	13
7899-1	30	46				61	46		46	30
Enterolert E			73					67	32,7	48,7
Enterolert DW			16					14	10,9	21,1

Tabulka 4: Výsledky stanovení *E. coli* různými metodami (KTJ/100 ml) – statistika

	Minimum	Maximum	Aritmetický průměr	Variační koeficient	Rozmezí p 95 % (+/-) 2 SD
Vzorek A					
Standardní metoda	70	500	203	66 %	0-469
ČSN EN ISO 9308-3	109	195	158	20 %	94-221
CCM	25	350	146	66 %	0-336
Rapid 2 E. coli agar	100	400	215	46 %	17-412
Compass	200	250	225	16 %	154-296
Vzorek B					
Standardní metoda	48	260	170	50 %	2-338
ČSN EN ISO 9308-3	307	519	353	23 %	189-517
CCM	10	200	125	41 %	23-227
Rapid 2 E. coli agar	30	240	191	35 %	58-324
Compass	172	260	216	29 %	92-340

Tabulka 5: Výsledky stanovení intestinálních enterokoků různými metodami (KTJ/100 ml) – statistika

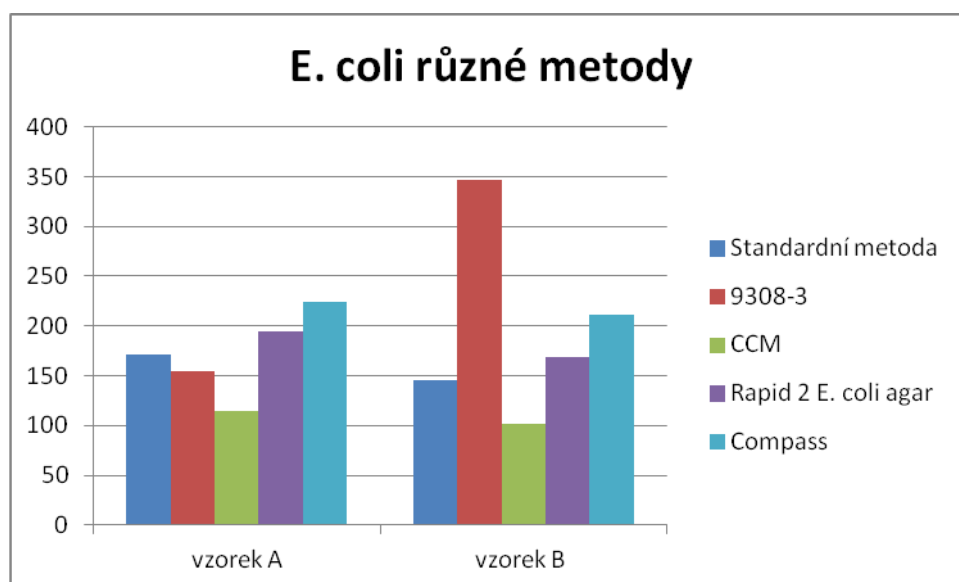
	Minimum	Maximum	Aritmetický průměr	Variační koeficient	Rozmezí p 95 % (+/-) 2 SD
Vzorek A					
Standardní metoda	30	100	53	42%	8-97
ČSN EN ISO 7899-1	Méně 15	61	31	64%	0-77
Enterolert E	10	31	15	69%	0-36
Enterolert DW	10	41	31	47%	2-59
Vzorek B					
Standardní metoda	13	70	39	48%	2-76
ČSN EN ISO 7899-1	30	61	43	27%	20-67
Enterolert E	33	73	55	33%	19-92
Enterolert DW	11	21	16	28%	7-24

Diskuse výsledků:

Stanovení *Escherichia coli*

Grafické znázornění výsledky stanovení *E. coli* různými metodami (geometrický průměr) je uvedeno na obr. 1.

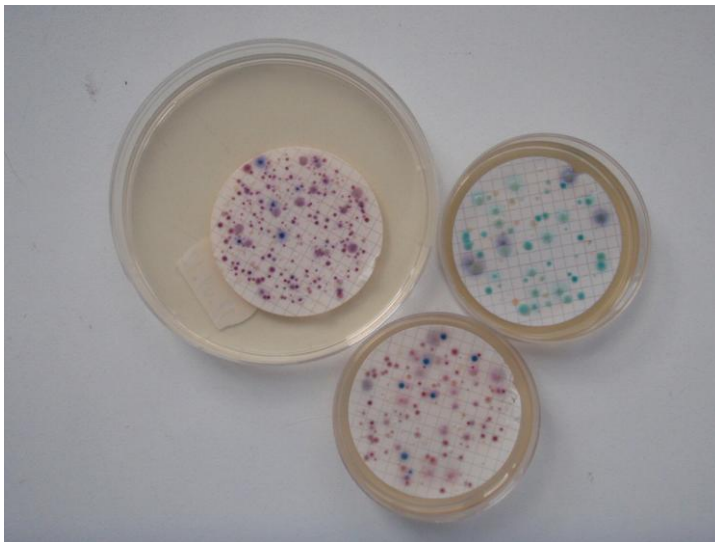
Obr. 1: Stanovení *E. coli* různými metodami (KTJ/100 ml)



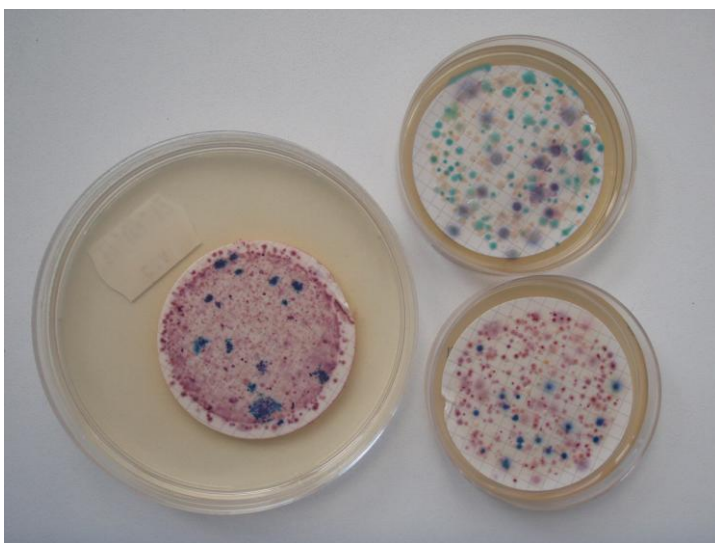
Výsledky u obou vzorků se významně nelišily, u vzorku B (rybník) bylo detekováno velké množství doprovodné mikroflóry, což jsme však očekávali. Velké množství doprovodné mikroflóry dělalo největší potíže u chromogenních médií (obr. 3 a 4) a u metody dle ČSN EN ISO 9308-3. Ve čtyřech případech byly dokonce udány výsledky jako „přerostlé“. Statisticky zpracované výsledky téměř vždy vykazaly enormně široké meze p 95 (průměr +/- 2 SD), což je z hlediska správnosti výsledků až nerealistické.

Nejhorší výsledky, pokud jde o rozptyl (relativní směrodatná odchylka) – 66 a 50 % vykazala standardní metoda, nutno však připustit, že byly použity standardně 3 různé metody (ČSN EN ISO 9308-3, Colilert a ČSN 757835). Metoda dle ČSN 757835 výsledky podhodnocuje a metoda dle ČSN EN ISO 9308-1 je zatížena vysokou chybou, vzhledem k nutnosti přeočkování vybraných kolonií a následnému přepočítávání výsledků. Překvapivě nejlepší výsledky byly získány metodou dle ČSN EN ISO 9308-3 (mikrotitrační destičky) – RSD 20 resp. 23 %. Z chromogenních médií byly lepší výsledky dosaženy u Rapid 2 *E. coli* agaru (RSD 46 a 35 %) než u CCM agaru (RSD 66 a 41 %), a to zřejmě proto, že se barvy kolonií na Rapid 2 *E. coli* agaru (tyrkysová a fialová) lépe odlišují než růžová a fialová na CCM agaru. Nízká hodnota RSD u Compass agaru byla získána zřejmě díky tomu, že tuto metodu prováděly jen 2 laboratoře. U tohoto média je barevná kombinace shodná jako u CCM agaru (viz obr. 2 a 3).

Obr. 2: Záchyt *E. coli* na různých chromogenních médiích - vzorek A, méně doprovodné mikroflóry (vlevo nahoře Compass, vpravo nahoře Rapid 2 *E. coli* agar, dole CCM)



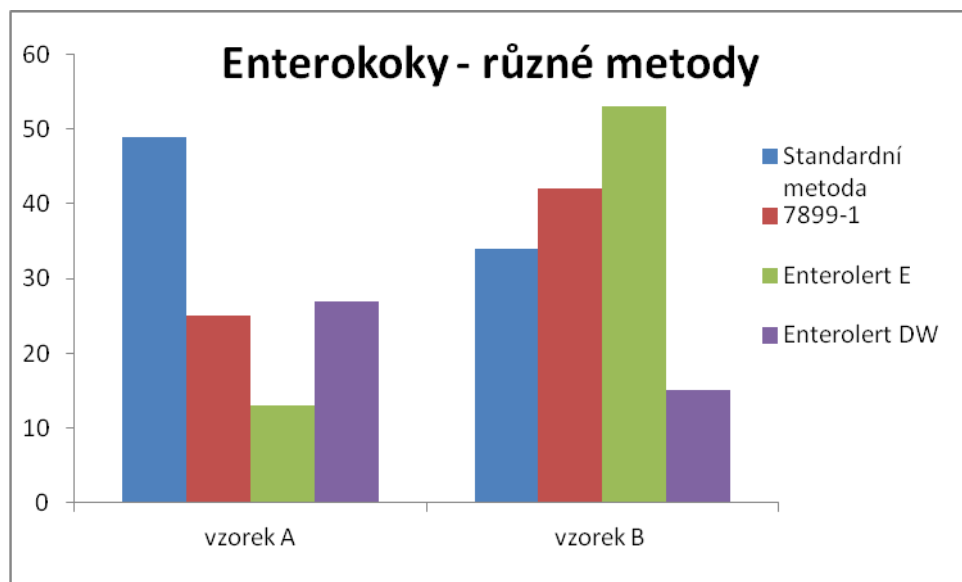
Obr. 3: Záchyt *E. coli* na různých chromogenních médiích - vzorek B, více doprovodné mikroflóry (vlevo nahoře Compass, vpravo nahoře Rapid 2 *E. coli* agar, dole CCM)



Stanovení intestinálních enterokoků

Grafické znázornění výsledky stanovení intestinálních enterokoků různými metodami (geometrický průměr) je uvedeno na obr. 4.

Obr. 4: Stanovení intestinálních enterokoků různými metodami - (KTJ/ 100 ml)



Výsledky stanovení enterokoků byly překvapivě lepší, než tomu bylo u *E. coli*. Získané meze p 95 (průměr +/- 2 SD) víceméně odpovídaly realitě a to i přes to, že byly detekovány nižší počty. Nízkými počty byla nejvíce zatížena metoda ČSN EN ISO 7899-1 (mikrotitrační destičky), kdy byl ve dvou případech u vzorku A nulový záchyt (což znamená méně než 15 KTJ/100 ml). Pro statistické hodnocení a grafické znázornění výsledků byla hodnota méně než 15 extrapolována na 10. Překvapivě stabilní výsledky vykazovala standardní metoda (přestože byl použit SB od pěti výrobců). Enterokoky stanovené Enterolerty E a DW vykazovaly rozdíly u obou vzorků, u vzorku A byla RSD 69 % u Enterolertu E a 47 % u Enterolertu DW, u vzorku B to bylo 33 a 28 %. Je však nutné vzít v úvahu nižší počet enterokoků u vzorku A, což jistě ovlivnilo toto hodnocení.