POROVNÁNÍ METOD STANOVENÍ INDIKÁTORVÝCH ORGANISMŮ V ČISTÍRENSKÝCH KALECH

lmateju@szu.cz

Státní zdravotní ústav
Šrobárova 47, Praha 10

Indikátorové organismy

V členských zemích Evropského společenství vychází hodnocení mikrobiologické kontaminace čistírenských kalů pro využití v zemědělství z obecných požadavků směrnice

Rady č. 86/278/EEC pro kaly

kvalitativní parametry čistírenských

kalů musí být určeny jednotlivými

členskými zeměmi s tím, že musí

postihovat snížení obsahu

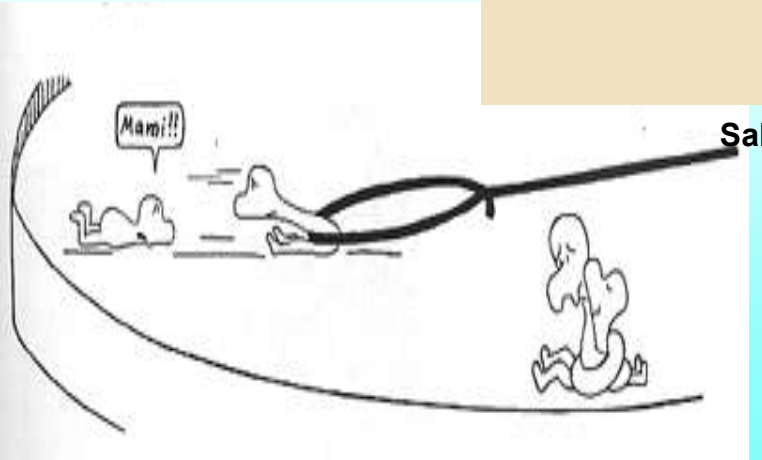
patogenních organismů a

mikroorganismů na únosnou mez.

Země	*Salmonella*	Ostatní kontaminace
Francie 44-041	8 MPN na 10 g sušiny	enteroviry: 3 MPCN na 10 g sušiny vajíčka helminthů: 3 na 10 g sušiny
Itálie	1000 MPN na 1 g sušiny	
Dánsko SO/2000/49	negativní nález	fekální streptokoky < 100 na 1 g
Lucembursko		enterobakterie: 100 KTJ na 1 g negativní nález pro vajíčka helmintů
Polsko	negativní nález	vajíčka parazitů 10 na 1kg sušiny (dle použití)
Norsko	negativní nález	negativní nález pro vajíčka helmintů, obsah fekálních koliformních zárodků nižší než 2,5. 10^3 KTJ na 1gram sušiny
Slovenská republika		term. koliform. bakterie < 10^6 na 1g sušiny enterokoky < 10^6 na 1g sušiny
Česká republika	negativní nález v 50g	term. koliform. bakterie < 10^3 na 1g sušiny enterokoky < 10^3 na 1g sušiny
Rakousko DolníRakousy, Salcbursko a Burgeland	negativní nález	enterobakterie < 1000 na 1g sušiny negativní nález pro vajíčka parazitů

Porovnávané metody

Salmonella	**Stanovení salmonel v kalech a bioodpadech (AHEM, ČR) CZ1**
Salmonella	**Soils, sludges and treated bio-wastes — Detection and enumeration of Salmonella spp. – Part 1 : Membrane filtration method for quantitative resuscitation of sub-lethally stressed bacteria (to confirm efficacy of log reduction treatment procedures)**
Salmonella	**Soils, sludges and treated bio-wastes — Detection and enumeration of Salmonella spp. – Part 2 : Liquid enrichment method in Selenite Cystine medium followed by enrichment in Rappaport – Vassiliadis medium for semi quantitative Most Probable Number (MPN) determination**
Salmonella	**Soils, sludges and treated bio-wastes — Detection and enumeration of Salmonella spp. — Part 3: Presence/absence method by liquid enrichment in peptone-novobiocin medium followed by Rappaport Vassiliadis medium EU1**



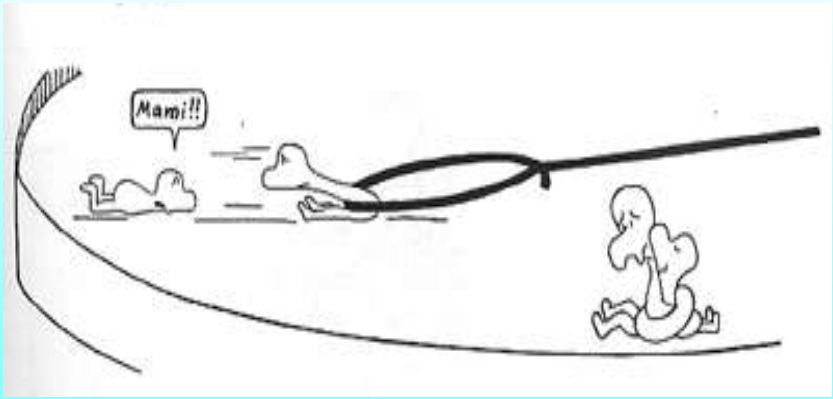
Porovnávané metody

E. coli	**Soils, sludges and treated bio-wastes — Detection and enumeration of Escherichia coli – Part 1: Membrane filtration method for quantification EU 2**
E. coli	**Soils, sludges and treated bio-wastes — Detection and enumeration of Escherichia coli — Part 2: Miniaturised method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium EU3**
E. coli	**Soils, sludges and treated bio-wastes — Detection and enumeration of Escherichia coli — Part 3: Macromethod (Most Probable Number) in liquid medium EU4**
E.coli	**Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *E.coli* (AHEM, ČR) CZ2**

Jednotná struktura postupu.

- Analýzy na reálných vzorcích se prováděly vždy v pěti opakováních z jednoho vzorku a bylo analyzováno 6 vzorků v 5ti opakováních pro salmonelu dvěma metodami a *E. coli* čtyřmi metodami.

- Pro všechny výše ověřované metody bylo provedeno ověření s 8 přídavky známých počtů KTJ (<10 KTJ, 19 KTJ, 38 KTJ, 10^2KTJ, 10_3KTJ, 10^4 KTJ, 10^5KTJ a 10^6KTJ) v devíti opakováních. Vzhledem k časové náročnosti byly porovnávány v jednom časovém úseku metody CZ 1 a EU 1 CZ 2 a EU 2 a EU 3 a metody CZ 2 a EU 4 v jiném termínu.

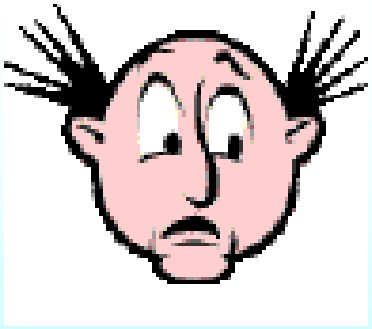


Výsledky - salmonela

- na reálných vzorcích - analýza výsledků stanovení salmonel byla založena na logistické regresi

- bylo použito postupu podle normy ČSN EN ISO 17994: Kritéria pro zjištění ekvivalence dvou mikrobiologických metod

- přídavky - validace pro shodnost shodnost a opakovatelnost byly vyhodnocovány pomocí robustní lineární regrese podle Passinga a Babloka



Reálné vzorky
Metody presence/absence (P/A) podle ČSN EN ISO 17994.

$$X^2 = \frac{(n_A - n_B)^2}{(n_A + n_B)}$$

Vyhodnocení metod P/A je založeno na Poissonově indexu disperze X^2.
Hodnota toto indexu je dána vzorcem:
Pokud je hodnota Poissonova indexu disperze $X^2 \geq 4$,
jsou výsledky metod rozdílné.
Pokud $X^2 < 4$, jsou výsledky metod bez rozdílu.
n_A – je počet vzorků, kde je metoda A pozitivní a metoda B negativní,
n_B – je počet vzorků, kde je metoda A negativní a metoda B pozitivní.

počet vzorků, kde metodou CZ1 byl zjištěn pozitivní výsledek a metodou EU1 byl zjištěn negativní výsledek: nA = 2

počet vzorků, kde metodou EU1 byl zjištěn pozitivní výsledek a metodou CZ1 byl zjištěn negativní výsledek výsledek: nB = 0

Poissonův index disperze = 2 a je menší než 4 (X2 < 4), z čehož vyplývá, že metody dávají výsledky bez rozdílu.

Reálné vzorky
Logitová regrese, kontingenční tabulka a koeficientu asociace

		Metoda 2	
		Negativní	**Pozitivní**
Metoda 1	**Negativní**	13	3
	Pozitivní	2	54

Koeficient asociace má hodnotu 0.795

Hodnota Poissonova koeficientu disperze,
spočítaná z této tabulky podle ČSN EN ISO 17994 je 0.2< 4

obě metody indikují přítomnost salmonel ve vzorku shodně.

Známé přídavky KTJ

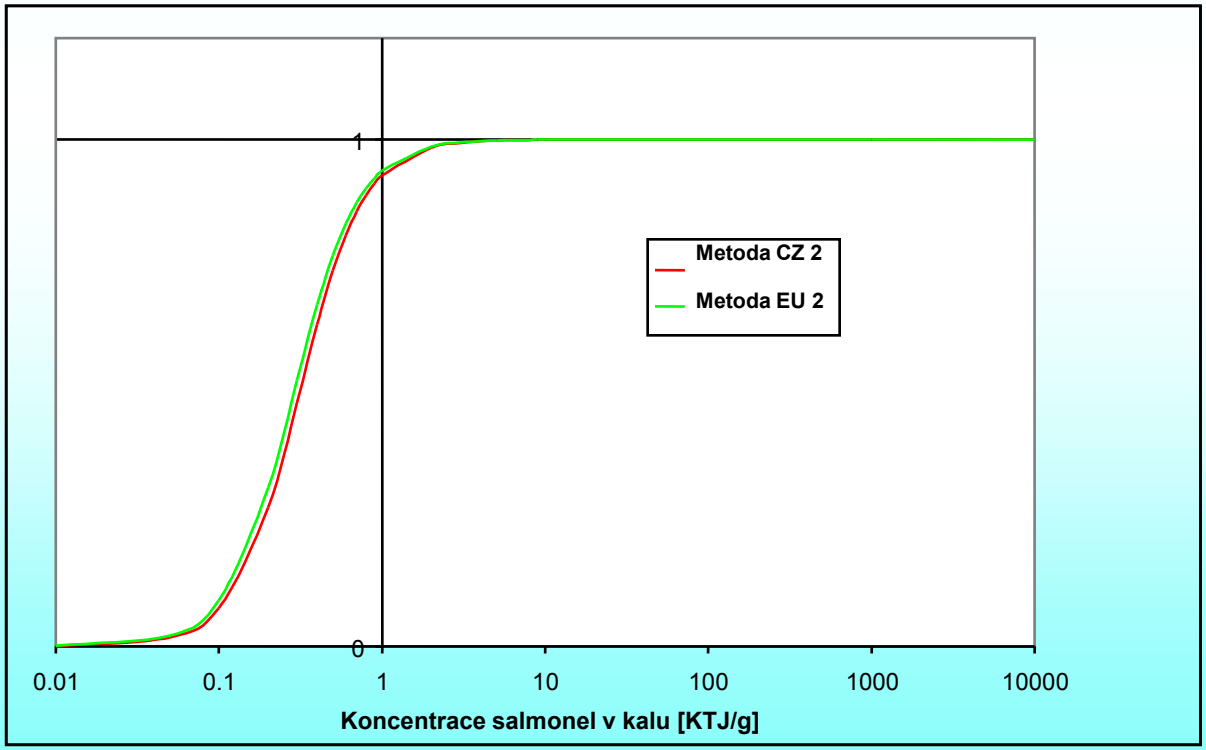
Metodou logitové regrese byla vyhodnocena závislost nálezu P/A

Metoda CZ1

$y = \exp(2.58408+(5.09421)*x)/(1+\exp(2.58408+(5.09421)*x))$

Metoda EU1

$y = \exp(2.72886+(5.02928)*x)/(1+\exp(2.72886+(5.02928)*x))$



Výsledky – *E.coli* reálné vzorky

Statistické vyhodnocení metod stanovení pro *E. coli* (porovnávání vždy referenční metody CZ a jedné porovnávané EU) pro na reálné vzorky bylo použito postupu podle normy
ČSN EN ISO 17994: Kritéria pro zjištění ekvivalence dvou mikrobiologických metod a metody lineární regrese.

CZ 2 a EU 2

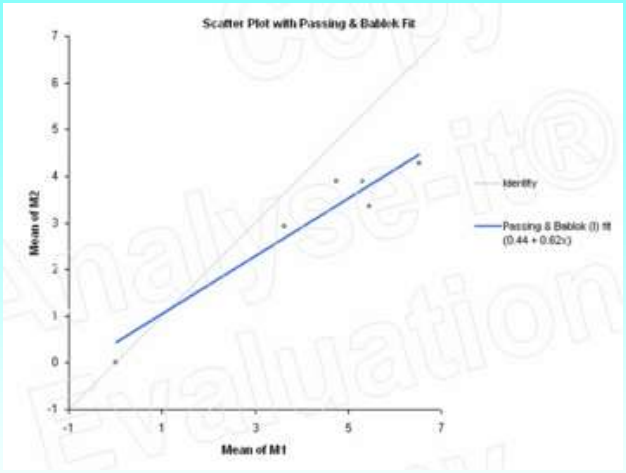
Parametr	
Průměr	340,49
Směrodatná odchylka	210,65
Rozšířená nejistota	94,20
Konfidenční interval:	
Dolní mez x_L	246,29
Horní mez x_H	434,69

EU 3 a CZ 2

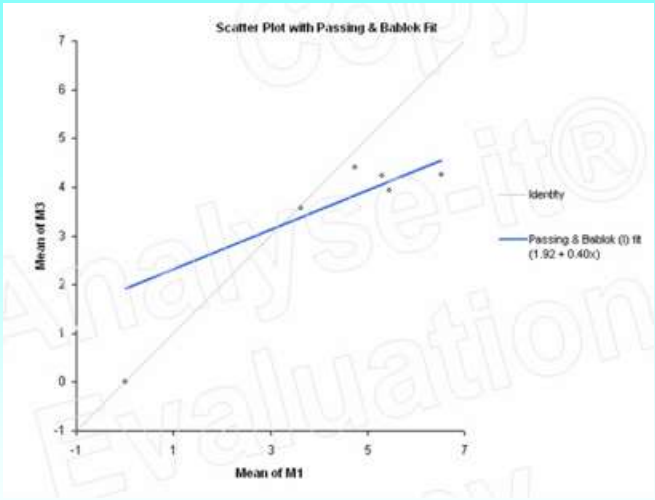
Parametr	
Průměr	242,51
Směrodatná odchylka	236,42
Rozšířená nejistota	105,73
Konfidenční interval:	
Dolní mez xl	136,78
Horní mez xh	348,23

CZ 2 a EU 4

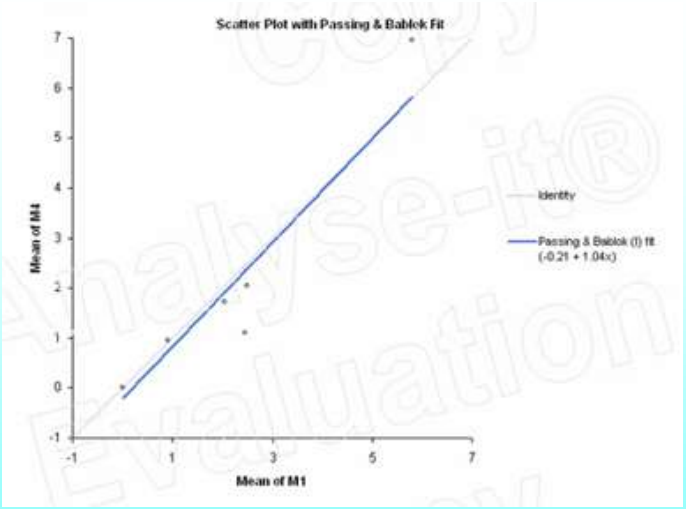
Parametr	
Průměr	45,93
Směrodatná odchylka	233,95
Rozšířená nejistota	93,58
Konfidenční interval:	
Dolní mez x_L	-47,65
Horní mez x_H	139,51



CZ 2 a EU2



CZ 2 a EU 3



CZ 2 a EU 4

	Absolutní člen	95% interval spolehlivosti	Směrnice	95% interval spolehlivosti
CZ 2 / EU 2	0.44	-0.43 3.72	0.62	-0.02 0.86
CZ 2 / EU 3	1.92	-0.61 5.86	0.40	0.33 0.98
CZ 2 / EU 4	-0.21	-47.56 0.67	1.04	0.45 21.78

Výsledky – *E.coli* - přídavky

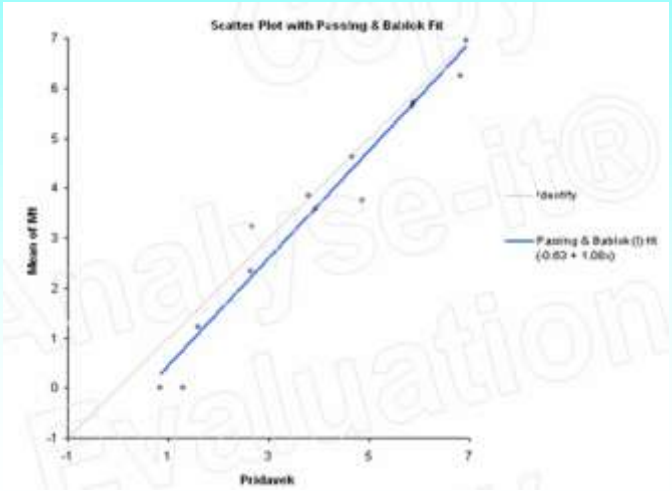
Opakovatelnost a shodnost

Metoda	Shodnost	Shodnost
CZ 2	0.0406	0.0708
EU 2	0.1945	
EU 3	0.4957	
EU 4		0.3301

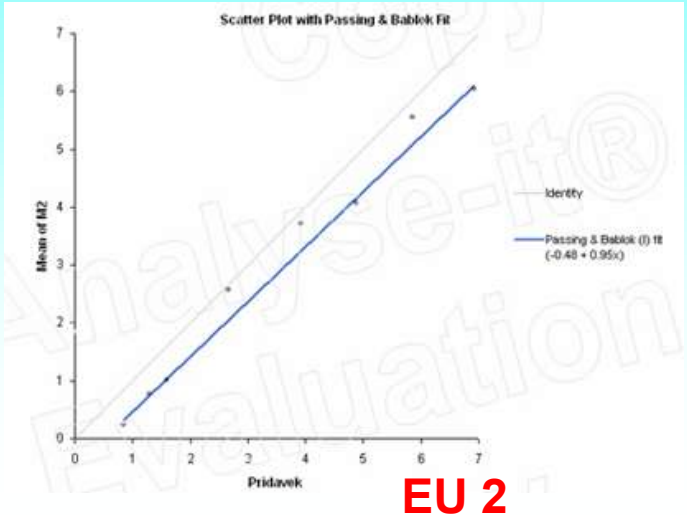
Metoda	Opakovatelnost	Opakovatelnost
CZ 2	0.1136	0.1983
EU 2	0.5446	
EU 3	1.3878	
EU 4		0.9242

Výsledky – *E.coli* - přídavky

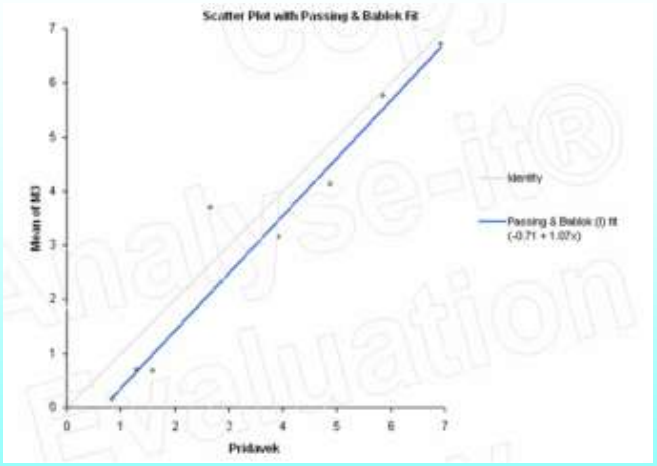
Porovnání lineární regresí.



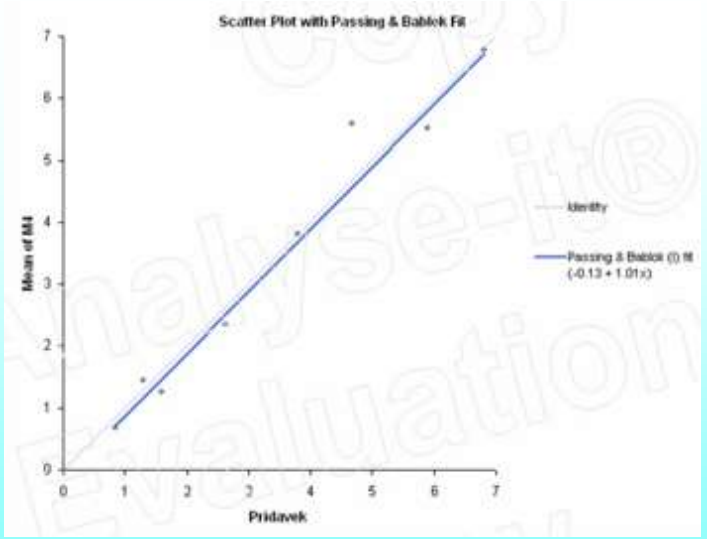
EU 1



EU 2



EU 3



EU 4

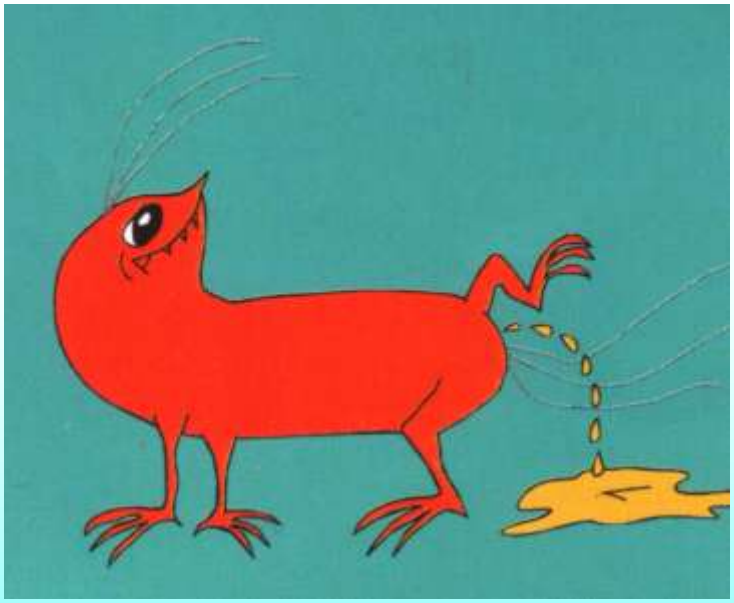
Výsledky – *E.coli* - přídavky
Porovnání lineární regresí

Metoda	Absolutní člen	95% interval spolehlivosti	Směrnice	95% interval spolehlivosti
CZ 2	-0.63	-1.33 -0.06	1.08	0.92 1.25
EU 2	-0.48	-0.79 0.24	0.95	0.82 1.15
EU 3	-0.71	-1.49 0.53	1.07	0.71 1.26
EU 4	-0.13	-0.92 0.58	1.01	0.81 1.29

- nejlepší charakteristiku má metoda EU 4, přestože vykazuje mírné stejnoměrné podceňování výsledků
- z grafického zpracování, je zřejmé, že metoda CZ 2 podhodnocuje výsledky (shoda s vyhodnocením porovnání metod na reálných vzorcích)
- chyba se mění v rozsahu hodnot, směrnice přímky není 1, u nižších hodnot metoda podhodnocuje, u vyšších se k reálným hodnotám přibližuje.
- metoda EU 2 podhodnocuje nejvíce, ale stejně v celém rozsahu koncentrací přídavku
- EU 3 podhodnocuje také ve vyšších koncentracích víc než metoda CZ 2.

Závěr

Vybrané metody budou dále ověřovány ještě v mezilaboratorním porovnání v dalších letech řešení.
Z ověřovaných metod lze jako nejméně vhodnou, na základě získaného souboru dat, považovat metodu EU 3 – miniaturizovaná destičková metoda.
Metody pro salmonelu vykazovaly naprostou shodu a je možné již na základě tohoto souboru dat doporučit obě k další validaci.



Mikrobi jsou potvory, hlavně tehdy, když se mají najít