

# **EVROPSKÝ SROVNÁVACÍ PROTOKOL: ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA**

**Colin R. Fricker, Seppo I. Niemela a John L. Lee**

**září 2000**

## Shrnutí

Bylo provedeno rozsáhlé testování, kterého se zúčastnilo dvacet laboratoří ze třinácti evropských zemí. Záměrem testování bylo ověřit, zda je protokol pro porovnání dvou mikrobiologických metod vhodný pro svůj účel. Referenční procedura ISO pro zjištění koliformů a *E. coli* ve vodě byla porovnáována s metodou Colilert 18/QuantiTray. Rozbor dat byl proveden nezávisle a to žádnou z účastnících se laboratoří.

Prošetření dat ukázalo, že používání „konfirmačních koeficientů“ neboli „podílu skutečně pozitivních výsledků“ k porovnávání těchto dvou metod vykazuje jistou míru neurčitosti. Data získaná vynásobením počtu suspektních kolonií a konfirmačních koeficientů typických pro danou laboratoř nemá dostatečně normální rozdělení (založené na gaussovské statistice), aby umožnila parametrický test. Neparametrické testy nejsou relevantní při porovnávání skutečných průměrů. Musíme tedy akceptovat statisticky nedostačující kompromis testování součtů těchto 20 laboratoří.

Data získaná v jedné laboratoři, kde byly potvrzovány všechny kolonie u velkého počtu vzorků, prokázala, že používání konfirmačních koeficientů vedlo k podhodnocení výtěžnosti metody Colilert v porovnání s metodou ISO. Zatímco potvrzení všech izolátů v této konkrétní laboratoři prokázalo, že metoda Colilert zachytila výrazně více výskytů *E. coli* než metoda referenční, použití konfirmačního koeficientu by vedlo k závěru, že referenční metoda zjistila výrazně více výskytů *E. coli* než Colilert. Porovnávání odchylek mezi jednotlivými vzorky může být zavádějící. Z dat však bylo zřejmé, že konfirmační stupeň byl u metody Colilert ve většině laboratoří výrazně vyšší než u metody referenční a výsledky metody Colilert bylo možno použít bez potvrzování. Konfirmační stupeň u metody Colilert byl obecně podhodnocován, protože pro definici přítomnosti koliformů bylo použito zkvašování laktózy. Je zřejmé, že mnoho koliformů nedokáže během 48 hodin laktózu zkvasit, ale dokáže rozštěpit ONPG pomocí  $\beta$ -D-galaktosidázy. Pokud by definicí přítomnosti koliformu byla přítomnost  $\beta$ -D-galaktosidázy, potom by konfirmační stupeň byl u metody Colilert vyšší.

Bylo provedeno porovnání relativních odchylek součtů organismů zjištěných každou laboratoří a průměrné relativní odchylky. Toto porovnání prokazuje, že metoda Colilert zachytila výrazně více koliformů než metoda ISO a že při zjišťování přítomnosti *E. coli* nebyl žádný zřetelný rozdíl mezi metodou Colilert a metodou ISO. Aby se zjistilo, zda je používání konfirmačních koeficientů přípustné, a aby byla získána užitečnější data u bakterie *E. coli*, byly v pěti laboratořích prováděny další testy. Tyto testy zahrnovaly potvrzování všech kolonií získaných z malého počtu vzorků; následný statistický rozbor výsledků prokázal, že metoda Colilert byla v některých laboratořích výrazně lepší než referenční metoda ISO a ve zbývajících laboratořích byla stejně dobrá. Docházíme k závěru, že metoda Colilert je vhodným alternativním postupem při zjišťování *E. coli* a koliformů ve vodě.

Byl vyvinut protokol, u kterého bylo prokázáno, že je vhodný pro porovnávání dvou mikrobiologických metod. Principem tohoto protokolu je, že by mělo být zapojeno poměrně málo laboratoří (navrhováno je pět) z různých geografických míst a s různými typy vody. Vzorky by neměly být „pitnou vodou“, ale mělo by jít o pitnou vodu znečištěnou vodou odpadní, která je potom chlorována, nebo o pitnou vodu naočkovanou vodou říční v závislosti na tom, zda tato laboratoř normálně provádí rozbor chlorované nebo nechlorované pitné vody. Tímto způsobem se lze vyhnout nutnosti použít velmi vysoký počet vzorků. I když není zapotřebí velký počet vzorků, je důležité, aby bylo získáno

velké množství potvrzených dat, a z tohoto důvodu jsou upřednostňovány vzorky s poměrně nízkým počtem cílových organismů, takže lze potvrdit všechny izoláty.

## Úvod

Mikrobiologická kvalita pitné vody je zajišťována prostřednictvím programu častých rozborů vzorků vody, která opouští čističky, vody v rozvodné soustavě a u kohoutků zákazníků. Tyto časté rozборы zjišťující indikátorové organismy, koliformy, bakterii *Escherichia coli*, fekální streptokoky a bakterii *Clostridium perfringens* jsou předepsány ve směrnici Evropské unie pro pitnou vodu (EUDWD) a budou v členských státech zahrnuty do místních zákonů. Směrnice EUDWD určuje metodu, která má být používána ke zjišťování koliformů a *E.coli* a která zahrnuje membránovou filtraci a inkubaci na agarovém médiu tergitol-TTC. Ačkoliv není pro členské státy povinné, aby používaly tuto metodu, je zde povinnost prokázat, že jakákoliv alternativní metoda, která má být používána, má podobnou výtěžnost.

Přesná podstata této podobnosti není určena, stejně jako není určena metodologie, která má být použita při porovnávání těchto metod. V článku 7, části 5b tato evropská směrnice konkrétně uvádí, „Metody odlišné od těch, které jsou uvedeny v dodatku III, části 1, lze používat za předpokladu, že je možné prokázat, že získané výsledky jsou přinejmenším stejně spolehlivé jako ty, které byly získány uvedenými metodami. Členské státy, které využívají alternativní metody poskytnou Komisi všechny příslušné informace týkající se takovýchto metod a jejich ekvivalentnosti.“

Obecně se uznává, že alternativní metody by měly mít výtěžnost, která je ekvivalentní nebo vyšší. V této souvislosti je třeba určit význam výrazu „ekvivalentní nebo vyšší“. Metoda je obvykle považována za „ekvivalentní“, pokud není (potvrzená) záchytnost cílových organismů výrazně nižší než u metody referenční. Výraz „výrazně nižší“ však také vyžaduje definici. „Ekvivalentnost“ může zahrnovat také další faktory kromě citlivosti metody. Při porovnávání dvou metod se často stane, že lze vzít v úvahu také praktičnost testů. Například test, jehož provedení trvá jeden den a který má podobnou citlivost jako jiný test, jehož provedení trvá tři dny, lze považovat za „lepší“ nebo přinejmenším vhodnější.

Za účelem odzkoušení a vyvinutí protokolu pro porovnávání kvantitativních metod pro mikrobiologické kultury byl vybudován velký tým laboratoří ze třinácti evropských zemí (Příloha 1). Byl vyvinut podrobný protokol k provádění porovnání mezi evropskou referenční metodou a metodou Colilert 18/QuantiTray (Colilert), který odsouhlasili všichni účastníci (Příloha 2). Byly také zavedeny procedury na kontrolování kvality. Jako metoda, která má být porovnána, byl vybrán Colilert, protože jej lze snadno použít, jeho provedení je rychlé, vyžaduje minimum školení a umožňuje, aby mikrobiologické testy prováděla široká skupina laboratorního personálu.

## Testování

### Počáteční testování

Počáteční testy byly prováděny v průběhu několika měsíců na sklonku roku 1999. Jednotlivé laboratoře používaly ty typy vody, které by vyšetřovaly normálně během svého rutinního provozu. Proto ty laboratoře, které rutinně vyšetřují nechlorovanou vodu, při porovnávání použily tento typ vody, zatímco ty, které typicky vyšetřují vodu chlorovanou, použily – povětšinou – dezinfikovanou odpadní vodu za použití postupu vyvinutého společností Thames Water a následně pozměněného službou Public Health Laboratory Service ve Velké Británii. Před zahájením porovnávání se konalo školení, kde byl personál, který potom testy skutečně prováděl, školen, jak má oba testy provádět a tam, kde to bylo nutné, jak má připravit dezinfikovanou odpadní vodu. Navíc školený personál navštěvoval jednotlivé laboratoře, kde prošel dalším školením a získal informace tam, kde to bylo třeba.

Každá laboratoř provedla potvrzení u malého množství výsledků, jak je popsáno v Příloze 2, a také zaslala jednotlivé kmeny mikroorganismů do ústřední laboratoře za účelem nezávislého potvrzení. Jedna laboratoř provedla potvrzení všech vzorků, kde výsledek u jednoho z těchto dvou testů byl deset nebo méně organismů na 100 ml vody. Všechno toto potvrzování izolátů z různých laboratoří bylo prováděno s cílem určit „podíl skutečně pozitivních výsledků“ u každého testu v každé laboratoři.

### Druhá fáze testování

Druhá fáze testování, kdy byla rozbořem vzorků zjišťována pouze bakterie *E.coli*, probíhala během června a července roku 2000. Tato část testování probíhala v pěti laboratořích a všechny izoláty (buď kolonie na membránách nebo pozitivní testovací prohlubně u metody Colilert) byly potvrzovány. Rozbor všech vzorků byl prováděn stejným personálem, který navštívil danou laboratoř, aby tuto práci provedl.

Výsledky byly shromážděny v jedné laboratoři a následně nezávisle analyzovány profesorem Seppem Niemelem.

## Výsledky

### Počáteční testování

Tabulka č. 1 uvádí počet použitelných datových bodů z každé laboratoře. Vzorky, u kterých obě metody dávaly negativní výsledek (0/0), byly odstraněny, stejně jako všechny vzorky, kde byly výsledky nahlášeny jako „více než“ nebo „příliš četné pro spočítání“.

**Tabulka č. 1.** Počet vzorků, které jsou k dispozici pro porovnání metod.

Laboratoř	Počet vzorků u celkového počtu koliformů	Počet vzorků u bakterie Escherichia coli
1	218	170
2	633	625
3	110	64
4	30	31
5	44	50
6	60	63
7	76	35
8	38	31
9	61	63
10	29	44
11	24	12
12	45	38
13	153	150
14	138	133
15	38	29
16	52	59
17	200	173
18	132	125
19	727	790
20	50	50
Celkem	2921	2672
:		

Množství informací pro porovnání obou metod je přímo úměrné počtu pozorovaných kolonií.

**Tabulka č. 2.** Počet pozorovaných suspektních kolonií (a odpovídající počty podle metody Colilert). (TC – celkový počet koliformů, EC – *Escherichia coli*)

Laboratoř	Suspektní Colilert TC	Suspektní Tergitol TC	Suspektní Colilert EC	Suspektní Tergitol EC
1	8378	6982	230	475
2	23220	13637	3728	6291
3	1310	1084	108	511
4	1147	378	316	331
5	1753	1524	588	889
6	1383	1471	449	940
7	2323	1333	141	483
8	1525	1047	512	477
9	1715	2624	655	1018
10	183	245	715	186
11	443	259	24	44
12	1447	611	182	265
13	5068	5137	542	762
14	2940	1376	373	622
15	1011	209	266	270
16	3337	571	1518	1349
17	4328	4235	602	1256
18	2509	1609	468	1257
19	13838	13592	2531	4888
20	909	974	211	786
Celkem:	78770	58898	14160	23100

Množství informací, kterými přispěla každá laboratoř, se značně liší.

Množství informací, které je k dispozici pro porovnání metod určujících celkový počet koliformů, je téměř čtyřikrát vyšší než množství informací, které je k dispozici pro porovnání metod určujících *E.coli*. Tento rozdíl se ještě zvýší poté, když jsou použity konfirmační koeficienty (viz tabulky č. 6 a 8).

Za účelem určení konfirmačních koeficientů izolovala každá laboratoř řadu kultur k potvrzení. Spolehlivost koeficientu souvisí s počtem testovaných kultur.

**Tabulka č. 3.** Počet kultur testovaných v každé laboratoři za účelem určení průměrného konfirmačního koeficientu pro každou z těchto čtyř metod. Koeficienty samy jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Laboratoř	Colilert TC	Tergitol TC	Colilert EC	Tergitol EC
1	148	109	97	125
2	356	310	323	308
3	99	109	57	60
4	52	22	22	25
5	50	50	50	50
6	28	30	28	28
7	51	46	29	41
8	39	133	41	129
9	20	18	18	19
10	38	32	12	24
11	30	28	7	14
12	34	34	24	31
13	113	107	114	118
14	101	96	68	82
15	89	52	48	48
16	70	55	58	59
17	100	55	100	42
18	26	27	25	27
19	1894	2265	1766	3806
20	25	25	25	25
Celkem:	3363	3603	2912	5061

Počet kultur, které izolovala každá z laboratoří, se velice lišily a malé počty vedou k nepřesným koeficientům, což zvyšuje náhodné rozdíly mezi laboratořemi.

Pro každou laboratoř byly vypočítány „konfirmační koeficienty“ (podíl izolátů, které byly zjištěny každou z metod a u kterých následně potvrzující testy prokázaly, že jde o cílové organismy), které jsou uvedeny v tabulce č. 4.

**Tabulka č. 4.** Tabulka konfirmačních koeficientů.

Laboratoř	Colilert TC	Tergitol TC	Colilert EC	Tergitol EC
1	0,53	0,21	0,56	0,18
2	0,77	0,48	0,86	0,59
3	0,91	0,83	0,93	0,78
4	0,90	0,82	0,91	0,64
5	0,90	0,86	0,92	0,70
6	1,00	1,00	0,96	1,00
7	0,75	0,74	0,90	0,46
8	0,95	0,90	0,88	0,76
9	0,75	0,67	0,83	0,63
10	1,00	0,66	0,92	0,46
11	0,90	0,93	1,00	0,50
12	0,62	0,91	0,92	0,94
13	0,88	0,65	0,97	0,85
14	0,83	0,77	0,75	0,30
15	0,57	0,60	1,00	0,56
16	0,60	0,82	0,97	0,83
17	0,91	0,67	0,97	0,26
18	0,92	0,96	0,88	0,41
19	0,97	0,74	0,99	0,42
20	1,00	0,92	1,00	0,44

Je zřejmé, že existují významné rozdíly mezi konfirmačními koeficienty získanými v různých laboratořích a mezi metodami. Rozsahy, průměrné hodnoty, standardní odchylky a standardní chyby průměrné hodnoty konfirmačních koeficientů jsou uvedeny v tabulce č. 5.

**Tabulka č. 5.** Rozsah, průměrná hodnota, standardní odchylky a standardní chyba průměrné hodnoty u všech zúčastněných laboratoří.

Metoda	Rozsah konfirmačních koeficientů	Průměrná hodnota konfirmačního koeficientu	Standardní odchylka	Standardní chyba průměrné hodnoty
Colilert – koliformy celkem	0,53-1,0	0,83	0,15	0,034
Tergitol – koliformy celkem	0,21-1,0	0,76	0,19	0,043
Colilert – E.coli	0,56-1,0	0,91	0,10	0,022
Tergitol – E.coli	0,18-1,0	0,59	0,23	0,051

Průměrné hodnoty byly vypočítány jednoduchým sečtením konfirmačních koeficientů z každé laboratoře a vydělením 20 (počet laboratoří, které předložily konfirmační data). Ve většině případů vykazoval Colilert vyšší konfirmační koeficienty jak u koliformů, tak u *E.coli*.

Bylo však patrné, že v některých laboratořích byl konfirmační koeficient u koliformů o něco nižší u metody Colilert než u metody referenční. Tento jev byl v jedné laboratoři zkoumán a bylo ukázáno, že jde o důsledek přítomnosti koliformů, které nebyly schopné zkvasit laktózu, ale byly ONPG-pozitivní. Tyto organismy jsou koliformní, ale postup používaný při testování by jejich přítomnost nepotvrdil, protože konfirmace byla založena na zkvašování laktózy. Tyto „přírodní“ koliformy tvoří v některých vodách podstatnou část přírodní flóry a bylo prokázáno, že jsou v jiných zemích běžné (Fricker *et al.*, 1997). V mnoha laboratořích byl proto konfirmační koeficient u metody Colilert pravděpodobně podhodnocen.

Tabulka č. 6 uvádí porovnání metody Colilert s referenční metodou u celkového počtu koliformů založeného na potvrzených počtech a jejich relativních odchylkách.

**Tabulka č. 6.** Porovnání metod Colilert a Tergitol u celkového počtu koliformů pomocí potvrzených počtů a jejich relativních odchylek.

Laboratoř	Součet potvrzených celkových počtů koliformů podle metody Colilert	Součet potvrzených celkových počtů koliformů podle metody Tergitol	Relativní odchylka součtů v %
1	4444	1466	100,7
2	17880	6545	92,8
3	1192	899	28,0
4	1032	310	107,6
5	1577	1310	18,5
6	1383	1471	-6,2
7	1742	986	55,4
8	1448	942	42,4
9	1286	1758	-31,0
10	182	161	12,3
11	398	240	49,4
12	897	556	47,0
13	4459	3339	28,7
14	2440	1059	78,9
15	576	125	128,5
16	2002	615	105,9
17	3938	2837	32,5
18	2308	1544	39,6
19	13475	10072	28,9
20	908	896	1,4
Součet celkem:	63570	37140	
Průměrná hodnota	3178	1857	48,06

Tam, kde jsou hodnoty uvedeny jako minus (-), to znamená, že médium tergitol-TTC zachytilo více koliformů než Colilert.

Prostý průměr procentních odchylek mezi součty z těchto 20 laboratoří byl 48,06 % a náhodou je v blízkosti skutečných relativních odchylek založených na celkových součtech nebo na průměru potvrzených počtů:

Relativní odchylka =  $200(63570-37140)/(63570+37140) = 52,49 \%$  (vypočítaný z celkového součtu) nebo

Relativní odchylka =  $200(3178,5-1857,0)/(3178,5+1857,0) = 52,49 \%$  (vypočítaný z průměrné hodnoty)

Rozsah proměnlivosti mezi jednotlivými laboratořemi je tak velký (od několika procent záporným směrem až po více než 100 procent směrem kladným), že náhodně mohla nastat daleko větší odchylka. Hlavními důvody těchto velkých odchylek jsou neurčitost konfirmačních koeficientů, důsledky shlukování kolonií v některých vzorcích a náhodná proměnlivost v důsledku statistiky rozložení částic.

Odchylka v řádu 50 % se zdá reálná a významná. Neexistuje žádný legitimní statistický test pro porovnání odchylek mezi celkovými součty (nebo ostatně i průměrnými

hodnotami), na hodnoty v posledním sloupci lze však aplikovat jednovzorkový t-test za předpokladu, že data mají normální rozdělení (viz tabulka č. 7). „Normální“ rozdělení označuje gaussovské normální rozdělení.

Pokud by se prokázalo, že průměrná relativní odchylka je statisticky významná (tj. významně odlišná od nuly), znamenal by tento výsledek, že metoda Colilert dává výrazně vyšší celkový počet koliformů než Tergitol.

Výsledky použití jednovzorkového t-testu na 20 hodnot z posledního sloupce tabulky č. 6 jsou uvedeny v tabulce č. 7.

**Tabulka č. 7.** Výsledky t-testů u relativní odchylky součtu koliformů zaznamenaných ve dvaceti laboratořích

Parametr	Relativní odchylka součtů v %
Průměrná hodnota	48,06
Standardní chyba průměrné hodnoty	9,48
t-hodnota	5,07
Pravděpodobnost (s 19 d.f.)	0,0001
95% interval spolehlivosti, dolní mez	28,2
95% interval spolehlivosti, horní mez	67,9
Wilk-Shapiro (normálnost rozložení)	0,968 (dobrá)

Pozorované relativní odchylky umožnily použít t-test, protože data se jevila dostatečně normálně rozdělená. Kromě t-hodnoty a její pravděpodobnosti je nejdůležitějším „parametrem“ dolní mez 95% intervalu spolehlivosti. Interval spolehlivosti neobsahuje hodnotu -10 %, která bude pravděpodobně přijata jako rozhodující mez v dokumentu ISO, který popisuje, jak porovnávat mikrobiologické metody. Hodnota 10 % je důležitá, protože je pravděpodobné, že v tomto dokumentu ISO bude uvedeno, že metodu lze považovat za ekvivalentní s referenční metodou, pokud dává výsledky, které nejsou o více než 10 % nižší. To znamená, že tato data jsou dostačující k tomu, aby prokázala, že testovaná metoda je stejná nebo lepší než metoda referenční.

Tabulka č. 8 uvádí porovnání metody Colilert s referenční metodou pro *E. coli* na základě potvrzených počtů a jejich relativních odchylek založených na součtech z laboratoří.

**Tabulka č. 8.** Porovnání metod Colilert a Tergitol u *E. coli* pomocí potvrzených počtů a jejich relativních odchylek.

Laboratoř	Potvrzený součet pro metodu Colilert	Potvrzený součet pro metodu Tergitol	Relativní odchylka součtů v %
1	129	85	40,6
2	3206	3711	-14,6
3	100	398	-119,3
4	287	211	30,3
5	541	622	-14,0
6	431	940	-74,2
7	126	222	-54,6
8	450	362	21,7
9	544	641	-16,4
10	657	85	154,0
11	24	22	8,7
12	167	249	-39,2
13	525	647	-20,9
14	279	192	36,7
15	266	151	55,0
16	1472	1119	27,2
17	583	326	56,5
18	411	522	-23,7
19	2509	2010	22,09
20	210	345	-48,7
Součet celkem:	12930	12870	
Střední hodnota	646,3	643,5	1,36

Skutečná relativní odchylka založená na celkových součtech:

Relativní odchylku lze vypočítat pomocí obecného vzorce  $200(A-B/A+B)$ .

Relativní odchylka tudíž je  $200(12930-12870)/(12930+12870)= 0,47 \%$

Skutečnou odchylku nelze statisticky testovat, protože celkové součty ani průměrné hodnoty nepředstavují autentické vzorky z Poissonova rozdělení. Prostý průměr relativní odchylky založený na těchto součtech je blízko skutečné hodnotě. Toto číslo lze statisticky testovat za předpokladu, že se data neodchylují od normálního rozdělení.

Výsledky aplikace jednovzorkového t-testu na 20 hodnot z posledního sloupce tabulky 8 jsou uvedeny v tabulce č. 9.

**Tabulka č. 9.** Výsledky jednovzorkového t-testu z tabulky č. 8

Parametr	Relativní odchylka součtů v %
Průměrná hodnota	1,36
Standardní chyba průměrné hodnoty	12,97
t-hodnota	0,10
Pravděpodobnost	0,9176
95% interval spolehlivosti, dolní mez	-25,8
95% interval spolehlivosti, horní mez	28,5
Wilk-Shapiro (normálnost rozložení)	0,941 (dostačující)

Nulová hypotéza, že mezi těmito metodami není žádný rozdíl, nebyla vyvrácena. To znamená, že by obě metody měly být považovány za ekvivalentní, pokud další data neprokáží opak. Data mají dostatečně normální rozdělení, aby byl tento test přípustný.

V důsledku velmi vysokých výkyvů mezi laboratořemi je průměrná hodnota velmi neurčitá a její standardní chyba zůstává vysoká. Interval spolehlivosti obsahuje hodnotu -10 %. To znamená, že ke konečnému zjištění skutečnosti, zda mez -10 % není v 95% intervalu spolehlivosti obsažena, je zapotřebí více dat nebo data o vyšší kvalitě.

Ideální situace, kdy je t-test založen na všech 2 671 stupních volnosti získaných u párů vzorků (viz tabulka č. 1), není realizována.

Po dokončení druhé fáze studie, během které byly všechny izoláty potvrzovány, se vyjasnilo, že bude lepší použít alternativní metodu statistického rozboru. Data byla proto znovu přezkoumána pomocí stejného statistického přístupu, který byl použit ve druhé fázi, a to jak u koliformů, tak u *E.coli*. Data byla „upravena“ tak, že byly vypuštěny následující případy (vzorky):

1. všechny případy (vzorky), kde byl počet podle metody Colilert nebo Tergitol nulový
2. počet podle metody Colilert vyšší než 201 (jde o bezpečnostní opatření, protože takto vysoké počty nejsou u metody Colilert 18 možné, pokud není použito ředění vzorků. Existují pochyby o tom, zda byla tato skutečnost brána v úvahu u průvodních výsledků podle metody Tergitol. To se týká pouze 20 celkových počtů koliformů a netýká se to žádných případů fekálních koliformů.)
3. případy, kde je počet podle metody Tergitol vyšší než 200.

Vyhodnocení je založeno na rozhodovacích pravidlech převzatých z dokumentu ISO. Slova „lepší“ a „horší“ obsahují hodnotové posouzení, které je širší než jen pouhé kvantitativní porovnání, a nejsou používána. Následující vyhodnocení obsahuje pouze kvantitativní porovnání průměrných odchylek mezi potvrzenými počty. Vyhodnocení obsahuje čtyři alternativy:

1. „vyšší“ se používá, pokud je průměrná relativní odchylka kladná (počty podle metody Colilert vyšší) a tato odchylka je statisticky významná. Statistická

významnost je zjišťována na základě pozorování, že dolní mez 95% intervalu spolehlivosti je vyšší než nula.

2. „nižší“ se používá, pokud je průměrná relativní odchylka záporná (počty podle metody Colilert nižší) a horní mez 95% intervalu spolehlivosti je méně než nula (záporná).
3. „bez rozdílu“ se používá, pokud interval spolehlivosti obsahuje nulu, ale dolní mez 95% intervalu spolehlivosti je vyšší než -10 %.
4. „více dat“ je požadováno, pokud 95 % interval spolehlivosti obsahuje jak 0 % tak -10 % (dolní mez 95 % intervalu spolehlivosti nižší než -10 %).

Následující text popisuje důvody pro použití konkrétního statistického přístupu, který byl použit, a tento přístup samotný. Statistické vyhodnocení relativní výtěžnosti metody pomocí rozhodovacích pravidel podrobně uvedených výše bylo založeno na průměrné relativní odchylce a její 95% intervalu spolehlivosti.

**Vážený průměr relativní odchylky** (relativní odchylka průměrných hodnot) je považován za nejlepší míru relativní výtěžnosti dvou metod. Je definován jako aritmetický rozdíl mezi průměrnými počty podle těchto dvou metod vydělený jejich průměrnou hodnotou. Lze jej vypočítat dvěma ekvivalentními způsoby, z nichž ten, který je založen na součtech, je méně postižen zaokrouhlovacími chybami.

Vážený průměr relativní odchylky ( $\bar{w}$ ) vypočítaný z průměrných hodnot počtů podle metod A a B

$$1 \quad \bar{w} = \frac{\bar{a} - \bar{b}}{(\bar{a} + \bar{b}) / 2} = \frac{2(\bar{a} - \bar{b})}{\bar{a} + \bar{b}}$$

Stejná veličina vypočítaná ze součtů n pozorování

$$2 \quad \bar{w} = \frac{2(\sum a_i - \sum b_i)}{(\sum a_i + \sum b_i)}$$

Tento odhad, který je u každé metody založen na jediném čísle (součtu nebo průměrné hodnotě), nemá empirickou standardní odchylku. Jeho standardní odchylku lze pouze odhadnout takzvaným odhadem typu B (ISO 1995). Protože v době vypracování této zprávy chyběl odhad typu B, byla jako přiblížení použita empirická standardní odchylka **prosté relativní průměrné hodnoty** ( $\bar{u}$ ). Prostá průměrná hodnota je aritmetický průměr  $n$  jednotlivých relativních průměrných hodnot

$$3 \quad \bar{u} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{2(a_i - b_i)}{(a_i + b_i)} = \frac{2}{n} \sum_{i=1}^n \frac{d_i}{a_i + b_i}$$

$a_i$ = potvrzený počet podle metody A v  $i$ -tém vzorku

$b_i$ = potvrzený počet podle metody B v  $i$ -tém vzorku

$d_i$ =  $a_i - b_i$

Předpokládalo se, že standardní odchylka váženého průměru ( $\bar{w}$ ) je dostatečně přesně aproximována standardní odchylkou prostého průměru ( $\bar{u}$ ) vzorku. Proto

4

$$s_{\bar{w}} \approx s_{\bar{u}} = \frac{s(u)}{\sqrt{n}}$$

95% interval spolehlivosti byl vypočítán z

5

$$95\%C.I. = \pm t_{(n-1)} s_{\bar{u}}$$

Nalezení potřebných hodnot  $t$ -rozdělení u někdy velmi vysokých počtů stupňů volnosti ( $n-1$ ) může být obtížné. Při výpočtu 95% intervalu spolehlivosti prostého průměru byl použit standardní statistický software. Protože prostý a vážený průměr se budou pravděpodobně lišit, nebylo možné použít přímo 95% interval spolehlivosti. Tento problém byl překonán vypočtením pološířky (horní mez 95% intervalu spolehlivosti – dolní mez 95% intervalu spolehlivosti)/2 intervalu spolehlivosti a jeho vystředováním okolo váženého průměru.

**Tabulka č. 10.** Výsledky pro *E.coli* podle počátečního testování.

Laboratoř	N	Relativní odchylna váženého průměru v %	Pološířka 95% intervalu spolehlivosti	Dolní mez 95% intervalu spolehlivosti	Horní mez 95% intervalu spolehlivosti	Vyhodnocení
1	85	56,3	14,3	42,0	70,6	vyšší
2	482	-14,3	5,8	-20,1	-8,4	nižší
3	28	-88,4	23,4	-111,8	-65,0	nižší
4	13	19,2	49,2	-30,0	68,3	více vzorků
5	50	-14,0	17,7	-31,7	3,7	více vzorků
6	56	-69,9	11,5	-81,4	-58,4	nižší
7	20	-30,6	29,8	-60,5	-0,8	nižší
8	29	24,0	29,5	-5,5	53,5	bez rozdílu
9,	50	-9,4	18,9	-28,4	9,5	více vzorků
10	25	146,2	30,2	116,0	176,5	vyšší
11	8	20,7	45,1	-24,4	65,8	více vzorků
12	28	-37,9	24,9	-68,8	-13,1	nižší
13	131	-18,9	12,0	-31,0	-6,9	nižší
14	85	58,7	15,9	42,8	74,7	vyšší
15	23	57,1	31,2	25,9	88,3	vyšší
16	53	27,7	18,4	9,2	46,1	vyšší
17	134	63,1	11,9	51,2	75,1	vyšší
18	113	-17,4	12,7	-30,1	-4,7	nižší
19	51	55,8	8,9	47,0	64,7	vyšší
20	46	-41,1	18,4	-59,5	-22,7	nižší
<b>Celkem</b>	<b>1510</b>	<b>2,2</b>	<b>3,9</b>	<b>-1,7</b>	<b>6,1</b>	<b>bez rozdílu</b>

**Tabulka č. 11.** Výsledky z počátečního testování – celkový počet koliformů. V úvahu jsou brány počty až do hodnoty 200 podle metody Tergitol.

Laboratoř	N	Relativní odchylka váženého průměru v %	Pološířka 95% intervalu spolehlivosti	Dolní mez 95% intervalu spolehlivosti	Horní mez 95% intervalu spolehlivosti	Vyhodnocení
1	216	100,9	7,9	93,0	108,8	vyšší
2	590	90,0	6,9	83,0	96,9	vyšší
3	84	21,9	11,9	10,0	33,9	vyšší
4	16	57,2	53,7	3,5	110,9	vyšší
5	44	18,5	19,9	-1,4	38,4	bez rozdílu
6	60	-6,2	14,9	-21,0	8,7	více vzorků
7	66	54,5	25,4	29,1	79,8	vyšší
8	37	41,9	19,3	22,7	81,2	vyšší
9	59	-30,5	11,2	-41,7	-19,3	nižší
10	15	17,4	48,3	-30,6	65,9	více vzorků
11	22	35,5	28,5	7,0	63,9	vyšší
12	45	23,5	21,4	2,1	44,9	vyšší
13	153	28,7	9,2	19,6	37,9	vyšší
14	133	79,8	10,2	69,7	90,0	vyšší
15	27	124,1	22,0	102,1	146,0	vyšší
16	47	101,3	18,7	82,6	119,9	vyšší
17	199	32,4	9,2	23,2	41,5	vyšší
18	126	40,7	9,9	30,9	50,6	vyšší
19	472	32,3	4,2	28,1	36,6	vyšší
20	50	1,4	18,1	-16,7	19,5	více vzorků
<b>Celkem</b>	<b>2461</b>	<b>52,0</b>	<b>2,8</b>	<b>49,2</b>	<b>54,8</b>	<b>vyšší</b>

#### Druhá fáze

Ve druhé fázi testování zjišťovalo pět laboratoří ve vzorcích pouze bakterii *E.coli* a všechny izoláty byly potvrzovány. Výsledky těchto rozborů jsou uvedeny v tabulce č. 12.

**Tabulka č. 12.** Výsledky studií *E.coli* během druhé fáze.

Laboratoř	Tergitol EC suspektní	Tergitol EC potvrzený	Colilert suspektní	Colilert potvrzený	Konfirmační stupeň Colilert	Konfirmační stupeň TTC
2	384	327	475	472	99 %	85 %
5	805	596	593	580	98 %	74 %
12	521	448	515	502	97 %	86 %
14	516	450	512	496	97 %	87 %
17	221	187	518	451	87 %	85 %
Celkem	2447	2008	2613	2501	96 %	82 %

Ačkoliv v laboratoři číslo 17 bylo zjištěno, že konfirmační stupeň u metody Colilert byl pouze 87 %, bylo to v důsledku neobvykle vysokého podílu bakterie *E.coli* (jak bylo potvrzeno dalšími fenotypovými testy), které nejsou schopny růst při 44°C. Tudíž zatímco metoda Colilert přesně určila tyto organismy jako *E.coli*, konfirmační postupy používané referenční metodou je nesprávně klasifikovaly jako bakterie odlišné od *E.coli*.

Výsledky jsou uvedeny ve formě tabulky založené na potvrzených počtech (tabulka č. 13). Relativní odchylka v procentech je vážený průměr relativních odchylek. Průměrnou relativní odchylku lze získat vypočtením této hodnoty z průměrné hodnoty (nebo součtů) potvrzených počtů v posloupnosti vzorků. Tuto veličinu lze označit za vážený průměr.

Pološířka 95% intervalu spolehlivosti je založena na hodnotách prosté relativní odchylky v procentech. Po odečtení od průměrné relativní odchylky v procentech udává pološířka 95% intervalu spolehlivosti dolní mez 95% intervalu spolehlivosti. 95% interval spolehlivosti je založen na standardní odchylce a počtu vzorků. Řešení tudíž spočívá v tom, že 95% interval spolehlivosti průměrné hodnoty je založen na prostých počtech, ale odhad je vystředován okolo váženého průměru relativní odchylky. Je tudíž nezbytné vypočítat pološířku 95% intervalu spolehlivosti.

Odhad standardní odchylky (SD) váženého průměru nelze vypočítat, zatímco standardní odchylku prostého průměru lze získat standardními statistickými postupy z posloupnosti jednotlivých hodnot relativní odchylky.

Vyhodnocení významnosti této odchylky je založeno na principech rozpracovaných v ISO.

**Tabulka č. 13.** Relativní odchylky v procentech (RD %) a 95% intervaly spolehlivosti pro *E.coli*. Kompletní data včetně nulových počtů. Rozbory byly provedeny jednotlivě pro každý soubor dat a hromadě (Celkem) s a bez (Mezisoučet) výsledků z laboratoře č. 19, které byly získány během počátečního testování.

Datový soubor	N	RD %	Pološířka 95% intervalu spolehlivosti	Dolní mez 95% intervalu spolehlivosti	Vyhodnocení
2	75	36,1	22,2	13,9	Colilert vyšší
5	49	-2,7	10,9	-13,6	Více vzorků
12	60	11,4	17,0	-5,6	Bez rozdílu
14	30	9,7	16,6	-6,9	Bez rozdílu
17	45	82,8	20,5	62,3	Colilert vyšší
<b>Mezisoučet</b>	<b>259</b>	<b>21,8</b>	<b>9,5</b>	<b>12,3</b>	<b>Colilert vyšší</b>
19	545	10,1	9,5	0,6	Colilert vyšší
<b>Celkem</b>	<b>804</b>	<b>16,8</b>	<b>7,2</b>	<b>9,6</b>	<b>Colilert vyšší</b>

#### Jak se lišily konfirmační koeficienty (neboli podíl skutečně pozitivních výsledků) mezi laboratořemi?

Konfirmační koeficienty byly u metody Colilert obecně vyšší než u referenční metody jak u koliformů, tak u *E.coli* a tento rozdíl byl v mnoha případech statisticky významný ( $p < 0,05$ ). To znamená, že suspektní data získaná pomocí metody Colilert byla přesnější než data získaná pomocí metody referenční. V mnoha případech mohla být ostatně suspektní data podle metody Colilert použita vlastně jako data potvrzená. Některé laboratoře vykazovaly nízké konfirmační koeficienty u koliformů při použití metody Colilert, zdá se však, že tomu tak bylo převážně díky přítomnosti koliformů, které nezkvašují laktózu.

Jde o důležitý rozdíl, protože to znamená, že data získaná během 24 hodin od převzetí vzorku lze použít jako podklad pro rozhodnutí v otázkách hygieny nebo v otázkách provozních. U *E.coli* byl během počátečního testování pomocí metody Colilert konfirmační koeficient vyšší než u metody referenční ve všech laboratořích až na dvě z nich. Ve druhé fázi studie byly jak potvrzené, tak suspektní výsledky metody Colilert ekvivalentní nebo vyšší než potvrzené výsledky podle metody referenční, což prokazuje, že používání „suspektních“ výsledků metody Colilert je při rozboru pitné vody přípustné. Jedna laboratoř měla poměrně nízký podíl potvrzených výsledků u *E.coli*. Bylo zjištěno, že jde o důsledek přítomnosti neobvykle vysokého podílu bakterie *E.coli*, která nebyla termotolerantní.

## **Jsou problémy s používáním konfirmačních koeficientů při určování potvrzených počtů?**

Konfirmační koeficienty (neboli podíl skutečně pozitivních výsledků) založené na náhodných izolátech byly použity s cílem určit potvrzené počty koliformů a *E.coli* kvůli obrovskému množství práce, která by byla nutná k potvrzení všech izolátů. Velkým problémem tohoto přístupu, který nebyl předvídan, bylo to, že jakýkoliv vzorek, který obsahoval suspektní organismy, dával nějakou hodnotu potvrzeného počtu. Pokud by vzorek v laboratoři obsahoval například 1 cfu/100 ml a konfirmační koeficient by byl 0,6, potom by „potvrzený“ počet byl vyčíslen na 0,6 cfu/100 ml. To zjevně nemůže být správně, protože skutečná hodnota musí být buď 0, nebo 1. Metoda, která je méně selektivní, by tudíž obecně dávala vyšší hodnoty.

Tato situace je dále komplikována přítomností termotolerantních koliformů. Ve vzorku, který by obsahoval 10 cfu/100 ml termotolerantních koliformů, avšak žádné bakterie *E.coli*, by referenční metoda napočítala 10 kolonií jako suspektní počet a metoda Colilert by nenapočítala žádné suspektní kolonie *E.coli*. Použití konfirmačních koeficientů na tato data (například za použití průměrných hodnot vypočtených pro všechny účastníky testování pro metodu Colilert ve výši 0,88, a pro referenční metodu 0,55) by u metody Colilert dávalo nulové „potvrzené výsledky“ a u referenční metody 5,5 cfu/100 ml. Ačkoliv by tedy výsledky metody Colilert byly správné, byla by referenční metoda zdánlivě významně lepší. Ačkoliv jsou tedy falešné negativní výsledky brány v úvahu, je za použití tohoto přístupu v podstatě daleko obtížnější zjistit falešné pozitivní výsledky.

Matematické problémy, jako je například ztráta normálnosti rozdělení a nerealistické průměrné hodnoty, způsobené používáním celkových konfirmačních koeficientů lze zmírnit pouze vynecháním všech vzorků, kde se objevují nulové výsledky.

## **Jak dobré jsou konfirmační koeficienty?**

Rozbor dat používaných pro získání konfirmačních koeficientů ukazuje, že s daty byla spojená vysoká míra neurčitosti, a prošetření dat z laboratoře č. 19, kde byly potvrzeny všechny izoláty, prokázalo, že konfirmační koeficienty se u referenční metody měnily od nuly do jedničky. Proto přes velké množství shromážděných dat způsobuje tato míra neurčitosti spojená s konfirmačním koeficientem to, že je velmi obtížné interpretovat data udávající „potvrzené“ počty u *E.coli*. Pro tuto neurčitost a pro velké výkyvy mezi jednotlivými laboratořemi existuje mnoho možných důvodů. Mezi nimi jsou rozdíly ve zkušenostech laboratoří a jednotlivých zaměstnanců v rámci laboratoře, rozdíly v typech vzorků a organismů ve vzorcích, subjektivita odečítání tergitolových membrán a výběru kolonií na MacConkeyho destičkách získaných při množení kultur vzniklých u metody Colilert. Tyto rozdíly není možné kvantifikovat, ale je pravděpodobné, že přispěly k vysokému stupni neurčitosti. Takovéto rozdíly je možné odstranit pouze potvrzením všech kolonií a používáním stejného personálu k provádění práce v každé laboratoři.

## **Jaká jsou data získaná pomocí konfirmačních koeficientů v porovnání s daty získanými pomocí skutečně potvrzených počtů?**

V laboratoři č. 19 bylo pro *E.coli* shromážděno 676 datových souborů, u nichž byly potvrzeny všechny kolonie. 239 z těchto vzorků obsahovalo v referenčním médiu suspektní kolonie *E.coli*, které nebyly následně potvrzeny. Potvrzením všech kolonií bylo tudíž prokázáno, že 239 vzorků dalo falešné pozitivní suspektní počty. Kdyby byl použit

postup využívající konfirmační koeficienty, potom by všechny tyto vzorky měly pozitivní hodnotu. Důsledky tohoto kroku by byly závažné. V laboratoři č. 19 bylo zjištěno, že metoda Colilert je významně lepší než metoda referenční jak u koliformů, tak u *E.coli*; pokud by byl používán koncept konfirmačního koeficientu, potom by se zdálo, že u *E.coli* je referenční metoda významně lepší než Colilert, což by bylo chybné.

### Data z druhé fáze

V důsledku obtížnosti interpretace dat z té části počátečního testování, která se zabývala bakterií *E.coli*, v důsledku rozdílů zaznamenaných v datech získaných v laboratoři č. 19 s využitím „podílu skutečně pozitivních výsledků“ a potvrzování všech izolátů se druhé fáze zúčastnilo pět laboratoří, které prováděly srovnání pouze pro bakterii *E.coli* a potvrzovaly všechny izoláty. Tato data prokázala, že ve dvou laboratořích byla metoda Colilert významně lepší než referenční metoda ISO, ve dvou laboratořích mezi nimi nebyl významný rozdíl a v jedné laboratoři nebyla data dostačující k vyvození závěrů. Ve všech laboratořích však měla metoda Colilert významně vyšší konfirmační stupeň a, když byla zkombinována všechna data, zachytila metoda Colilert celkově významně víc výskytů *E.coli* než metoda referenční.

Hlavním problémem, se kterým jsme se setkali při pokusu o srovnání těchto dvou metod, jsou definice používané pro koliformy a *E.coli*. V této studii zní definice koliformů pro účely referenční metody ISO tak, že tyto organismy by měly být schopné zkvasit laktózu. Colilert neobsahuje laktózu, ale zjišťuje koliformy na základě jejich schopnosti štěpit ONPG pomocí enzymu  $\beta$ -D-galaktosidázy. Podobně Colilert zjišťuje *E.coli* na základě přítomnosti enzymu  $\beta$ -D-glukuronidázy, zatímco metoda referenční je založena na schopnosti bakterie *E.coli* růst při 44°C, zkvašovat laktózu a vytvářet z tryptofanu indol. Tyto dvě metody budou tudíž nepochybně odlišné.

Obě metody zachytí mnoho organismů, ale pouze jedna nebo druhá z nich zjistí určitou jejich podmnožinu. Například glucuronidázně negativní bakterie *E.coli* nebude zjištěna metodou Colilert, ale může být zjištěna metodou referenční. Laktózně negativní bakterie *E.coli* však nebude zjištěna referenční metodou, ale může být zjištěna metodou Colilert. V této studii byla při potvrzování používána ta kritéria, která jsou obsažena v metodě referenční, což má za následek zaznamenání jistého podílu z koliformů a *E.coli* zjištěných metodou Colilert jakožto „falešně pozitivních“ navzdory skutečnosti, že šlo skutečně o cílové organismy.

Z těchto dvou oddělených fází práce je zřejmé, že klíčem k úspěšnému porovnání metod není nezbytně absolutní počet testovaných vzorků, ale potvrzování všech izolátů. Používání tohoto přístupu umožňuje přesné vyhodnocení citlivosti a specifity obou metod.

## Závěry

Z této studie lze vyvodit několik důležitých závěrů:

1. Abychom získali statisticky významná data, není při porovnávání dvou metod nezbytné testovat obrovský počet vzorků, ale je třeba potvrdit tolik izolátů, kolik je možné. Upřednostňovanou možností je potvrzování všech suspektních pozitivních organismů.
2. Není vůbec potřeba využívat velkého počtu laboratoří pro mezilaboratorní studie. Ve druhé fázi testování byla získána statisticky významná data s využitím pěti laboratoří.
3. Nedoporučujeme však ověřování v jediné laboratoři, protože mezi výsledky z různých laboratoří jsou často významné rozdíly. To může být důsledkem rozdílů v typu vzorků nebo nějakými jinými rozdíly v rámci laboratoře.
4. Navrhujeme, aby budoucí srovnávací studie používaly pět laboratoří v různých geografických místech. Projekt těchto studií by měl zahrnovat množství typů vody (např. chlorovanou a nechlorovanou) a všechny izoláty by měly být potvrzovány. Toto doporučení bude začleněno do dokumentu ISO, který popisuje princip porovnávání metod.
5. Metoda Colilert vykazovala významně vyšší záchytnost jak koliformů, tak *E.coli* než referenční metoda ISO, i když byly při potvrzování použity definice referenčních postupů ISO.
6. Konfirmační stupeň metody Colilert, pokud byly potvrzovány všechny izoláty, byl významně vyšší než u metody referenční a v mnoha případech se blížil 100 %.
7. Konfirmační stupeň závisí na kritériích používaných k definici cílových organismů. V průběhu této studie izolovala metoda Colilert mnoho koliformů, které nebyly „potvrzeny“, protože použitá kritéria obsahovala zkvašování laktózy. Mnoho koliformů není schopno během 48 hodin laktózu zkvasit. Podobně izolovala metoda Colilert některé kmeny *E.coli*, které nebyly následně potvrzeny, protože nebyly schopny růst při 44°C, nezkvašovaly laktózu, nebo nedokázaly z tryptofanu vytvářet indol. Navzdory této skutečnosti byl konfirmační stupeň metody Colilert přesto vyšší.
8. Na základě výsledků této studie lze metodu Colilert doporučit při zjišťování bakterie *E.coli* a koliformů jakožto přinejmenším stejně dobrou, jako je referenční metoda ISO, a tuto metodu lze používat bez nutnosti potvrzování výsledků.

## Literatura

Fricker, E.J., Illingworth, K and Fricker, C.R. (1997). Use of two formulations of Colilert and Quanti-Tray for assessment of the bacteriological quality of water (Používání dvou přípravků Colilert a Quanti-Tray při hodnocení bakteriologické kvality vody). *Water Research* 31,2495-2499.

ISO 1995. Příručka pro vyjadřování nepřesnosti měření. První vydání, opravené a nově vydané v roce 1995. Mezinárodní organizace pro standardizaci, Ženeva

ISO 2000, Kvalita vody – kritéria pro prokázání ekvivalentnosti mezi mikrobiologickými metodami. ISO/TC 147/SC 4/WG 12 N34, ISO WD 1799

## Příloha 1 : Účastníci testování

Laboratoř	Oslovení	Jméno	Adresa	Telefon	Fax	E-Mail
Institute für Umwelt-medizin der Stadt Wien	paní	WALTER, RENATE	Feldgasse 9 A1082 Wien Rakousko	431 40 41 30	431 404 13 79 73	<a href="mailto:Wal@m15.magwien.gv.at">Wal@m15.magwien.gv.at</a>
	paní	SCHIEL, GERTRAUD				<a href="mailto:Sct@M15.magwien.gv.at">Sct@M15.magwien.gv.at</a>
Miljoministeriet Miljostyrelsen	paní	BAGGE, LINDA	Strangade 29 1401 Kobenhavn K Dánsko	45 32 66 01 00	45 32 66 04 79	<a href="mailto:LBA@MST.dk">LBA@MST.dk</a>
Fyn/Trekantomradet I/S Laboratorium	paní	SIMONE, IRENE	Niels Bohrs alle 181 5220 Odense SO	45 63 15 34 00	45 63 15 34 49	<a href="mailto:IS@fyn-trekant.dk">IS@fyn-trekant.dk</a>
AGBAR	pan	RIBAS I SOLER, FERRAN	Passeig de Sant Joan 39-43 8009 Barcelona Španělsko	34 93 342 23 79	34 93 342 26 73	<a href="mailto:Fribas@agbar.es">Fribas@agbar.es</a>
Finnish Environment Institute	paní	LAHTI, KIRSTI	Hakuninmaantie 4-6 PO Box 140 0430 Helsinki Finsko	358 9 4030 0850	358 9 4030 0890	<a href="mailto:Kristi.lahti@vyh.fi">Kristi.lahti@vyh.fi</a>
Environment Centre	paní	KALSO, SEIJA	Helsinginkatu 24 0530 Helsinki Finsko	358 9 7312 2630	358 9 7312 2635	<a href="mailto:Seija.Kalso@ymk.hel.fi">Seija.Kalso@ymk.hel.fi</a>
Anjou Recherche Laboratoire central	paní	DE ROUBIN, MARIE RENEE	Le Dufy 1 place Turenne 94417 St Maurice Cedex Francie	33 1 49 76 52 52	33 1 49 76 52 42	<a href="mailto:Marie-renee.de-roubin@generale-des-eaux.net">Marie-renee.de-roubin@generale-des-eaux.net</a>
ESWE	pan	SCHNEIDER, STEFFEN	Söhnleinstrasse 158 Postfach 55 40 D65054 Wiesbaden Německo	49 6 117 80 43 69	49 6 117 80 43 75	<a href="mailto:Steffen.Schneider@Stadtwerke-Wiesbaden.de">Steffen.Schneider@Stadtwerke-Wiesbaden.de</a>

Laboratoř	Oslovení	Jméno	Adresa	Telefon	Fax	E-Mail
Umwelt Bundes Amt	pan	SCHAEFER, BENEDIKT	Heinrich Heine str12 D8645 Bad Elster Německo	49 37 43 77 6 225	49 37437 76 219	<a href="mailto:Benedikt.Schaefer@uba.de">Benedikt.Schaefer@uba.de</a>
GEW Köln AG	paní	HUBNER, IRIS	Parkgürtel 24 D50823 Köln Německo	49 22 11 78 4135	492,211,782,237	<a href="mailto:l.heubner@gewkoelnag.de">l.heubner@gewkoelnag.de</a>
ZV Landeswasserversorgung Wasserwerk Langenau	paní	FISCHEDER, REGINE	Postfach 1257 D89123 Langenau Německo	49 7345 96 3863	49 7345 96 3890	<a href="mailto:fischeder@lw-online.de">fischeder@lw-online.de</a>
Limerick Regional Hospital Public Health Laboratory	paní	MURPHY, LIZ	Dooradoyle Limerick Irsko	353 61 482845		<a href="mailto:Lamurphy@mwhb.ie">Lamurphy@mwhb.ie</a>
KIWA N.V.	pan	NOBEL, PETER J	Groningenhaven 7 PO Box 1072 3430 BB Nieuwegein Holandsko	31 30 60 69 628	31 30 60 61 165	<a href="mailto:nobel@kiwaoa.nl">nobel@kiwaoa.nl</a>
N.V. PWN Waterleidingbedrijf Noord-Holland	paní	STRATING, SANDRA	J.W. Lucasweg 2 2031BE Haarlem Holandsko	31 23 541 3524	31 23 55 12 481	<a href="mailto:Sandra.Strating@pwn.nl">Sandra.Strating@pwn.nl</a>
RIWM	paní	SCHETS, CISKA	A.Van Leeuwenhoeklaan 9 3721 MA Bilthoven Holandsko	31 30 2743929	31 30 2744434	<a href="mailto:Ciska.Schets@rivm.nl">Ciska.Schets@rivm.nl</a>
Instituto Superior de Sanita Laboratorio de Igiene Ambientale	paní	BONADONNA, LUCIA	Viale Regina Elena 299 0161 Roma Itálie	39 06 4990 23 17	39 06 4938 70 83	<a href="mailto:lucybond@iss.it">lucybond@iss.it</a>

Laboratoř	Oslovení	Jméno	Adresa	Telefon	Fax	E-Mail
The Norwegian School of Veterinary Science Dpt of Pharmacology, Microbiology and Food Hygiene	pan	OSTENSVIK, OYVIN	Ullevålsveien 72/ Thulstrupsgate Building 15 PO Box 8146 N0033 Oslo Norsko	47 22 59 70 44	47 22 96 48 50	<a href="mailto:Oyvin.Ostensvik@veths.no">Oyvin.Ostensvik@veths.no</a>
Instituto Nacional de Saude Lab de Microbiologia de Aguas	paní	FALCAO, LEONOR	Av. Padre Cruz 1699 Lisboa codex Portugalsko	351 21 751 92 84	351 21 759 04 41	<a href="mailto:np05pg@mail.telepac.pt">np05pg@mail.telepac.pt</a>
Livsmedels Verket Dricksvattenheten	pan	SLAPOKAS, TOMMY	Hamnesplanaden 5 Box 622 751 26 Uppsala Švédsko	46 18 17 56 69	46 18 10 58 48	<a href="mailto:tosl@slv.se">tosl@slv.se</a>
Uppsala kommun Entreprenad Vattenlaboratoriet	paní	LINDH, ANNA WIBERG, KERSTIN	Stallängsgatan 3 Box 55 751 03 Uppsala Švédsko	46 18 27 42 35	46 18 71 29 69	<a href="mailto:bodil.petterson@uke.uppsala.se">bodil.petterson@uke.uppsala.se</a>
THAMES WATER	pan	FRICKER, COLIN	Gainsborough House Manor Farm Road Reading Berkshire RG2 0JN Velká Británie	44 1 189 236 318	44 1 734 88 33 29	<a href="mailto:CFricker@compuserve.com">CFricker@compuserve.com</a>
PHLS Nottingham University Hospital	pan	LEE, JOHN	Queens Medical Centre Nottingham NG7 GUH Velká Británie	44 1 159 709 163	44 1 159 422 190	<a href="mailto:john@leegion.freeseve.co.uk">john@leegion.freeseve.co.uk</a>

## Příloha 2

PŘEDBĚŽNÁ VERZE SROVNÁVACÍHO PROTOKOLU REFERENČNÍ METODY  
EVROPSKÉ UNIE PRO KOLIFORMY A *E.COLI* S METODAMI ZALOŽENÝMI NA  
ALTERNATIVNÍCH KULTURÁCH

říjen 1999

## Úvod

Evropská směrnice pro pitnou vodu (1998) určuje referenční metodu pro odhad koncentrace koliformů a *E.coli* v pitné vodě. Ačkoliv není pro členské státy povinné, aby používaly tuto metodu, je zde povinnost prokázat, že jakákoliv alternativní metoda, která má být používána, má podobnou výtěžnost. Přesná podstata této podobnosti není určena, stejně jako není určena metodologie, která má být použita při porovnávání těchto metod. Obecně se však uznává, že alternativní metody by měly mít výtěžnost, která by byla ekvivalentní nebo vyšší. V této souvislosti je třeba určit význam výrazu „ekvivalentní nebo vyšší“. Metoda je obvykle považována za „ekvivalentní“, pokud není záchytnost cílových organismů výrazně nižší než u metody referenční. Výraz „výrazně nižší“ však také vyžaduje definici a pro účely porovnání, jako je toto, je vhodné definovat jej jako celkově nikoliv výrazně nižší než 10 % referenční metody.

Kromě testování záchytnosti organismů při použití těchto dvou testovaných metod je zásadní, aby byl určen počet falešně pozitivních výsledků. Toho lze docílit odhadnutím podílu skutečně pozitivních výsledků těchto metod. Protože referenční metoda Evropské unie nevyžaduje, aby byly kolonie „potvrzovány“ (s výjimkou zjišťování, zda dochází k produkci cytochromové oxidázy), měly by být započítány všechny kolonie, které splňují kritéria popsané v této metodě. Aby byl zjištěn podíl skutečně pozitivních výsledků, měly by být všechny kolonie potvrzeny pomocí vhodné metodologie. To však není možné uskutečnit v rámci studie tohoto rozsahu a proto je třeba použít kompromisní řešení. V tomto případě je rozumné, aby každá laboratoř „potvrdila“ identitu jednoho sta kolonií, které budou náhodně vybrány z celé řady typů vody. Jakékoliv pozitivní výsledky, které nelze identifikovat pomocí tradičních metodologií, by měly být poslány do jediné referenční laboratoře (v tomto případě jde o společnost Thames Water) za účelem přesné

identifikace. Kromě těchto 100 kolonií identifikovaných referenční metodou Evropské unie by mělo být u metody Colilert prošetřeno 200 pozitivních testovacích prohlubní (100 pouze žlutých a 100 žlutých a fluorescentních). To lze provést pomocí níže uvedeného protokolu. Navíc by každá laboratoř měla vybrat dvě membrány o teplotě 37°C s 10-20 koloniemi vykazujícími štěpení laktózy a tyto všechny sebrat, naočkovat je na živné agarové médium a odeslat je do společnosti Colin Fricker. To umožní získání dodatečných informací o podílu skutečně pozitivních výsledků.

Kvůli nedostatku selektivity u tergitolové metody existuje obava, že ve vysoce znečištěné vodě může na membránách naočkovaných při 37°C růst ostatních organismů převýšit růst *E.coli*. Z tohoto důvodu navrhuje, aby byla naočkována dodatečná membrána při 44°C, což by pomohlo potlačit ostatní flóru a zlepšilo zachytnost *E.coli*. Ačkoliv toto dosud není zahrnuto jako součást referenční metody, může tomu tak být. V každém případě je naočkování při 44°C a potvrzení těchto kolonií upřednostňováno před snahou o identifikaci všech kolonií rostoucích na membránách při 37°C.

### **Testy, které mají provést jednotlivé laboratoře**

Každá laboratoř nebo skupina laboratoří provede celkem nejméně 200 testů. Tyto testy budou rozděleny do dvou fází. V první fázi bude vybráno nejméně pět a nejvýše deset míst, která dodají 10-50 kolonií koliformů na 100 ml. Celkem by mělo být prozkoumáno 150 vzorků z tohoto typu zdroje a vzorky by měly být mezi těmito různými místy rozděleny rovnoměrně. Typ vzorku vody by měl být zvolen podle toho typu vzorku, který je v jednotlivých laboratořích zkoumán normálně. Například u laboratoří, jejichž obvyklé vzorky pocházejí z čističek povrchové vody, která je ošetřena desinfekcí, by potom k přípravě vzorků podle níže uvedeného protokolu měla být použita odpadní voda desinfikovaná chlorem. Laboratoře, které zkoumají vzorky vody, jež nebyly ošetřeny

desinfekcí, by měly v této fázi studie používat znečištěnou podzemní vodu (buď v přírodním stavu nebo naočkovanou povrchovou nebo odpadní vodou) nebo povrchovou vodu dobré kvality.

Výsledky by měly být vykazovány na formulářích uvedených v tomto dokumentu. Místo odběru, typ vzorku, datum rozboru a výsledky by měly být předloženy tak, jak je uvedeno na příkladu. Zaznamenejte také růst „organismů v pozadí“ jako <10 %, 10-50 % >50 % nebo 100 % pokrytí.

Ve druhé fázi studie by měly být vzorky zvoleny tak, aby dávaly výsledek v rozsahu 1-10 koliformů na 100 ml. Vykazovány by měly být všechny výsledky, i ty, kde byl výsledek nulový. Mělo by být vykázáno nejméně 30 vzorků, kde byl zachycen přinejmenším jeden organismus a to jednou či druhou metodou, nebo oběma zároveň. Při vykazování výsledků by nemělo docházet k pokusům o opravu výsledků na základě zjištění konfirmačních testů a pro všechny parametry by měly být uvedeny „suspektní“ počty. Při rozboru výsledků budou brány v úvahu skutečné výsledky získané prozkoumáním 100 organismů vybraných tak, jak bylo popsáno výše.

### **Vzorky**

Vzorky by měly být odebírány do lahví o objemu ne menším než 500 ml. V každém z těchto tří testů, tj. u metody Colilert, membránové filtrace zjišťující přítomnost koliformů a membránové filtrace zjišťující přítomnost fekálních koliformů, by mělo být použito alikvotní množství (100 ml). Každé alikvotní množství **musí** být odebráno ze stejné lahve. Za žádných okolností nesmí být dílčí vzorky odebrány z různých lahví. Vzorky musí být náležitě promíchány opakovaným přetočením vzorkovací lahve.

### **Příprava vzorku a desinfekce odpadní vody**

Desinfikovaná odpadní voda byla s dobrým výsledkem použita v několika studiích při určování účinnosti různých metod při zjišťování koliformů a *E.coli*. Tento protokol používá odpadní vodu „dobré kvality“, tj. takovou, v níž je méně než 30 mg pevných suspenzních částic na litr.

Metoda získávání vzorků z odpadních vod je následující:

### **Den č. 1**

1. Naplňte desetilitrový kontejner vodou z kohoutku, ohřejte ji na teplotu 37°C po dobu dvou hodin a potom ji přes noc ponechte při teplotě 4°C.

### **Den č. 2**

2. Zvolte odpadní vodu dobré kvality (jeden litr) a nechte ji 2 hodiny odstát, aby se mohly usadit velké částičky.
3. Opatrně odlijte 500 ml odpadní vody do čistého kontejneru.
4. Přidejte těchto 500 ml k vodě z kohoutku odpadní vody, promíchejte ji protřesením a umístěte ji na magnetické míchadlo.
5. Připravte chlorový roztok pomocí tabletek vytvářejících chlor (Instachlor, Palintest), které obsahují celkem 10-15 mg chloru.
6. Přidejte tento chlorový roztok ke zředěné odpadní vodě.
7. Počkejte 5 minut, aby mohlo proběhnout smísení.
8. Nabírejte v minutových intervalech (tj. 5-14 minut kontaktního času) jednolitrové vzorky této chlorované odpadní vody do sterilních lahví obsahujících 5 ml 18% roztoku sirnatanu sodného a důkladně je promíchejte.
9. Otestujte 100 ml chlorované odpadní vody získané v jednotlivých časech pomocí metody Colilert 18 a metody Colilert 2000 Quanti-Trays.
10. Všechny chlorované vzorky uskladněte přes noc při teplotě 4°C.

### **Den č. 3**

11. Odečtěte Quanti-Trays a výsledky zaznamenejte.

12. Vyberte vzorky, které dávají 15-70 koliformů na 100 ml. Ty lze přímo použít k porovnání těchto metod a duplicitní vzorky lze analyzovat.
13. Vyberte vzorky, které dávají 150-700 koliformů na 100 ml.
14. Ty lze naředit odchlorovanou vodou v poměru 1:10 tak, aby daly jeden litr vzorku. Vodu z kohoutku lze odchlorovat přidáním 5 ml 18% siriatanu sodného k 900 ml vody. Z každého vzorku, který dává 150-700 koliformů, lze připravit pět repličitních jednolitrových vzorků. Každý z těchto vzorků lze použít k porovnání těchto metod a vzorky z každé lahve lze analyzovat duplicitně.
15. Proveďte rozbor vzorků pomocí referenční metody Evropské unie, kdy mají být vzorky inkubovány za účelem zjištění celkového počtu koliformů a počtu fekálních koliformů (tj. inkubujte jednu membránu při 37°C a 44°C), a pomocí metody Colilert 18.
16. Inkubujte vzorky za příslušné teploty po odpovídající dobu.
17. Po inkubaci vzorky prohlédněte a zaznamenejte do výsledkové tabulky počet u každého vzorku.
18. V této fázi lze vybrat organismy, u kterých bude určen „podíl skutečně pozitivních výsledků“ u každé metody podle níže uvedeného protokolu.

Membrány inkubované při 44°C jsou v testu zahrnuty, aby bylo zjištěno, zda médium tergitol-TTC dává při této teplotě lepší záchytnost fekálních koliformů, jak bylo navrhováno. Směrnice EU vyžaduje, aby laboratoře hledaly *E.coli*, a tudíž je možná lepší inkubovat membrány při 44°C než je inkubovat při 37°C, pokud je vyhledáván tento organismus.

#### **Protokol pro určení „podílu skutečně pozitivních výsledků“**

Aby byl určen „podíl skutečně pozitivních výsledků“, bude v každém testu vybráno 100 organismů. U metod, které produkují kolonie, musí být kolonie vybrány náhodně z mnoha

míst. **Výběr kolonie náhodným způsobem je zásadní. Tato procedura by měla pokrývat celé spektrum morfologií kolonií, které jsou považovány za koliformy. Nevybírejte tedy pouze ty kolonie, které jsou „klasické“, tj. žluté, ale také kolonie, které jsou „oranžové“, protože ty je také třeba započítat jako koliformy. Navíc nevybírejte pouze dobře oddělené kolonie, protože to by mohlo způsobit systematickou chybu.** U metody Colilert začněte v levém spodním rohu, pohybujte se zleva doprava a vyberte první pozitivní (žlutou nebo žlutou a fluorescentní) testovací prohlubeň za účelem potvrzení. Bylo by výhodnější vzít z každého pozitivního plátu jednu žlutou a jednu žlutou a fluorescentní testovací prohlubeň. Tato metoda zajistí, že při výběru testovacích prohlubní není vůbec brán v úvahu stupeň žlutého zbarvení.

## **1. Kolonie z membrán**

- i. Zvolte tu kolonii, která je nejbližší ke středu destičky, a rozetřete ji na živném agaru nebo podobném médiu, které neobsahuje uhlohydráty; inkubujte přes noc při teplotě 37°C.
- ii. Po inkubaci naočkejte jedinou kolonii do dvou zkumavek obsahujících laktóza-peptonovou vodu (nebo podobné médium určené pro zjišťování schopnosti zkvašovat laktózu) a inkubujte jednu z nich při teplotě 37°C po dobu 48 hodin a druhou při teplotě 44°C po dobu 24 hodin. Naočkejte také zkumavku tryptonové vody nebo tryptofanové živné půdy a inkubujte ji při teplotě 44°C po dobu 24 hodin. Výsledky zaznamenejte. U membrán určených ke zjišťování fekálních koliformů naočkejte jedinou kolonii do laktóza-peptonové vody a tryptonové vody a inkubujte je při teplotě 44°C po dobu 24 hodin. U tryptonové vody zjistěte případné vytváření indolu pomocí Kovacsova činidla a výsledek zaznamenejte. Zaznamenejte výsledek z laktóza-peptonové vody.
- iii. U živné agarové destičky zjistěte u vzniklých organismů případné vytváření cytochromní oxidázy a výsledek zaznamenejte.

## **2. U vzorků podle metody Colilert**

- i. Vyberte jako vhodné ty testovací prohlubně, které vykazují žlutou barvu nebo žlutou barvu plus fluorescenci, pomocí postupu popsaného výše.
- ii. Propíchněte zadní stěnu testovací prohlubně sterilní podkožní jehlou nebo hrotem sterilní pipety a odsajte malé množství (přibližně 10  $\mu$ l ) kapaliny.
- iii. Naočkujte tuto kapalinu na MacConkeyho agarovou destičku a rozetřete ji, abyste získali jednotlivé kolonie. Přes noc inkubujte destičky naočkované materiálem z fluorescentních testovacích prohlubní při teplotě 44°C a destičky naočkované materiálem z těch testovacích prohlubní, které jsou pouze žluté, při teplotě 37°C.
- iv. Vyberte dobře oddělenou kolonii zkvašující laktózu. Izoláty z fluorescentních testovacích prohlubní by měly být naočkovány do laktóza-peptonové vody a tryptonové vody a měly by být inkubovány při teplotě 44°C, jak bylo popsáno výše. Izoláty z těch testovacích prohlubní, které byly pouze žluté, by měly být naočkovány do laktóza-peptonové vody a inkubovány při teplotě 37°C po dobu 48 hodin a na destičku s živným agarem za účelem zjištění cytochromní oxidázy.
- v. Výsledky by měly být zaznamenány v příslušné tabulce.

Kromě těchto rozborů vyberte dvě membrány, které byly inkubovány při teplotě 37°C a které vykazují 10-20 suspektních koliformních kolonií. Každou z těchto kolonií naočkujte na agarové médium nebo destičku a pošlete do společnosti Colin Fricker za účelem otestování. Tyto dodatečné kolonie mají zjistit, zda při výběru kolonií z membrán v účastnické laboratoři byla přítomna nějaká systematická chyba.

### **Zajištění kvality**

Je zásadní, aby ve všech laboratořích, které se na této studii podílejí, byly zavedeny vhodné systémy pro kontrolování kvality. Níže jsou uvedeny některé konkrétní body týkající se kontrolování kvality v souvislosti s používáním referenčního média Evropské

unie. Bylo by také přínosné, pokud by laboratoře mohly poskytnout výsledky z externího systému na zajišťování kvality.

### **Inkubátory**

Všechny inkubátory, které mají být použity pro tuto studii, musí být každodenně monitorovány, aby bylo zajištěno dodržování cílové teploty. Požadovaná teplota je cílová teplota  $\pm 1$  stupeň Celsia, nebo taková teplota, jak ji určuje konkrétní metoda (tj. leták u balíčku Colilert a referenční metoda Evropské unie).

### **Média**

Živná média by měla být získána a uskladněna v souladu s pokyny výrobců. Co se týče referenčního média Evropské unie, měla by být všechna média použita během sedmi pracovních dnů od jejich přípravy.

Uvádíme postup kontrolující kvalitu, který je založený na postupu používaném v Pasteurově ústavu v Lille. Ten je třeba dodržovat u každé dávky selektivního média, která je získána.

## Protokol pro kontrolování kvality média

### **I / Oblast použití**

Tento protokol popisuje postup na kontrolu kvality, který je třeba dodržovat při výrobě každé dávky média používaného v mikrobiologické laboratoři.

Zkoumány jsou citlivost, pH, selektivita a výtěžnost. (Výtěžnost pozitivního kmene v porovnání s referenčním médiem a neselektivním médiem, selekční charakteristiky pozitivního kmene u konfirmačního média.)

### **II / Definice**

2.1/ Dávka : dávka je skupina kontejnerů, zkumavek, nebo lahvíček obsahujících médium, které pochází z téhož výrobního místa, jinými slovy v případě média připraveného automatickým přípravovacím zařízením jde o „sérii“.

2.2/ Sterilita : nepřítomnost jakékoliv kultury při teplotě a po době, které jsou u studovaného média obvykle používány.

### **III/ Kontrola**

#### 3.1/ Suspektní média

##### *3.1.1/ Obecný princip*

Vezměte :

- 1 % vyprodukovaného množství (v různých fázích výroby, nejméně však ve 3) za účelem zkontrolování pH,
- 1 % vyprodukovaného množství (v různých fázích výroby, nejméně však ve 3) za účelem zkontrolování sterility,
- 1 % vyprodukovaného množství (v různých fázích výroby, nejméně však ve 3) za účelem zkontrolování výtěžnosti pozitivního kontrolního organismu,
- 2 vzorky za účelem zjišťování negativního kontrolního organismu (na počátku a na konci výroby),

takže celkem 3 % vyprodukovaného množství a 2 vzorky.

Za účelem kontroly pH se používá pH-metr. Je třeba vypočítat průměrnou hodnotu měření. Hodnota pH by měla ležet uvnitř mezí určených výrobcem. Pokud tomu tak není, potom je toto médium třeba vyřadit.

Negativní kontrolní organismus (kmen bakterie *Aeromonas*) nesmí růst na obou destičkách, nebo nesmí být podobný cílovým kmenům identifikovaným na tomto médiu.

Za účelem ověření výtěžnosti daného média by měl být referenční kmen prozkoumán na „referenčním médiu“ a na živném agaru. Záchytnost referenčního média by měla být

mezi 55 a 120 % záchytnosti zjištěné u živného agaru. Pro tento účel budou dodány lentikuly. Ty by měly být hydratovány v 500 ml sterilní destilované vody. Potom se pomocí čtyř membránových filtrů zkoncentruje 100 ml tohoto materiálu, dva membránové filtry jsou inkubovány na živném agaru (jeden při teplotě 37°C a druhý při teplotě 44°C) a dva na referenčním médiu (jeden při teplotě 37°C a druhý při teplotě 44°C). Po inkubaci jsou spočítány kolonie a výsledky jsou zaznamenány.

Pokud výsledky neprokazují, že toto médium má ekvivalentní výtěžnost, měl by proběhnout druhý soubor kontrolních měření. Pokud tato měření nedávají přijatelné výsledky, potom by tato dávka média měla být vyřazena.

### 3.2/ Konfirmační média

#### 3.2.1/ Obecný princip

Vezměte :

- 1 % vyprodukovaného množství (v různých fázích výroby, nejméně však ve 3) za účelem zkontrolování pH,
  - 1 % vyprodukovaného množství (v různých fázích výroby, nejméně však ve 3) za účelem zkontrolování sterility,
  - 1 % vyprodukovaného množství (v různých fázích výroby, nejméně však ve 3) za účelem zkontrolování výtěžnosti pozitivního kontrolního organismu
- takže celkem 3 % vyprodukovaného množství

To se týká tryptonové vody a laktóza-peptonové vody.

Za účelem kontroly pH se používá pH-metr. Výsledky musí ležet uvnitř rozmezí určeného výrobcem média.

Sterilita je kontrolována pomocí destiček nebo zkumavek inkubovaných při určené teplotě a po určenou dobu, které jsou u tohoto média obvykle používány. Jediným přípustným výsledkem je nulový růst u všech vzorků.

Každé médium je inkubováno po naočkování kmenem *E.coli* a kmenem *Aeromonas spp.* Aby byla zajištěna správná výtěžnost, měl by tento kmen *E.coli* zkvašovat laktózu jak při 37, tak při 44°C a při teplotě 44°C by měl z tryptofanu vytvářet indol. Kmen bakterie *Aeromonas* by měl při všech testech dávat negativní výsledky.

Výsledky jsou vykazovány v souboru výsledků. Pokud výsledky nesplňují pevně dané požadavky na kvalitu, je provedena nová kontrola. Pokud druhá kontrola dává stejné výsledky, je tato dávka vyřazena a je připravena nová dávka.

## **Dodatek**

Ve druhé fázi této zkoušky byl dodržován stejný základní protokol, ale u metody Colilert byly všechny testovací prohlubně, které vykazovaly fluorescenci, a všechny kolonie zkvašující laktózu při teplotě 44°C potvrzovány pomocí konfirmačních postupů podrobně uvedených v referenční metodě ISO.



Datová tabulka – podíl skutečně pozitivních výsledků												
Laboratoř					Rozbor provedl:				L/P H2O = laktóza-peptonová voda			
									Tryp. H2O = tryptonová voda			
Uvedte + u pozitivní reakce				Colilert-18				Metoda TTC				
a - tam, kde reakce nenastala.					Žlutá prohlubeň	Žlutá / fluor. prohlubeň			Koliformy		Fekální koliformy	
Datum	Druh vzorku			Výsledky CO	L/P H2O	L/P H2O	Tryp. H2O	Výsledky CO	L/P H2O - 37C	L/P H2O - 44C	L/P H2O - 44C	Kovacs
