

Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica
číslo 7/2001

**Stanovení indikátorových mikroorganismů pro
mikrobiologická kritéria pro použití kalů na zemědělské
půdě ve smyslu vyhlášky č.382/2001 Sb., o podmínkách
použití upravených kalů na zemědělské půdě**

Praha, listopad 2001

Předseda redakční rady: doc. MUDr. L. Komárek, CSc.

Členové: prof. MUDr. V. Bencko, DrSc., MUDr. J. Mika,
RNDr. F. Rettich, CSc., A. Svobodová,
Mgr. J. Veselá, MUDr. M. Vít

Vydává Státní zdravotní ústav v Praze
ISSN 0862-5956

ACTA HYGIENICA, EPIDEMIOLOGICA ET MICROBIOLOGICA
číslo 7/2001

Stanovení indikátorových mikroorganismů pro mikrobiologická kritéria pro použití kalů na zemědělské půdě ve smyslu vyhlášky č.382/2001 Sb., o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě

Autor: Ladislava Matějů, SZÚ - CHŽP skupina a NRL pro hygienu půdy a odpadů

Vytiskl: Ústav jaderných informací, Praha 5 – Zbraslav,
Elišky Přemyslovny 1335
rok vydání: 2001, náklad 600 výtisků

Vydal: Státní zdravotní ústav, Praha 10, 100 42, Šrobárova 48
Tel. redakce 02-67082288, E-mail AHEMSZU@SZU.CZ

OBSAH

	Předmluva	1
1.	Úvod	3
2.	Všeobecná ustanovení	4
2.1.	Předmět a vymezení působnosti.....	4
2.2.	Normativní a legislativní předpisy.....	4
2.1.1.	Citované a související normativní předpisy.....	4
2.2.2.	Citované a související legislativní předpisy.....	5
2.3.	Odběr vzorku a nakládání s ním před vlastním stanovením.....	6
2.3.1.	Odběr, přeprava a uchovávání vzorku.....	6
2.3.2.	Úpravy vzorku.....	6
2.4.	Kultivační půdy a činidla.....	6
2.5.	Postup zkoušky.....	7
2.6.	Vyjádřování výsledků.....	7
2.6.1.	Vyjádření výsledků pro kvantitativní stanovení.....	7
2.6.2.	Vyjádření výsledků pro kvalitativní stanovení.....	9
2.7.	Protokol o zkoušce.....	10
2.8.	Bezpečnost.....	10
2.9.	Zajištění systému QA-QCK.....	10
2.9.1.	Vnitřní kontrola.....	10
2.9.2.	Vnější kontrola.....	11
2.10.	Likvidace odpadů.....	11
3.	Stanovení jednotlivých indikátorů	12
3.1.	Stanovení termotolerantních koliformních bakterií.....	12
3.1.1.	Termíny a definice.....	12
3.1.2.	Podstata zkoušky.....	12
3.1.3.	Zjišťování přítomnosti suspektních kolonií.....	12
3.1.4.	Konfirmace.....	13
3.1.5.	Kultivační půdy a činidla.....	13
3.1.6.	Přístroje a pomůcky.....	16
3.1.7.	Postup zkoušky.....	18
3.1.8.	Vyjádření výsledků.....	19
3.1.9.	Zabezpečování jakosti.....	20
3. 1. 10.	Charakteristiky metody.....	20
3.2.	Stanovení enterokoků.....	21
3.2.1.	Termíny a definice.....	21
3.2.2.	Podstata zkoušky.....	22
3.2.3.	Zjišťování přítomnosti suspektních kolonií.....	22
3.2.4.	Konfirmace.....	22
3.2.5.	Kultivační půdy a činidla.....	23
3.2.6.	Přístroje a pomůcky.....	26
3.2.7.	Postup zkoušky.....	27

3.2.8.	Vyjádření výsledků.....	30
3.2.9.	Zabezpečování jakosti.....	30
3.2.10.	Charakteristiky metody.....	31
3.3.	Detekce salmonel.....	32
3.3.1.	Termíny a definice.....	32
3.3.2.	Podstata zkoušky.....	32
3.3.3.	Kultivační pomůcky a činidla.....	34
3.3.4.	Přístroje a pomůcky.....	44
3.3.5.	Postup zkoušky.....	45
3.3.6.	Vyjádření výsledků.....	49
3.3.7.	Zabezpečování jakosti.....	50
3.3.8.	Charakteristiky metody.....	50

Přílohy:

č. 1	- Schéma stanovení termotolerantních koliformních bakterií metodou přímého výsevu na povrchu kultivačního média "m-FC agar"	52
č. 2	- Schéma stanovení enterokoků metodou přímého výsevu na povrchu kultivačního média.....	53
č. 3	- Schéma postupu zkoušky detekce salmonel v kalech.....	54
č. 4	- Příloha č. 4 k Vyhlášce č. 382/2001 Sb.	55

AHEM - ročník 2001	56
Sdělení redakce	57

Předmluva

Nakládání s kaly z čistíren odpadních vod včetně jejich aplikace je zahrnuto v rámci předpisů Evropské unie do oblasti odpadového hospodářství. Směrnice pro nakládání s kaly byla zpracována z mnoha hledisek počínající ochranou zdraví člověka a zvířat před nekontrolovaným používáním kalů až po výhodnost využití kalu z agronomických hledisek. Směrnice rady 86/278-EEC z 12. 6. 1986 na ochranu životního prostředí, zvláště půdy, při využívání kalů v zemědělství je závazná pro všechny členské země s tím, že každá členská země může vydat přísnější opatření, než jsou obsažena ve směrnici rady. Většina zemí EU přijala vlastní zabezpečení z hlediska minimalizace rizika, a to jak z hlediska obsahu škodlivých látek, tak z hlediska mikrobiologické kontaminace kalů.

V roce 2001 přijala Česká republika zákon č.185/2001 Sb., o odpadech, který plně zapracovává podmínky Směrnice rady 86/278-EEC, týkající se regulace aplikace kalů na zemědělskou půdu. Prováděcí vyhláška MŽP ČR č.382/2001 Sb., o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě, která byla vypracována ve spolupráci MZe a MZ ČR, stanoví technické podmínky pro použití kalů, limitní koncentrace vybraných rizikových látek v kalech a půdě včetně mikrobiologických kritérií pro čistírenské kaly.

Vyhláška MŽP č.382/2001 Sb., stanoví mikrobiologická kritéria pro použití kalů na zemědělské půdě uvedená v příloze č. 4 této vyhlášky na základě přípustného množství indikátorových mikroorganismů (termotolerantní koliformní bakterie, enterokoky a *Salmonella sp*). Vyhláška stanoví v § 4 postupy odběru vzorků kalů a půdy a metody jejich analýzy. Referenční metody pro odběry vzorků, analýzy a metody pro mikrobiologická stanovení jsou uvedeny v příloze č. 6.

Metody pro stanovení indikátorových mikroorganismů byly vypracovány v rámci řešení úkolu VaV MZe ČR EP č. 9346 „Hygienizace čistírenských kalů“. Byly ověřeny v laboratořích SZÚ a v mezilaboratorních ověřovacích zkouškách, kterých se zúčastnily laboratoře hygienické služby, výzkumných pracovišť vysokých škol a ústavů a též privátní akreditované laboratoře. Seznam laboratoří, které se účastnily mezilaboratorních ověřovacích zkoušek je uveden v následujícím přehledu.

**Přehled laboratoří zúčastněných na mezilaboratorních
ověřovacích zkouškách**

Zúčastněné laboratoře
MHS Brno
MěHS Praha 10
KHS Brno
KHS České Budějovice
KHS Ostrava
KHS Ústí nad Labem
OHS Jihlava
OHS Kladno
OHS Karviná
OHS Mladá Boleslav
OHS Strakonice
OHS Ústí nad Orlicí
OHS Vyškov
Analytická laboratoř s. s r. o., Plzeň
VŠCHT Praha – fak. mikrobiol. laboratoř
VÚV T. G. Masaryka Praha
SZÚ Praha

1.0 ÚVOD

Postup stanovení je určen pro detekci indikátorů mikrobiologické kontaminace v odvodněných hygienizovaných kalech z čistíren odpadních vod v souladu s vyhláškou č. 382/2001 Sb., o využití upravených kalů na zemědělské půdě. Jako indikátory mikrobiologické kontaminace odvodněných hygienizovaných kalů pro účely tohoto postupu se rozumí bakterie rodu *Salmonella sp.* (dále též salmonela), termotolerantní koliformní bakterie a enterokoky.

Postup je určen pro stanovení indikátorů mikrobiologické kontaminace v hygienizovaných kalech, tedy podrobených jakémukoli postupu, který snižuje počet KTJ indikátorových mikro-organismů na nejmenší míru a předpokládá se, že stanovovaná množství budou nízká a budou odpovídat množstvím KTJ, která jsou uvažována ve vyhlášce o aplikaci čistírenských kalů na zemědělskou půdu.

Postup stanovení je rozdělen na část všeobecnou a část speciální. V první, všeobecné části, jsou popsány podmínky stanovení platné pro všechny sledované indikátory. Část speciální popisuje konkrétní podmínky stanovení a detekce jednotlivých indikátorů.

2.0. VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

2.1. Předmět a vymezení působnosti

Účelem tohoto postupu je poskytnout pokyny pro kvantitativní stanovení počtů kolonie tvořících jednotek (dále jen KTJ) termotolerantních koliformních bakterií a enterokoků a pro detekci salmonel v odvodněných upravených (hygienizovaných) kalech z čistíren odpadních vod (dále jen kaly).

Při analýze je třeba dodržet všeobecná ustanovení pro mikrobiologická zkoušení včetně zásad přepravy a uchování vzorku.

2.2. Normativní a legislativní předpisy

2.2.1. Citované a související normativní předpisy

ČSN ISO 7667: 1994 Mikrobiologie. Standardní struktura metod mikrobiologického zkoušení

ČSN EN ISO 6887-1:1999 Mikrobiologie potravin a krmiv. Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinasobných ředění. Část 1.

ČSN ISO 7218:1998 Mikrobiologie poživatin a krmiv – Všeobecné pokyny pro mikrobiologické zkoušení

ČSN EN 25667-1:1995 Jakost vod – Odběr vzorků – Část 1: Pokyny pro návrh programu odběru vzorků

ČSN EN 25667-2:1999 Jakost vod – Odběr vzorků – Část 13: Pokyny pro způsoby odběru vzorků kalů z čistíren a úpraven vod

ČSN ISO 8199:1994 Jakost vod – Obecné pokyny pro stanovení mikroorganismů kultivačními metodami

ČSN ISO 9998:1995 Jakost vod – Kontrola a hodnocení mikrobiologických kultivačních médií pro stanovení počtu kolonií používaných při zkoušení jakosti vod

ČSN ISO 4832:1995 Mikrobiologie – Všeobecné pokyny pro stanovení počtu koliformních bakterií. Technika počítání kolonií

ČSN P ENV ISO 111 33 –1:2000 Mikrobiologie poživatin a krmiv – Všeobecné pokyny pro přípravu a výrobu kultivačních půd – část 1: Všeobecné pokyny pro zabezpečování jakosti při přípravě kultivačních půd v laboratoři

ČSN ISO 3696:1994 Jakost vody pro analytické účely. Specifikace a zkušební metody

ČSN EN ISO 7899-2:2001 Jakost vod – Stanovení intestinálních enterokoků, část 2: Metoda membránových filtrů

ČSN-EN 12824:1999 Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu bakterií rodu *Salmonella*

ČSN-ISO 10381-6:1998 Kvalita půdy – Odběr vzorků – část 6

ČSN 83 0550 část 3 – Fyzikálně-chemický rozbor kalů – Stanovení celkové sušiny, zbytku po žihání a ztráta žiháním

ČSN 01 8003 Zásady pro bezpečnou práci v chemických laboratořích

2.2.2. Citované a související legislativní předpisy

Zákon č. 185/2001Sb., o odpadech

Vyhláška č.382/2001 Sb., o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě

2.3. Odběr vzorku a nakládání s ním před vlastním stanovením

2.3.1. Odběr, přeprava a uchovávání vzorku

Vzorky kalu se odeberou v souladu s vyhláškou 382/2001 Sb., a plánu vzorkování podle ČSN EN 25667-1, 2 a 13. Vzorky kalu se uchovávají a přepravují podle ČSN-ISO 10381-6 Kvalita půdy – Odběr vzorků – část 6 volně uzavřené ve sterilních vzorkovnicích při teplotě do 5°C tak, aby nemohlo dojít k druhotné kontaminaci.

2.3.2. Úpravy vzorku

Vzorky odvodněných hygienizovaných kalů musí být zpracovány nejdéle do 10 dnů po odběru. K dosažení homogenity vzorku před vlastním stanovením je nutno jej několikrát protlačit přes kovové síto o velikosti otvorů 5 mm. Homogenizaci je nutno provádět ručně ve sterilních rukavicích ve vymezeném prostoru. Síto se po každém vzorku důkladně umyje, usuší a vydezinfikuje přípravkem na bázi alkoholu (např. Sterilium, Cutasept a podobné). Po oschnutí je možno síto znovu použít.

2.3.2.1. SPECIFICKÁ PŘÍPRAVA VÝCHOZÍ SUSPENZE PRO SPECIFICKY UPRAVENÉ KALY

Zásadité kaly (upravované vápnem)

V případě, že kaly jsou po chemické úpravě vápnem, je třeba zajistit, aby pH při naředění roztoku pro výchozí suspenzi nekleslo pod hodnotu 4,5 a nebylo vyšší než pH = 7,0.

2.4. Kultivační půdy a činidla

Aby byla zachována standardnost výsledků, při přípravě kultivačních médií se zásadně užívají buď složky standardní jakosti a chemikálie s označením pro analýzu nebo dehydratovaná kompletní kultivační média. Při přípravě kompletních kultivačních médií je třeba se řídit pokyny výrobce. Pokud nejsou kultivační média ihned použita, uchovávají se při teplotě 5°C+/-3°C v temnu nejdéle 1 měsíc, za podmínek, které zabrání změnám jejich složení nebo jiného znehodnocení. Užívá se pouze destilovaná voda nebo voda s ekvivalentní čistotou.

Složení a užití jednotlivých médií je v kapitolách stanovení jednotlivých indikátorů mikrobiální kontaminace kalů. (viz ČSN EN ISO 1/1 33-1).

2.5. Postup zkoušky

Schéma postupu a podmínky stanovení jsou uvedeny v příslušných kapitolách pro jednotlivé indikátory.

2.6. Vyjadřování výsledků

2.6.1. Vyjádření výsledků pro kvantitativní stanovení

Pro stanovení termotolerantních koliformních bakterií a enterokoků platí následující pravidla pro výpočet konečného výsledku.

2.6.1.1. OBECNÝ PŘÍPAD

Počet N termotolerantních koliformních bakterií a enterokoků na gram vzorku se vypočte podle této rovnice:

$$N = \frac{\Sigma a}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

kde Σa je součet kolonií spočítaných po identifikaci na všech vybraných plotnách

n_1 počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění

n_2 počet ploten použitých pro výpočet z druhého ředění

d první pro výpočet použité ředění

Výsledek se zaokrouhlí tak, aby obsahoval pouze dvě číslice různé od nuly.

Výsledek se vyjádří jako počet mikroorganismů na gram vzorku a to jako číslo 1,0 až 9,9 násobené 10^x , kde x je příslušná mocnina 10.

Příklad

Přímý odečet mikroorganismů poskytl tyto výsledky:

- z prvního ředění použitého pro výpočet (10^3): 66 a 80 kolonií
- z druhého ředění použitého pro výpočet (10^4): 4 a 6 kolonií

Tyto počty kolonií byly confirmovány:

- z plotny se 66 koloniemi: 5 kolonií, z nichž 4 vyhověly stanoveným kritériím, takže $a=66$
- z plotny s 80 koloniemi: 5 kolonií, z nichž 3 vyhověly stanoveným kritériím, takže $a=48$
- z plotny se 6 koloniemi: 5 kolonií, z nichž 4 vyhověly stanoveným kritériím, takže $a=6$
- z plotny s 4 koloniemi: všechny 4 byly potvrzeny jako hledané mikroorganismy

Proto

$$N = \frac{\sum a}{(n_1 + 0,1 n_2) d} = \frac{66 + 48 + 6 + 4}{(2 + 0,2) \times 10^{-3}} = \frac{124}{2,2 \times 10^{-3}} = 56\,363$$

Po zaokrouhlení výše uvedeným způsobem je výsledek 56 000 neboli $5,6 \times 10^4$ termotolerantních koliformních bakterií (enterokoků) v 1 gramu vzorku.

2.6.1.2. ODHAD NÍZKÝCH POČTŮ

Jestliže dvě misky očkované výchozí suspenzí obsahují méně než 15 charakteristických kolonií, vypočítá se aritmetický průměr m z kolonií spočítaných na obou plotnách.

Výsledek se vyjádří takto:

- odhadnutý počet N_E termotolerantních koliformních bakterií

$N_E = m \times d$, kde d je faktor ředění výchozí suspenze.

2.6.1.3. ŽÁDNÉ CHARAKTERISTICKÉ BAKTERIE

Jestliže dvě misky očkované výchozí suspenzí neobsahují žádné charakteristické kolonie, výsledek se vyjádří takto:

- méně než $1 \times d^1$ mikroorganismů v gramu vzorku, kde d je faktor ředění výchozí suspenze

2.6.1.4. VZÁJEMNÁ SHODA VÝSLEDKŮ

Ze statistických důvodů kolísají konfidenční meze při technice počítání kolonií od $\pm 16 \%$ do $\pm 52 \%$. Při počtu kolonií na plotně nižším než 15 udává konfidenční meze tabulka v ISO 7218 Mikrobiologie poživatin a krmiv - Všeobecné pokyny pro mikrobiologické zkoušení (9.2.1.4.2). V praxi mohou být zjištěny i větší odchylky, zejména mezi výsledky získanými různými pracovníky.

2.6.1.5. PŘEPOČET VÝSLEDKŮ NA SUŠINU MATRICE

Sušina se stanoví metodou podle ČSN 83 05 50 část 3 – Fyzikálně-chemický rozbor kalů – Stanovení celkové sušiny, zbytku po žihání a ztráta žiháním.

2.6.2. Vyjádření výsledků pro kvalitativní stanovení

V souladu s výsledky se uvede přítomnost nebo nepřítomnost bakterií rodu *Salmonella sp.* ve zkušebním vzorku o hmotnosti 50g matrice jako negativní nebo pozitivní nález.

2.7. Protokol o zkoušce

V protokolu o zkoušce musí být specifikovaná užitá metoda zkoušení a získané výsledky. Rovněž zde musí být uvedeny všechny okolnosti či podmínky pracovního postupu, které nejsou

touto metodou specifikovány, nebo které jsou považovány za volitelné, a dále všechny podrobnosti o událostech, které mohly mít vliv na výsledky zkoušení.

Protokol o zkoušce musí obsahovat všechny informace nezbytné pro úplnou identifikaci vzorku.

2.8. Bezpečnost

Je třeba dodržovat pravidla a předpisy pro práci v mikrobiologické laboratoři ČSN ISO 8199, bod 4 a ČSN 018003 Zásady pro bezpečnou práci v chemických laboratořích.

Z hlediska zdraví laboratorních pracovníků, vzhledem k povaze matrice, je nezbytné, aby se zkoušky ke stanovení výše vedených indikátorů prováděly výhradně v laboratořích k tomu účelu vhodně vybavených, řízených zkušeným mikrobiologem a za podmínky, že s veškerými inkubovanými materiály se nakládá s velkou opatrností.

2.9. Zajištění systému QA-QCK

Kontrola kvality stanovení je realizována následnými kroky:

2.9.1. Vnitřní kontrola

musí být zajišťována:

-kontrolou sterility živných půd

-kontrolou kvality kultivačních médií podle ČSN ISO 8199:1994
Jakost vod – Obecné pokyny pro stanovení mikroorganismů kultivačními metodami

-kontrolou čistoty ovzduší

-kontrolou sterility skla

-ke zjištění přesnosti výsledků prováděním duplicitních vyšetření téhož vzorku.

-kontrolním stanovením s referenčním materiálem

2.9.2. Vnější kontrola

Je realizována účastí v mezilaboratorních porovnávacích testech.

2.10. Likvidace odpadů

se provádí v souladu s provozním řádem likvidace odpadů v laboratoři, který je v souladu se zákonem 185/2001Sb., o odpadech.

3.0. STANOVENÍ JEDNOTLIVÝCH INDIKÁTORŮ

3.1. Stanovení termotolerantních koliformních bakterií

3.1.1 Termíny a definice

Pro účely tohoto metodického pokynu platí definice:

Termotolerantní koliformní bakterie: gramnegativní tyčinky netvořící spory z čeledi *Enterobacteriaceae*, s negativním cytochrom-oxidázovým testem, které tvoří za aerobních podmínek kolonie během 24 hodin kultivace při teplotě 44°C +/- 0,5°C na selektivním diferenciacním médiu s laktózou.

3.1.2. Podstata zkoušky

Určený objem výchozí suspenze se očkuje na povrch předsušeného pevného kultivačního prostředí. Jako kultivační prostředí se používá mFC agar.

Stupeň ředění je třeba volit tak, aby výsledný počet kolonií na jedné plotně byl 15 až 150 KTJ (kolonie tvořící jednotku). Za stejných podmínek se desetinásobným ředěním výchozí suspenze inokulují další dvojice ploten. Pro každé ředění se očkují dvě plotny.

Z počtu typických kolonií pro termotolerantní koliformní bakterie se získá počet KTJ v 1 gramu vzorku. Výsledky se vyjádří přepočtené na sušinu vzorku.

3.1.3. Zjišťování přítomnosti suspektních kolonií

Po inkubaci se počítají jako termotolerantní koliformní bakterie všechny vyrostlé kolonie, které jsou tmavě modré.

3.1.4. Konfirmace

POZNÁMKA – Konfirmace se provádí v případě, že vyrostlé kolonie jsou ovlivněny nárůstem doprovodných bakterií a

nevykazují typické modré zbarvení a nárůst nebo, že pracovník provádějící analýzu, považuje doplnění konfirmačních testů za nutné. Vybrané kolonie (alespoň 5) pro konfirmaci se přeočkují na živný agar (nebo jiný vhodný agar bez inhibičních přísad) a po 24 hodinové kultivaci se provede test na negativní přítomnost oxidázy.

3.1.5. Kultivační půdy a činidla

3.1.5.1. MFC AGAR

Složení

tryptose nebo biosate	10,0 g
proteose pepton č. 3 nebo polypepton	5,0 g
kvasničný extrakt	3,0 g
chlorid sodný (NaCl)	5,0 g
laktóza	12,5 g
žlučové sole č. 3 nebo směs žlučových solí	1,5 g
anilínová modř	0,1 g
alkalický roztok kyseliny rosolové	10 ml
agar	12,0 g – 15,0 g *
voda	do 1000 ml

*podle ztužovací schopnosti agaru

Příprava

Předepsané složky se postupně rozpustí v 1000 ml destilované vody, která již obsahuje 10 ml alkalického roztoku kyseliny rosolové. Potom se médium zahřeje těsně pod bod varu a ihned se ochladí na teplotu 45°C – 55°C. Nesterilizuje se. Nakonec se upraví hodnota pH na 7,4 +/- 0,2.

Připravené médium se skladuje nejdéle 2 týdny při teplotě 4°C – 8°C tak, aby nedocházelo k jeho vysychání.

Doporučuje se používat komerčně dostupné dehydratované médium.

Alkalický roztok kyseliny rosolové

roztok hydroxidu sodného (NaOH) o koncentraci 0,2 mol/litr	100 ml
kyselina rosolová	1,0 g

Příprava

Po dokonalém rozpuštění kyseliny rosolové v roztoku hydroxidu sodného se roztok přefiltruje. Skladuje se ve tmě při teplotě 2°C – 10°C nejdéle 2 týdny. Pokud se změní barva roztoku z tmavě červené na hnědou, nelze jej použít. Nesterilizuje se, kyselina rosolová se při vyšších teplotách rozkládá.

3.1.5.2. ŽIVNÝ AGAR

Složení

masový extrakt	1,0 g
pepton	1,0 g
chlorid sodný (NaCl)	5,0 g
agar	15,0 g
destilovaná voda (doplnit do)	1000 ml
pH	7,2 až 7,4

Příprava

Jednotlivé složky se postupně přidávají do vody. Zahřívají se tak dlouho, dokud se zcela nerozpustí. Hodnota pH se upraví roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol.l⁻¹ přibližně na 7,2 až 7,4. Pak se kultivační prostředí povaří 10 minut, zfiltruje a znovu se upraví pH tak, aby bylo v rozmezí 7,2 až 7,4. Sterilizuje se v autoklávu za přetlaku 0,1 MPa po dobu 15 minut.

3.1.5.3. FOSFÁTOVÝ ŘEDÍCÍ ROZTOK

Složení fosfátového ředícího roztoku

dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	34,0 g
destilovaná voda (doplnit do)	1000 ml
pH	7,2 ± 0,5

Roztok chloridu hořečnatého

chlorid hořečnatý	38 g
destilovaná voda (doplnit do)	1000 ml

Příprava fosfátového roztoku

V 500 ml destilované vody se rozpustí dihydrogenfosforečnan draselný. Pak se upraví 1 ml roztoku hydroxidu sodného pH na $7,2 \pm 0,5$. Nakonec se roztok doplní na 1000 ml.

Příprava roztoku chloridu hořečnatého

V 1000 ml se rozpustí chlorid hořečnatý.

Příprava fosfátového pufru

Do 1000 ml destilované vody se přidá 1,25 ml fosfátového roztoku a 5,0 ml roztoku chloridu hořečnatého.

Před použitím se roztok plní do skleněných nádob o objemu 250 až 500 ml a sterilizuje se v autoklávu za přetlaku 0,1 MPa po dobu 15 minut. Po vychladnutí se plní po 90 ml do sterilních reagenčních lahvíček. Při plnění je potřeba zachovat aseptické podmínky práce.

3.1.5.4. RINGERŮV ROZTOK – ČTVRTINOVÁ KONCENTRACE

Složení

chlorid sodný (NaCl)	2,25g
chlorid draselný (KCl)	0,105g
chlorid vápenatý bezvodý (CaCl ₂)	0,12g
hydrogenuhličitan sodný (NaHCO ₃)	0,05g
voda	do 1000 ml

Příprava

Jednotlivé složky se rozpustí ve vodě a roztok se doplní vodou na 1000ml.

3.1.5.5. OXIDÁZOVÝ TEST

Využijte se komerčně vyráběného přípravku OXI-test (např. Lachema Brno).

3.1.5.6. ČINIDLO K PRŮKAZU OXIDÁZY

Složení

N, N,N',N'-tetramethyl-p-fenylen-diamin dihydrochlorid	1,0 g
Voda	1000 ml

Příprava

Látka se rozpustí v chladné vodě. Reagens se připravuje těsně před použitím.

3.1.6. Přístroje a pomůcky

POZNÁMKA - Pomůcky pro jedno použití, pokud mají vhodnou specifikaci, jsou přijatelnou náhradou skleněných pomůcek.

3.1.6.1. PŘÍSTROJ KE STERILIZACI HORKÝM VZDUCHEM (SUŠÁRNA) MAJÍCÍ SCHOPNOST UDRŽET TEPLITU NA 160°C AŽ 180°C ± 1°C

3.1.6.2. SKŘÍŇ K SUŠENÍ NEBO SUŠÁRNA S NUCENÝM OBĚHEM VZDUCHU A S TEPLOTOU UDRŽOVANOU V ROZMEZÍ 37°C ± 1°C AŽ 55°C ± 1°C

3.1.6.3. INKUBÁTOR S TEPLOTOU UDRŽOVANOU NA 37°C ± 1°C

3.1.6.4. INKUBÁTOR S TEPLOTOU UDRŽOVANOU NA 44°C ± 1°C

3.1.6.5. PŘÍSTROJ K MĚŘENÍ PH S PŘESNOSTÍ NA ± 0,1 JEDNOTKY PH PŘI 25°C

3.1.6.6. KULTIVAČNÍ BAŇKY NEBO LAHVE

POZNÁMKA - Lze používat baňky nebo lahve opatřené šroubovacím uzávěrem z netoxického kovu nebo plastu.

3.1.6.7. ZKUMAVKY

3.1.6.8. ODMĚRNÉ VÁLCE

3.1.6.9. DĚLENÉ PIPETY JMENOVITÉHO OBJEMU 10ML S DĚLENÍM A JMENOVITÉHO OBJEMU 1ML S DĚLENÍM PO 0,1ML

3.1.6.10. PETRIHO MISKY MALÉ (O PRŮMĚRU 90MM AŽ 100MM) A NEBO VELKÉ (O PRŮMĚRU 140MM)

3.1.6.11 KOCHŮV HRNEC NA ROZEHRÁTÍ KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ

3.1.6.12. OČKOVACÍ KLIČKY ZE SLITINY PLATINY A IRIDIA NEBO ZE SLITINY NIKLU A CHRÓMU S OČKEM O PRŮMĚRU ASI 3MM NEBO JEDNORÁZOVÉ UMĚLOHMOTNÉ

3.1.6.13. HOMOGENIZÁTOR TYPU STOMACHER, VORTEX NEBO VRTULKOVÝ MIXER

3.1.6.14. AUTOKLÁV ($121 \pm 1^\circ\text{C}$)

3.1.7. Postup zkoušky

Viz Příloha č. 1

3.1.7.1. ZKUŠEBNÍ VZOREK A VÝCHOZÍ SUSPENZE

K 10 g upraveného vzorku půdy přidáme 90 ml sterilního fosfátového zředovacího roztoku a zhomogenizujeme ve stomacheru po dobu 1 min. Necháme 5 min. ustát. Z výchozí suspenze se připraví série desetinásobného ředění ve fosfátovém roztoku (3.1.5.3.) nebo v Ringerově roztoku (3.1.5.4.).

3.1.7.2. INOKULACE, INKUBACE

Pipetujeme paralelně na dvě Petriho misky s m-FC agarem (3.1.5.1.) 2 x 0,2 ml základního a prvního dekadického ředění, ev.

dalších vždy dvou po sobě jdoucích dekadických ředění vzorku (postup dle ČSN ISO 6887 -1: Všeobecné pokyny pro přípravu výchozí suspenze a desetinásobných ředění). Rozetřeme sterilní skleněnou tyčinkou a po zaschnutí při teplotě laboratoře umístíme dnem vzhůru v termostatu s teplotou $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ na 18-24 hod.

3.1.7.3. VYHODNOCENÍ

Vyberou se inkubované plotny obsahující méně než 150 typických kolonií o průměru 0,5 mm nebo větší. Z každé vybrané misky se počítá laktosa pozitivní, tj. sytě modré, kolonie, ze kterých se náhodně vybere 5 kolonií pro subkultivaci a biochemickou konfirmaci. Další určování se neprovádí v případě, že více než polovina povrchu plotny je přerostlá. Je-li přerostlá méně jak polovina povrchu, spočítají se kolonie ve druhé části a extrapoluje se tak, aby počet odpovídal celému povrchu plotny.

3.1.7.4. KONFIRMACE

Výběr kolonií pro konfirmaci

Konfirmace se provádí podle 3.1.4. Pro konfirmaci se z každé plotny vybere nejméně po pěti koloniích.

Subkultivace

Typické kolonie z reprezentačního vzorku se přeočkují na povrch živného agarů (viz 3.1.5.2.).

Naočkované misky se inkubují při teplotě $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ po dobu 18 až 24 hodin a z každé z inkubovaných ploten se vybere dobře izolovaná kolonie pro konfirmaci.

3.1.7.5. BIOCHEMICKÉ KONFIRMACE

Oxidázová reakce

S použitím platino-iridiové kličky nebo drátu nebo skleněné tyčinky se odebere část každé dobře izolované kolonie a načárkuje se na filtrační papír zvlhčený oxidázovým reagens nebo na komerčně dostupný disk. Nikl-chromová klička nebo drát se nepoužívá. Negativní reakce potvrzuje příslušnost ke koliformním termotolerantním bakteriím.

3.1.8. Vyjádření výsledků

Obecný popis způsobu vyjadřování výsledků a stanovení počtů bakterií ve vzorku viz ISO 8199. Výsledek se uvede na 1g vzorku vztaženo na suchou hmotnost (kapitola. 2. 6. tohoto postupu).

3.1.8.1. OBECNÝ PŘÍPAD – (PRO POUŽITÍ KONFIRMACE)

Jestliže alespoň 80 % z vybraných typických kolonií je oxidáza negativních, je počet termotolerantních koliformních bakterií týž, jako byl spočítán v odst. 3.1.7.3.

Ve všech ostatních případech se množství bakterií vypočítá z procentuálního podílu oxidáza negativních z celkového počtu kolonií vybraných podle 3.1.7.3.

3.1.9. Zabezpečování jakosti

Zabezpečování jakosti se provádí naplněním bodů v kapitole 2. 9. tohoto metodického postupu.

Pro kontrolu způsobilosti laboratoře prokazovat termotolerantní koliformní bakterie touto metodou a s užitím půd popsaných v této metodě se jako referenční materiál používají následující doporučené kmeny:

**Sbírkový kmen CCM 3954 *Escherichia coli*
(Česká sbírka mikroorganismů PřF MU Brno)**

RM *E.coli* 500 (WR1) - Bilthoven - Holandsko

RM *Enterobacter cloacae* (WR3) - Bilthoven - Holandsko.

3. 1. 10. Charakteristiky metody

Při ověřování metody v laboratořích SZÚ a mezilaboratorních ověřovacích zkouškách (MOZ) byly zjištěny následující výsledky při podmínkách daných uvedeným postupem.

Vzorky kontaminované pomocí RM

pro stanovované počty > 750 KTJ na 1g kalu (> 1 až 15 KTJ na miskách) byla shoda výsledků stanovení u 80% laboratoří

pro stanovované počty > 750 KTJ na 1g kalu (> 1 až 15 KTJ na miskách) byla shoda výsledků stanovení u 85% výsledků stanovených v 1 laboratoři

z 33 výsledků analýz termotolerantních koliformních bakterií provedených během MOZ byl 1 falešně pozitivní výsledek, to představuje 3% zúčastněných laboratoří

z 67 analýz provedených jednou laboratoří byl jeden falešně pozitivní výsledek

hraniční hodnotu citlivosti představuje 2000 KTJ v 10g kalu (200 KTJ v 1g) pro 100% zúčastněných laboratoří

speciální studie opakovatelnosti v jedné laboratoři se dvěma laborantkami pro 15000 KTJ v 10g kalu (>15KTJ na miskách, 1500KTJ v 1g kalu) poskytla jako míru opakovatelnosti (vyjádřenou směrodatnou odchylkou přirozených logaritmů původních hodnot) hodnotu 0,456 nebo vyjádřenou jako $\exp(0,456) = 1,6$

Vzorky přirozeně kontaminované

Ověření bylo provedeno 15 laboratořemi pro dva různé kaly. Míra reprodukovatelnosti metody (vyjádřená směrodatnou odchylkou přirozených logaritmů původních hodnot) poskytla hodnotu 1,22 nebo vyjádřenou jako $\exp(1,22) = 3,4$.

3.2. Stanovení enterokoků

3.2.1 Termíny a definice

Pro účely tohoto metodického pokynu platí definice:

Enterokoky: bakterie, které mají schopnost redukovat 2,3,5trifenylnitrotetrazoliumchlorid na formazan a hydrolyzovat eskulin při teplotě 44°C na médiích specifikovaných tímto postupem. Jsou grampozitivní, katalázanegativní, kokoidního až vejčitého tvaru, většinou tvoří řetízky a mají antigen D.

3.2.2. Podstata zkoušky

Určený objem výchozí suspenze se očkuje na povrch předsušeného pevného kultivačního prostředí, který obsahuje azid sodný (k potlačení růstu G-bakterií) a 2,3,5trifenylnitrotetrazolium chlorid (který je redukován na červený formazan, způsobující charakteristické zbarvení kolonií). Vyrostlé kolonie jsou dále podrobeny konfirmačním testům (růst na žluč-eskulin azidovém agaru, katalátový test, popř. pyr-test). Stanoví se počet KTJ/1 g sušiny vzorku.

3.2.3. Zjišťování přítomnosti suspektních kolonií

Po inkubaci se počítají jako presumtivní enterokoky všechny vyrostlé kolonie, které jsou kaštanově, červenohnědě, červeně či růžově zbarvené.

Stupeň ředění je třeba volit tak, aby výsledný počet kolonií na jedné plotně byl 15 až 150 KTJ (kolonie tvořící jednotku). Za stejných podmínek se desetinasobným ředěním výchozí suspenze

inokulují další dvojice ploten. Pro každé ředění se očkují dvě plotny.

3.2.4. Konfirmace

Vybrané kolonie (alespoň 5) pro konfirmaci se přeočkují na konfirmační kultivační medium žluč-aeskulin-azidový agar a plotny se inkubují při 44°C po dobu 4 až 24 hodin. Enterokoky rostou na tomto kultivačním mediu a hydrolyzují aeskulin. Konečný produkt hydrolýzy je 6, 7dihydroxikumarin, který v kombinaci s Fe^{3+} ionty dává tříslově hnědou až černou sloučeninu, která difunduje do kultivačního media.

Další vybrané kolonie (alespoň 5) pro konfirmaci se přeočkují na živný agar a po 24 hodinové kultivaci se pro potvrzení může provést test na pyrrolidonylpeptidázovou aktivitu, která je charakteristická pro všechny druhy enterokoků. Při použití INTEST PYR TESTu se navlhčený disk s nanesenou kolonií presumtivních enterokoků inkubuje (po dobu 2 minut) při laboratorní teplotě. Potom se přidá 1 kapka barevné vývojky a při pozitivní reakci se disk zbarví růžově.

Provede se test na katalázu.

Z počtu potvrzených typických kolonií pro enterokoky se získá počet KTJ v 1g vzorku. Výsledky se vyjádří přepočtené na sušinu vzorku.

3.2.5. Kultivační půdy a činidla

VÝSTRAHA – Všechna selektivní kultivační media popsaná v této části normy obsahují azid sodný. Protože tato látka je vysoce toxická a mutagenní, musí být dodržována opatření, aby se zabránilo kontaktu s ní, především inhalací jemného aerosolu během přípravy z komerčně vyráběných dehydratovaných kompletních kultivačních medií. Kultivační media obsahující azid sodný nesmí být směřována se silnými anorganickými kyselinami, neboť může být produkován silně toxický azid vodíku (HN_3). Roztoky obsahující azid sodný mohou také tvořit explosivní sloučeniny ve styku s kovovým potrubím, například ve výlevce. Azid může být bezpečně rozložen přidávkou nasyceného roztoku dusitanu.

3.2.5.1. M – ENTEROKOKOVÝ AGAR (SLANETZ – BARTLEY)

viz ČSN ISO 7899-2 Jakost vod – Stanovení fekálních streptokoků, Část 2: Metoda membránových filtrů: 1984 nebo komerčně vyráběná půda o stejném složení

tryptose	20,0 g
kvasniční extrakt	5,0 g
glukóza	2,0 g
Hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4)	4,0 g
azid sodný (NaN_3)	0,4 g
agar	8,0 g až 18,0 g *
voda	do 1000,0 ml

*závisí na viskozitě agaru

3.2.5.2. ŽLUČ-ESKULIN-AZIDOVÝ AGAR

viz ČSN ISO 7899-2 Jakost vod – Stanovení fekálních streptokoků, Část 2: Metoda membránových filtrů: 1984 nebo komerčně vyráběná půda o stejném složení

tryptone	17,0 g
pepton	3,0 g

kvasniční extrakt	5,0 g
volská žluč dehydratovaná	10,0 g
chlorid sodný (NaCl)	5,0 g
eskulin	1,0 g

3.2.5.3. FOSFÁTOVÝ ŘEDÍCÍ ROZTOK

Složení fosfátového ředícího roztoku

dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)	34,0 g
destilovaná voda (doplnit do)	1000 ml
pH	$7,2 \pm 0,5$

Roztok chloridu hořečnatého

chlorid hořečnatý	38 g
destilovaná voda (doplnit do)	1000 ml

Příprava fosfátového roztoku

V 500 ml destilované vody se rozpustí dihydrogenfosforečnan draselný. Pak se upraví 1 ml roztoku hydroxidu sodného pH na $7,2 \pm 0,5$. Nakonec se roztok doplní na 1000 ml.

Příprava roztoku chloridu hořečnatého

V 1000 ml se rozpustí chlorid hořečnatý.

Příprava fosfátového pufru

Do 1000 ml destilované vody se přidá 1,25 ml fosfátového roztoku a 5,0 ml roztoku chloridu hořečnatého.

Před použitím se roztok plní do skleněných nádob o objemu 250 až 500 ml a sterilizuje se v autoklávu za přetlaku 0,1 MPa po dobu 15 minut. Po vychladnutí se plní po 90 ml do sterilních

reagenčních lahvíček. Při plnění je potřeba zachovat aseptické podmínky práce.

3.2.5.4 ŽIVNÝ AGAR

Složení

masový extrakt 1,0 g
pepton 1,0 g
chlorid sodný (NaCl) 5,0 g
agar 15,0 g
destilovaná voda (doplnit do) 1000 ml
pH 7,2 až 7,4

Příprava

Jednotlivé složky se postupně přidávají do vody. Zahřívají se tak dlouho, dokud se zcela nerozpustí. Hodnota pH se upraví roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol.l^{-1} přibližně na 7,2 až 7,4. Pak se kultivační prostředí povaří 10 minut, zfiltruje a znovu se upraví pH tak, aby bylo v rozmezí 7,2 až 7,4. Sterilizuje se v autoklávu za přetlaku 0,1 MPa po dobu 15 minut.

3.2.5.5. PEROXID VODÍKU

roztok 30g / 1000ml

3.2.5.6. PYR TEST

Komerčně vyráběný test na pyrrolidonylpeptidázovou aktivitu (např. I TEST PYR TEST)

3.2.6. Přístroje a pomůcky

POZNÁMKA – Pomůcky pro jedno použití, pokud mají vhodnou specifikaci, jsou přijatelnou náhradou skleněných pomůcek.

3.2.6.1. PŘÍSTROJ KE STERILIZACI HORKÝM VZDUCHEM (SUŠÁRNA) MAJÍCÍ SCHOPNOST UDRŽET TEPLITU NA 160 AŽ 180°C ± 1°C

3.2.6.2. SKŘÍŇ K SUŠENÍ NEBO SUŠÁRNA S NUCENÝM OBĚHEM VZDUCHU A S TEPLITOU UDRŽOVANOU V ROZMEZÍ 37°C ± 1°C AŽ 55°C ± 1°C

3.2.6.3. INKUBÁTOR S TEPLITOU UDRŽOVANOU NA 37°C ± 1°C

3.2.6.4. INKUBÁTOR S TEPLITOU UDRŽOVANOU NA 44°C ± 1°C

3.2.6.5. PŘÍSTROJ K MĚŘENÍ PH S PŘESNOSTÍ NA ± 0,1 JEDNOTKY PH PŘI 25°C

3.2.6.6. KULTIVAČNÍ BAŇKY NEBO LAHVE

POZNÁMKA - Lze používat baňky nebo lahve opatřené šroubovacím uzávěrem z netoxického kovu nebo plastu.

3.2.6.7. ODMĚRNÉ VÁLCE

3.2.6.8. DĚLENÉ PIPETY JMENOVITÉHO OBJEMU 10ML S DĚLENÍM A JMENOVITÉHO OBJEMU 1ML S DĚLENÍM PO 0,1ML

3.2.6.9. PETRIHO MISKY MALÉ (O PRŮMĚRU 90MM AŽ 100MM) A/NEBO VELKÉ (O PRŮMĚRU 140MM)

3.2.6.11. KOCHŮV HRNEC NA ROZEHRÁTÍ KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ

3.2.6.10. OČKOVACÍ KLIČKY ZE SLITINY PLATINY A IRIDIA NEBO ZE SLITINY NIKLU A CHRÓMU S

OČKEM O PRŮMĚRU ASI 3MM NEBO JEDNORÁZOVÉ UMĚLOHMOTNÉ

3.2.6.11. HOMOGENIZÁTOR TYPU STOMACHER, VORTEX A NEBO VRTULKOVÝ MIXÉR

3.2.6.12. AUTOKLÁV ($121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)

3.2.7. *Postup zkoušky*

Viz Příloha č. 2

3.2.7.1. ZKUŠEBNÍ VZOREK A VÝCHOZÍ SUSPENZE

K 10 g upraveného vzorku půdy přidáme 90 ml sterilního fosfátového zřed'ovacího roztoku a zhomogenizujeme pomocí vybraného homogenizátoru dobu 1 min. Necháme 5 min. ustát. Z výchozí suspenze se připraví série desetinásobného ředění ve fosfátovém roztoku (3.2.5.3.). Místo fosfátového pufru je možno použít Ringerův roztok (3.1.5.4.).

3.2.7.2. INOKULACE, INKUBACE

Pipetujeme paralelně na dvě Petriho misky s M-enterokokovým agarem (3.2.5.1.) 2 x 0,2 ml výchozí suspenze a prvního dekadického ředění, ev. dalších vždy dvou po sobě jdoucích dekadických ředění vzorku (postup dle ČSN ISO 6887 -1: Všeobecné pokyny pro přípravu výchozí suspenze a desetinásobných ředění). Rozetřeme sterilní skleněnou tyčinkou a po zaschnutí při teplotě laboratoře umístíme dnem vzhůru v termostatu. Inkubují se nejprve 4 hod při $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. a potom 20 – 44 hod při $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

3.2.7.3. VYHODNOCENÍ

Vyberou se inkubované plotny obsahující méně než 150 typických kolonií. Z každé vybrané misky se počítají všechny narostlé kolonie červeně, kaštanově nebo růžově zbarvené.

Počítají se kolonie zcela zbarvené i kolonie pouze se zbarveným středem. Předpokládá se, že jsou to presumptivní enterokoky.

Náhodně se vybere 5 kolonií pro subkultivaci a biochemickou konfirmaci. Další určování se neprovádí v případě, že více než polovina povrchu plotny je přerostlá. Je-li přerostlá méně jak polovina povrchu, spočítají se kolonie ve druhé části a extrapoluje se tak, aby počet odpovídal celému povrchu plotny.

3.2.7.4. KONFIRMACE

Výběr kolonií pro konfirmaci

Pro konfirmaci se z každé plotny vybere nejméně po pěti koloniích považovaných za typické nebo suspektní.

Subkultivace

Typické kolonie z reprezentačního vzorku se přeočkují na povrch živného agarů (viz 3.2.5.2.).

Naočkované misky se inkubují při teplotě $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ po dobu 18 až 24 hodin a z každé z inkubovaných ploten se vybere dobře izolovaná kolonie pro konfirmaci.

Potvrzující test

Typické kolonie z reprezentačního vzorku se přeočkují na povrch žluč-aeskulin-azidového agarů. Naočkované misky se inkubují při teplotě $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ po dobu 4 – 24 h. Vyhodnocují se všechny misky vykazující tříslově hnědé až černé zbarvení kolonií a/nebo kultivačního média kolem kolonií.

Katalázový test

Na kolonie narostlé na žluč-aeskulin-azidovém agarů se kápne po jedné kapce roztoku peroxidu vodíku. Tvorba bublin kyslíku

indikuje kataláza-pozitivní mikroorganismy. Za enterokoky se považují pouze kataláza-negativní kolonie.

POZNÁMKA – Na žluč-aeskulin-azidovém agaru může dojít k tvorbě falešné pozitivní katalázové reakce. Aby se tato chyba vyloučila, je třeba test zopakovat na přeočkované kultuře na neselektivním kultivačním mediu – živný agar – viz subkultivace.

Test potvrzující pyrrolidonylpeptidázovou aktivitu

POZNÁMKA – provádí se v případě, že předchozí katalázový test a potvrzující test na žluč-eskulinovém agaru nedávají jednoznačné informace. Suspektivní kolonie se přeočkují na živný agar a po 24 h. až 48 h. inkubace se podrobí testu na přítomnost pyrrolidonylpeptidázy.

Za enterokoky se považují kolonie vykazující pozitivní reakce. Kromě živného agaru č. 2 lze použít jakýkoliv agar bez interferenčních a inhibičních přísad.

Použije se komerčně vyráběný test a postupuje se dle návodu výrobce (např. INTES PYR-test)

3.2.8. Vyjádření výsledků

Obecný popis způsobu vyjadřování výsledků a stanovení počtů bakterií ve vzorku viz ISO 8199. Výsledek se uvede na 1g vzorku vztaženo na suchou hmotnost (kapitola 2. 6. tohoto postupu).

3.2.8.1. OBECNÝ PŘÍPAD

Jestliže alespoň 80 % z vybraných typických kolonií vykazuje vlastnosti typické pro enterokoky ve smyslu tohoto postupu, je počet týž, jako byl spočítán v odst. 3.2.7.3.

Ve všech ostatních případech se množství bakterií vypočítá z procentuálního podílu z celkového počtu kolonií vybraných podle 3.2.7.3.

3.2.9. Zabezpečování jakosti

Zabezpečování jakosti se provádí naplněním bodů v kapitole 2.9. tohoto postupu.

Pro kontrolu způsobilosti laboratoře prokazovat enterokoky metodou a s užitím půd popsanych v této metodě se doporučuje jako referenční materiál sbírkový kmen CCM 4224 *Enterococcus faecalis* (Česká sbírka mikroorganismů PřF MU Brno), RM Ent.faecium WR 63 (Holandsko).

3.2.1. Charakteristiky metody

Při ověřování metody v laboratořích SZÚ a mezilaboratorních ověřovacích zkouškách (MOZ) byly zjištěny následující výsledky při podmínkách daných uvedeným postupem.

Vzorky kontaminované pomocí RM

pro stanovované počty >750 KTJ na 1g kalu (>1ž 15 KTJ na miskách) byla shoda výsledků stanovení u 78,6% laboratoří

pro stanovované počty >750 KTJ na 1g kalu (>1ž 15 KTJ na miskách) byla shoda výsledků stanovení u 85% výsledků stanovených v 1 laboratoři

z 33 výsledků analýz enterokoků provedených během MOZ bylo 15% falešně negativních výsledků

z 67 analýz provedených jednou laboratoří byl jeden falešně pozitivní výsledek

hraniční hodnotu citlivosti představuje 2000 KTJ v 10g kalu (200 KTJ v 1g) pro 100% zúčastněných laboratoří

speciální studie opakovatelnosti v jedné laboratoři se dvěma laborant-kami pro 15000 KTJ v 10g kalu (>15 KTJ na miskách, 1500 KTJ v 1g kalu) poskytla jako míru opakovatelnosti (vyjádřenou směrodatnou odchylkou přirozených logaritmů původních hodnot) hodnotu 0,795 nebo vyjádřenou jako $\exp(0,795) = 2,2$.

Vzorky přirozeně kontaminované

Ověření bylo provedeno 15 laboratořemi pro dva různé kaly. Míra reprodukovatelnosti metody (vyjádřená směrodatnou odchylkou přirozených logaritmů původních hodnot) poskytla hodnotu 2,13 nebo vyjádřenou jako $\exp(2,13) = 8,4$.

3.3. Detekce salmonel

3.3.1. Termíny a definice

Účelem tohoto postupu je poskytnout pokyny pro detekci bakterií rodu *Salmonella sp.*. Při zkoušení provedeném podle této metody je to určení přítomnosti nebo nepřítomnosti těchto mikroorganismů v konkrétním vzorku kalů z ČOV.

Tento postup platí pro kvalitativní stanovení bakterií rodu *Salmonella sp.* v odvodněných hygienizovaných kalech z ČOV. Při analýze je třeba dodržet všeobecná ustanovení pro mikrobiologická zkoušení včetně zásad přepravy vzorku.

Pro účely tohoto zkoušení jsou bakterie rodu *Salmonella sp.* mikroorganismy, které vytvářejí na tuhých selektivních půdách typické kolonie a které vykazují popsané biochemické a sérologické vlastnosti.

3.3.2. Podstata zkoušky

Průkaz bakterií rodu *Salmonella sp.* vyžaduje čtyři po sobě následující stupně.

POZNÁMKA - Bakterií rodu *Salmonella sp.* mohou být přítomny v nízkých počtech a jsou často provázeny značně vyššími počty jiných příslušníků čeledi Enterobacteriaceae nebo příslušníků jiných čeledí. Proto je nezbytné selektivní pomnožení; kromě toho je nezbytné předpomnožení, které umožňuje průkaz často subletálně poškozených bakterií rodu *Salmonella sp.*.

3.3.2.1. PŘEDPOMNOŽENÍ V NESELEKTIVNÍ TEKUTÉ PŮDĚ

Do tlumivé peptonové vody (užitá rovněž jako ředící roztok) se inokuluje zkušební vzorek a inkubuje se při 37°C po dobu 16 hod až 20 hod.

3.3.2.2. PŘEDPOMNOŽENÍ V SELEKTIVNÍCH TEKUTÝCH PŮDÁCH

Kultura získaná podle 3.3.2.1. se inokuluje do dvou tekutých půd, a to do půdy podle Rappaporta a Vassiliadise s chloridem hořečnatým a malachitovou zelení a do půdy se seleničitanem a cystinem.

Půda podle Rappaporta a Vassiliadise s chloridem hořečnatým a malachitovou zelení se inkubuje při 41,5°C po dobu 24 h a po dalších 24 h, půda se seleničitanem a cystinem se inkubuje při 37°C po dobu 24 h a dalších 24 h.

3.3.2.3. VYOČKOVÁNÍ NA PEVNÉ PŮDY A ZJIŠŤOVÁNÍ PŘÍTOMNOSTI SUSPEKTNÍCH KOLONIÍ

Každá z kultur získaných podle 3.3.2.3. se vyočkuje na dvě pevné selektivní půdy:

- agar s fenolovou červení a brilantovou zelení
- xyloso-lysin-deoxycholátový agar

Inkubuje se při 37°C a po 24 h, a pokud je to nutné, rovněž po 48 h, se zjišťuje přítomnost kolonií, které jsou na základě svých znaků považovány za suspektní kolonie bakterií rodu *Salmonella sp.*

3.3.2.4. KONFIRMACE

Suspektní kolonie bakterií rodu *Salmonella sp.* získané vyočkováním, jak je popsáno v 3.3.2.3. se subkultivují a potvrzují pomocí vhodných biochemických a sérologických testů.

3.3.3. Kultivační půdy a činidla

3.3.3.1. PŮDA SE SELENIČITANEM A CYSTINEM

ZÁKLAD PŮDY

Složení

trypton	5,0g
laktóza	4,0g
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	10,0g
Hydrogenseleničitan sodný (NaHSeO ₃)	4,0g
Voda	900ml

Příprava

První tři složky základu se rozpustí ve vodě za varu po dobu 5 min. Po ochlazení se přidá hydrogenseleničitan sodný.

Pokud je třeba, upraví se pH tak, aby jeho hodnota činila 7,0.

Roztok L-cystinu

Složení

L-cystin	0,1g
roztok hydroxidu sodného c(NaOH) = 1 mol/l	15ml
sterilní voda do konečného objemu	100ml

Příprava

Složky se vnesou do sterilní odměrné baňky.

Doplň se voda do 100ml.

Roztok se nesterilizuje.

Roztok kvasničného extraktu

Složení

kvasničný extrakt ve formě prášku	1,5g
sterilní voda	100ml

Příprava

Kvasničný extrakt se vnese do sterilní odměrné baňky a doplní se do 100ml vodou.

Sterilizuje se v autoklávu (6.1) při 121°C po dobu 15 minut.

Kompletní půda

Složení

základ	900ml
roztok L-cystinu	10ml
roztok kvas. extraktu	100ml

Příprava

Základ půdy a roztok kvasničného extraktu se ochladí, asepticky spojí a nakonec se asepticky přidá roztok L-cystinu.

Pokud je třeba, upraví se pH tak, aby jeho hodnota činila 7,0.

Půda se asepticky rozplní do sterilních baněk vhodného objemu tak, aby se získaly jednotlivé dávky potřebné pro zkoušení.

Půda se použije v den přípravy.

3.3.3.2. XYLÓZO-LYSIN-DEOXYCHOLÁTOVÝ AGAR

Základní roztok

Složení

D(+)-xylóza	3,5g
L(+)-Lyzin	5,0g
deoxycholát sodný	2,5g
kvasničný extrakt	3,0g
sacharóza	7,5g
laktóza	7,5g
chlorid sodný (NaCl)	5,0g
thiosíran sodný (Na ₂ S ₂ O ₃)	6,8g
citrát železitý	0,8g
agar	13g
voda	do 1000ml

Roztok fenolové červeně

Složení

fenolová červeně	0,4g
voda	do 100ml

Příprava

Fenolová červeně se za občasného míchání rozpustí v daném objemu vody.

Kompletní půda

Příprava

Veškeré složky základního roztoku se rozpustí v 1l vody, přidá se 20ml roztoku fenolové červeně a za občasného míchání se přivede k varu. Po ochlazení na 50°C se médium rozlije do Petriho misek.

Neautoklávuje se.

V případě potřeby se pH upraví na $7,4 \pm 0,1$.

3.3.3.3. PŮDA PRO NESELEKTIVNÍ PŘEDMNOŽENÍ: TLUMIVÁ PEPTONOVÁ VODA

Složení

pepton	10,0 g
chlorid sodný	5,0 g
hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	9,0 g
dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
voda	1000 ml

Příprava

Složky se rozpustí ve vodě, a je-li třeba, zahřejí se. Pokud je třeba, upraví se pH tak, aby se po sterilizaci jeho hodnota činila 7,0. Půda se rozplní do baněk vhodného objemu tak, aby se získaly jednotlivé dávky potřebné pro zkoušení. Sterilizuje se v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut.

3.3.3.4. PŮDA S CHLORIDEM HOŘEČNATÝM A MALACHITOVOU ZELENÍ PODLE RAPPAPORTA A VASSILIADISE (DÁLE PŮDA RV)

Roztok A

Složení

trypton nebo sójový pepton	4,5 g
chlorid sodný	8,0 g
dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	1,6 g
voda	1000 ml

Příprava

Složky se rozpustí ve vodě za záhřevu asi na 70°C. Roztok se připravuje v den přípravy půdy RV.

Roztok B

Složení

chlorid hořečnatý hexahydrát (MgCl ₂ .6H ₂ O)	400,0 g
voda	1000 ml

Příprava

Chlorid hořečnatý se rozpustí ve vodě. Vzhledem k tomu, že tato sloučenina je velmi hygroskopická, doporučuje se rozpustit celý obsah chloridu hořečnatého z nově otevřeného balení, a to podle výše uvedeného poměru. Například ke 250 g chloridu hořečnatého se přidá 625 ml vody, což poskytne roztok o celkovém objemu 795 ml a o koncentraci asi 31,5 g (MgCl₂.6H₂O) na 100 ml. Roztok se uchovává v lahvi z hnědého skla při pokojové teplotě.

Roztok C

Složení

šřavelan malachitové zeleně	0,4 g
voda	100 ml

Příprava

Šřavelan malachitové zeleně se rozpustí ve vodě a roztok se uchovává v zásobní láhvi z hnědého skla při pokojové teplotě.

Kompletní půda

Složení

roztok A	1000 ml
roztok B	100 ml
roztok C	10 ml

Příprava

K 1000 ml roztoku A se přidá 100 ml roztoku B a 10 ml roztoku C, pH se upraví tak, aby po sterilizaci jeho hodnota byla 5,2.

Půda se rozplní do zkumavek po 10 ml. Sterilizuje se v autoklávu při 115°C po dobu 15 minut. Půda se uchovává v lednici.

3.3.3.5. FYZIOLOGICKÝ ROZTOK

Složení

chlorid sodný	8,5 g
Voda	1000 ml

Příprava

Chlorid sodný se rozpustí ve vodě, je-li třeba, za záhřevu. V případě potřeby se pH upraví tak, aby jeho hodnota po sterilizaci činila 7,0. Roztok se rozplní do baněk tak, aby po sterilizaci byl jeho objem 90-100 ml. Sterilizuje se v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut.

3.3.3.6. AGAR S FENOLOVOU ČERVENÍ A BRILANTOVOU ZELENÍ (PODLE EDELA A KAMPELMACHERA)

Základ půdy

Složení

masový extrakt ve formě prášku	5,0 g
pepton	10,0 g
kvasničný extrakt ve formě prášku	3,0 g
hydrogenfosforečnan disodný (Na ₂ HPO ₄)	1,0 g
dihydrogen fosforečnan sodný (NaH ₂ PO ₄)	0,6 g
agar	12 g – 18 g *
voda	900 ml

* v závislosti na ztužovací schopnosti agaru

Příprava

Dehydratované složky základu nebo kompletní dehydratovaný základ půdy se rozpustí ve vodě, a je-li třeba, za záhřevu. Po sterilizaci je hodnota pH 7,0. Základ půdy se rozplní do zkumavek nebo baněk vhodného objemu. Sterilizuje se v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut.

Roztok laktózy, sacharózy a fenolové červeně

Složení

laktóza	10,0 g
sacharóza	10,0 g
fenolová červeně	0,09 g
voda do konečného objemu	100 ml

Příprava

Složky se vnesou do 50 ml vody v odměrné baňce a doplní se vodou na 100 ml. Po dobu 20 minut se roztok zahřívá na vodní lázni při 70°C. Potom se ochladí na 55°C +/- 1°C a bezprostředně poté se použije.

Roztok brilantové zeleně (podle Edela a Kampelmachera)

Složení

brilantová zeleň	asi 0,5 g
voda	100 ml

Příprava

Brilantová zeleň se přidá do vody a ponechá se 1 den v temnu, aby mohlo dojít k autosterilizaci.

Kompletní půda

Složení

základ	900 ml
roztok laktózy, sacharózy a fenolové červeně	100 ml
roztok brilantové zeleně	1 ml

Příprava

Za aseptických podmínek se roztok brilantové zeleně přidává k roztoku laktózy, sacharózy a fenolové červeně ochlazenému na 55°C +/- 1°C. Tento roztok se přidá k základu půdy ochlazenému na 50°C-55°C.

Příprava agarových ploten

Do každé z přiměřeného počtu velkých Petriho misek se dá asi 40 ml čerstvě připravené půdy. Půda se nechá ztuhnout. Bezprostředně před použitím se agarové plotny předsouší v sušárně se sejmutým víčkem a povrchem agarové vrstvy dolů při teplotě 37°C – 55°C. Pokud jsou plotny připravovány předem, uchovávají se předem nevysušené nejméně 4 hodiny při pokojové teplotě nebo alespoň jeden den v chladničce. Specifikace briliantové zeleně se provede dle ČSN-EN 12824 příloha C normy.

3.3.3.7. ŽIVNÝ AGAR

Složení

masový extrakt	3,0 g
Pepton	5,0 g
Agar	12 g – 18 g *
Voda	1000 ml

* v závislosti na ztužovací schopnosti agaru

Příprava

Dehydratované složky základu nebo kompletní dehydratovaný základ půdy se rozpustí ve vodě, a je-li třeba, za záhřevu. Po sterilizaci se hodnota pH upraví na pH 7,0. Základ půdy se rozplní do zkumavek nebo baněk vhodného objemu. Sterilizuje se v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut.

Příprava ploten živného agaru

15 ml rozehřáté půdy se dá do malých Petriho misek a dále se postupuje jako v bodě 3.3.3.6.

3.3.3.8. AGAR S GLUKÓZOU, LAKTÓZOU, SACHARÓZOU A CITRANEM ŽELEZITÝM (TSI AGAR)

masový extrakt	3,0 g
kvasničný extrakt	3,0 g
pepton	20,0 g
chlorid sodný	5,0 g
laktóza	10,0 g
sacharóza	10,0 g
glukóza	1,0 g
citran železitý	0,3 g
thiosulfát sodný (Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O)	0,3 g
fenolová červeň	0,024 g
agar	12,0 g – 18,0 g *
voda	1000 ml

* v závislosti na ztužovací schopnosti agaru

Příprava

Složky půdy nebo dehydratovaná kompletní půda se rozpustí ve vodě, a je-li třeba, za zahřevu. Hodnota pH se upraví tak, aby po sterilizaci byla 7,4. Půda se rozplní do zkumavek po 10 ml a sterilizuje se v autoklávu při 121°C po dobu 10 minut. Ponechá se utuhnout v šikmé poloze tak, aby hloubka svíslé části činila 2,5 cm.

3.3.3.9. Činidla pro biochemické a sérologické konfirmace

Pro průkaz biochemických a sérologických konfirmací se použijí komerčně vyráběná činidla a postupuje se podle návodu výrobce nebo se postupuje podle ČSN EN 12824 : 1999 Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu bakterií rodu *Salmonella*, kapitola 5.0 a 9.5.2. až 9.5.5.

Pro průkaz biochemických vlastností se osvědčily řady Enterotestů od firmy Lachema nebo API od firmy BioMerieu, lze použít i jiné komerčně vyráběné vyhovující kvality.

Komerčně je dostupná řada typů aglutinačních sér obsahujících protilátky vůči jednomu nebo několika O-antigenům, např. antiséra obsahující jednu nebo více „O“ skupin (označují se jako monovalentní nebo polyvalentní anti-O séra), dále anti-Vi séra a antiséra obsahující protilátky vůči jednomu nebo několika H-faktorům (označují se jako monovalentní nebo polyvalentní anti-H séra).

Je třeba všemožně se pokusit zajistit, aby užitá antiséra byla dostačující pro detekci všech sérovarů bakterií rodu *Salmonella* sp. Doporučuje se k tomuto účelu používat antiséra připravená dodavatelem, který je uznáván jako kompetentní.

3.3.4. Přístroje a pomůcky

POZNÁMKA - Pomůcky pro jedno použití, pokud mají vhodnou specifikaci, jsou přijatelnou náhradou pomůcek skleněných.

Obvyklé vybavení mikrobiologické laboratoře a zvláště:

3.3.4.1. PŘÍSTROJ KE STERILIZACI HORKÝM VZDUCHEM (SUŠÁRNA)

3.3.4.2. SKŘÍŇ K SUŠENÍ NEBO SUŠÁRNA

S nuceným oběhem vzduchu a s teplotou udržovanou v rozmezí $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ až $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.3.4.3. INKUBÁTOR S TEPLOTOU UDRŽOVANOU NA $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

3.3.4.4. INKUBÁTOR S TEPLOTOU UDRŽOVANOU NA $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

3.3.4.5. OČKOVACÍ KLIČKY ZE SLITINY PLATINY A IRIDIA NEBO ZE SLITINY NIKLU A CHRÓMU S OČKEM O PRŮMĚRU ASI 3 MM

3.3.4.6. PŘÍSTROJ K MĚŘENÍ PH S PŘESNOSTÍ NA $\pm 0,1$ JEDNOTKY PH PŘI 25°C

3.3.4.7. KULTIVAČNÍ BAŇKY NEBO LAHVE

POZNÁMKA - Lze používat baňky nebo lahve opatřené šroubovacím uzávěrem z netoxického kovu nebo plastu.

3.3.4.8. ZKUMAVKY

3.3.4.9. ODMĚRNÉ VÁLCE

3.3.4.10. DĚLENÉ PIPETY JMENOVITÉHO OBJEMU 10ML S DĚLENÍM A JMENOVITÉHO OBJEMU 1 ML S DĚLENÍM PO 0,1 ML

3.3.4.11. PETRIHO MISKY MALÉ (O PRŮMĚRU 90 MM AŽ 100 MM) A/NEBO VELKÉ (O PRŮMĚRU 140 MM)

3.3.4.12. HOMOGENIZÁTOR TYPU VORTEX

3.3.4.13. AUTOKLÁV

3.3.5. Postup zkoušky

Viz Příloha č. 3

3.3.5.1. ZKUŠEBNÍ VZOREK A VÝCHOZÍ SUSPENZE

Pro přípravu výchozí suspenze se jako ředící roztok použije půda pro neselektivní předpomnožení (tlumivá peptonová půda) specifikovaná v 3.3.3.3.

Výchozí suspenze se připraví tak, že se 50g zkušební vzorku přidá do 450ml půdy pro neselektivní předpomnožení (3.3.3.3), což je poměr zkušební vzorku k půdě pro neselektivní předpomnožení specifikovaný tímto postupem.

3.3.5.2. NESELEKTIVNÍ PŘEDPOMNOŽENÍ

Výchozí suspenze se inkubuje při 37°C po dobu ne méně než 16 h a ne více než 20 h.

3.3.5.3. SELEKTIVNÍ POMNOŽENÍ

0,1ml kultury získané podle 3.3.5.2. se přenese do zkumavky obsahující 10ml půdy RV (3.3.3.4.) a inkubuje se při 41,5 +/- 0,5°C po dobu 24h (dalších 24h - viz poznámka k čl. 3.3.2),

10ml kultury získané podle 9.2 se přenese do baňky obsahující 100ml půdy se seleničitanem a cystinem (3.3.3.1.) a inkubuje se při 37 +/- 0,5°C po dobu 24 h (dalších 24 h).

3.3.5.4. VYOČKOVÁNÍ A IDENTIFIKACE

a) Kultura získaná v půdě RV po inkubaci 24h (a je-li třeba, ještě dalších 24h) se inokuluje kličkou na povrch první selektivní půdy pro vyočkování - agar s fenolovou červení a brilantovou zelení viz 3.3.3.6) a druhé - xyloso-lysin-deoxycholátový agar (3.3.3.2.) vylité do velkých Petriho misek, a to tak, aby se získaly dobře izolované kolonie.

Pokud nejsou velké Petriho misky k dispozici, užije se půda vždy ve dvou malých miskách a očkuje se nejprve jedna a poté druhá malá miska touž kličkou (viz poznámka).

b) Stejně se postupuje s kulturou získanou z druhé selektivní pomnožovací půdy se seleničitanem a cysteinem. Při očkování na povrch z druhé selektivní pomnožovací půdy se použije jiná sterilní klička a počet Petriho misek se užije tak, jak to odpovídá jejich velikosti.

POZNÁMKA - Pro rozočkování čarami na selektivní pevné půdy (agar s fenolovou červení a brilantovou zelení a xyloso-lysin-deoxycholátový agar) se doporučuje následující způsob: použije se jedna klička pro dvě misky. Odebere se kapka tekuté půdy z její hladiny při okraji nádoby. Inokulují se obě misky podle schémat postupu zkoušky. Využije se celá plocha misky. Čáry vedené kličkou mají být navzájem vzdáleny asi 0,5cm. (Klička se neopaluje, ani se do ní znovu nenabírá, a to ani po provedení první čáry, ani při přechodu na druhou misku.) Je-li užita pouze jedna velká miska, je třeba pro rozočkování čarami použít způsob uvedený pro první misku.

Interpretace výsledků

S kulturami získanými v selektivních pomnožovacích půdách se po inkubaci dalších 24h výše uvedený postup pro očkovaní s použitím opět dvou selektivních pevných půd opakuje.

Misky se obrátí dnem vzhůru a umístí do inkubátoru s teplotou udržovanou na $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ - pro misky očkované ze seleničitanové půdy a na $41,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ - misky z půdy RV.

3.3.5.5. VYHODNOCENÍ

Po inkubaci po dobu 20h až 24h se na plotnách zjišťuje přítomnost typických kolonií bakterií rodu *Salmonella sp.* Růst typických kolonií bakterií rodu *Salmonella sp.* na půdě s fenolovou červení a briliantovou zelení působí změnu barvy půdy z růžové na červenou. Na půdě xyloso-lysin-deoxycholátovém agarů v případě pozitivního nálezu vyrostou červenočerné až černé kolonie.

Je-li růst pouze slabý nebo nejsou-li typické kolonie bakterií rodu *Salmonella sp.* přítomny, inkubují se plotny znovu při příslušné teplotě po dobu dalších 18h až 24h. Na plotnách se opakovaně zjišťuje přítomnost typických kolonií bakterií rodu *Salmonella sp.*.

POZNÁMKA - Je nezbytné podrobit každou typickou nebo suspektní kolonii konfirmaci; rozpoznání kolonií bakterií rodu *Salmonella sp.* je ve velké míře věcí zkušenosti, vzhled kolonií může být poněkud pozměněn, a to nejen pokud jde o vzájemně různé sérovary, ale rovněž pokud jde o vzájemně různé výrobní dávky půdy. S ohledem na to může v této fázi zkoušení usnadnit rozpoznání suspektních kolonií aglutinace s polyvalentním salmonelovým antisérem.

3.3.5.6. KONFIRMACE

Výběr kolonií pro confirmaci

Pro confirmaci se z každé plotny každé selektivní půdy (viz 3.3.5.3 a 3.3.5.4) vybere nejméně po pěti koloniích považovaných za typické nebo suspektní. Pokud je na jedné plotně méně typických nebo suspektních kolonií než pět, vyberou se pro confirmaci všechny typické nebo suspektní kolonie. Každá z vybraných kolonií se rozočkuje na povrch ploten předsušeného živného agaru (3.3.3.) tak, aby se umožnil vývoj dobře izolovaných kolonií.

Inokulované plotny se inkubují při 37 +/-0,5°C po dobu 18h až 24h. Pro biochemickou a sérologickou confirmaci se užijí čisté kultury.

Biochemická confirmace

Použijí se identifikační sady běžně komerčně dostupné, které umožňující identifikaci bakterií rodu *Salmonella sp.* a postupuje se podle návodu výrobce nebo se postupuje se podle ČSN-EN 12824:1999 Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu bakterií rodu *Salmonella*, kapitola 5.0 a 9.5.2. až 9.5.5.

Sérologická confirmace a sérotypizace

Před vlastní typizací je třeba vyloučit spontánně aglutinující kmeny.

Použijí se identifikační sady běžně komerčně dostupné, které umožňující sérotypizaci bakterií rodu *Salmonella sp.* a postupuje se podle návodu výrobce nebo se postupuje podle ČSN-EN 12824:1999 Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu bakterií rodu *Salmonella*, kapitola 5.0 a 9.5.2. až 9.5.5.

Vyloučení spontánně aglutinujících kmenů

Na pečlivě očištěné podložní sklo se nanese kapka fyziologického roztoku, kam se kličkou vnese část kolonie určené ke zkoušení. Dobře se rozptýlí tak, aby se dostala homogenní směs. Sklem se zvolna pohybuje kývavými pohyby asi 30 až 60 sekund. Proti tmavému pozadí se zjišťuje, zda dochází k tvorbě vloček. V případě, že výskyt vloček je pozitivní, není možné kmeny podrobit dalšímu vyšetření na průkaz antigenů.

Interpretace biochemických a sérologických reakcí

Postupuje se podle ČSN-EN 12824:1999 Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu bakterií rodu *Salmonella*,
(kapitola 9.5.2 a 9.5.3)

Konečná konfirmace

Pokud je třeba, kmény považované za příslušné do rodu *Salmonella* a kmény, které mohou být příslušné rodu *Salmonella*, mohou být zaslány do NRL pro hygienu půdy a odpadu a předány do NRL pro bakterií rodu *Salmonella* ke konečné typizaci.

Zásilka musí být doprovázena všemi dostupnými informacemi týkajícími se kmene (kmenů).

3.3.6. Vyjádření výsledků

Výsledek se uvede jako negativní nebo pozitivní detekce salmonel v 50g matrice.

3.3.7. Zabezpečování jakosti

Zabezpečování jakosti se provádí naplněním bodů v kapitole 2. 9. tohoto metodického postupu.

Pro kontrolu způsobilosti laboratoře prokazovat metodou detekce salmonel s užitím kultivačních půd popsanych v této metodě se jako referenční materiál doporučuje

sbírkový kmen CCM *Salmonella enterica ser. enteritis* 4420 (Česká sbírka mikroorganismů PřF MU Brno)

RM *Salmonella panama* 5 ALM 41 (Holandsko).

3.3.8. Charakteristiky metody

Při ověřování metody v laboratořích SZÚ a mezilaboratorních ověřovacích zkouškách (MOZ) byly zjištěny následující výsledky při podmínkách daných uvedeným postupem.

- výsledky detekce salmonel získané testovaným postupem jsou ovlivňovány mohutností kontaminace termotolerantních koliformních bakterií a enterokoků
- pro stanovení salmonel v kalech je třeba jako první stupeň metody použít neselektivní pomnožení
- obě používané selektivní pomnožovací půdy nevykazovaly podstatný vliv na pravděpodobnost nálezu salmonel v závislosti na počátečním množství salmonel v kalu (přídavek salmonel), ale lze předpokládat, že seleničitanová vykazuje menší citlivost
- stejnou citlivost pro detekci salmonel na pevných selektivních půdách prokázaly půdy BGA a XLD, půda DC vykazovala menší četnosti záchytů
- 50 KJT salmonel v 50g kalu detekovalo 100% zúčastněných laboratoří pro kal s kontaminací termotolerantními koliformními

bakteriemi a enterokoky, tuto hodnotu lze považovat za mezní hodnotu stanovitelnosti za podmínek uvedené metodiky

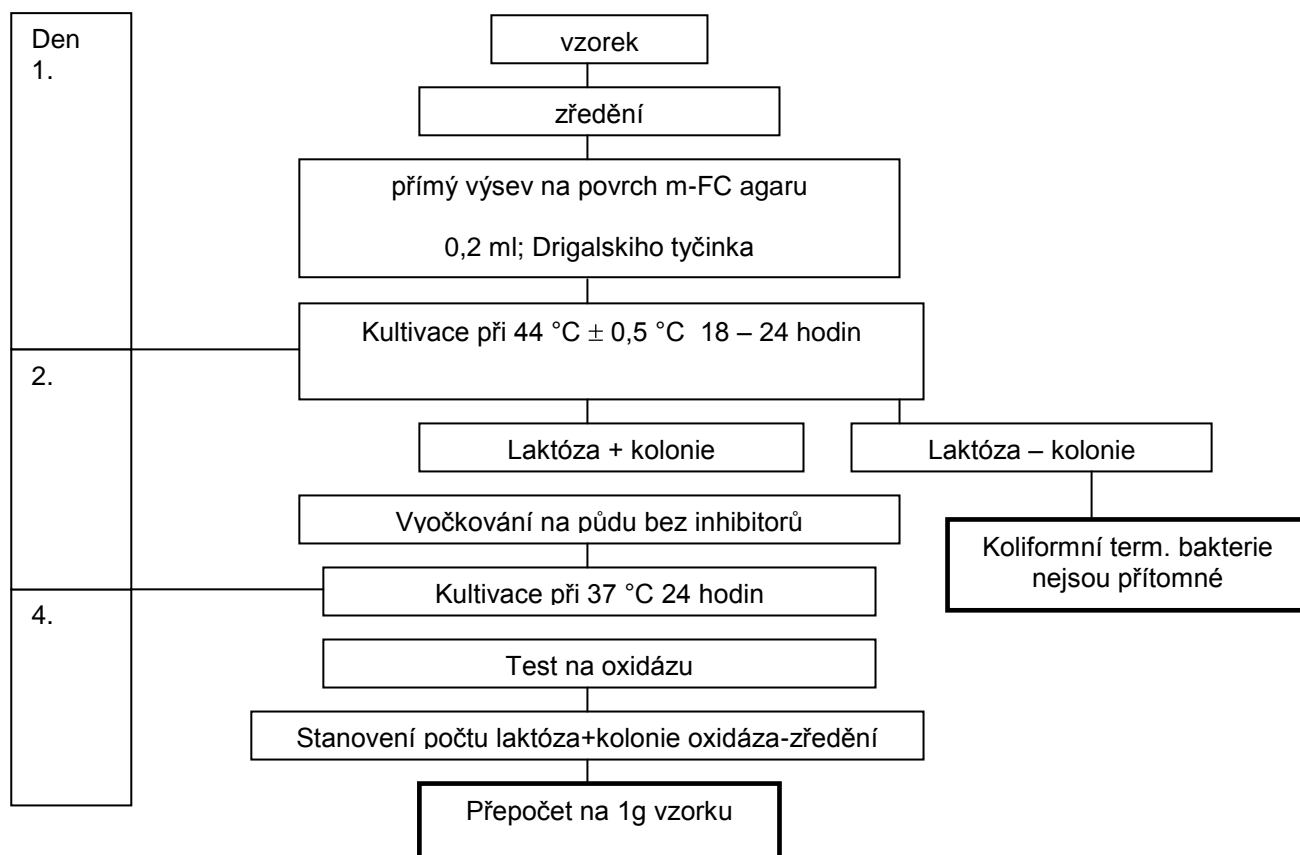
- 40 KTJ salmonel na 50g kalu detekovalo 66,7% laboratoří pro kontaminovaný kal termotolerantními koliformními bakteriemi a enterokoky

- 5 KTJ salmonel v 50g kalu detekovalo 89,3% laboratoří pro nekontaminovaný kal termotolerantními koliformními bakteriemi a enterokoky

- pro kal kontaminovaný víc než 10^3 KTJ enterokoky a termotolerantními koliformními bakteriemi klesá četnost pozitivní detekce salmonel na 40%.

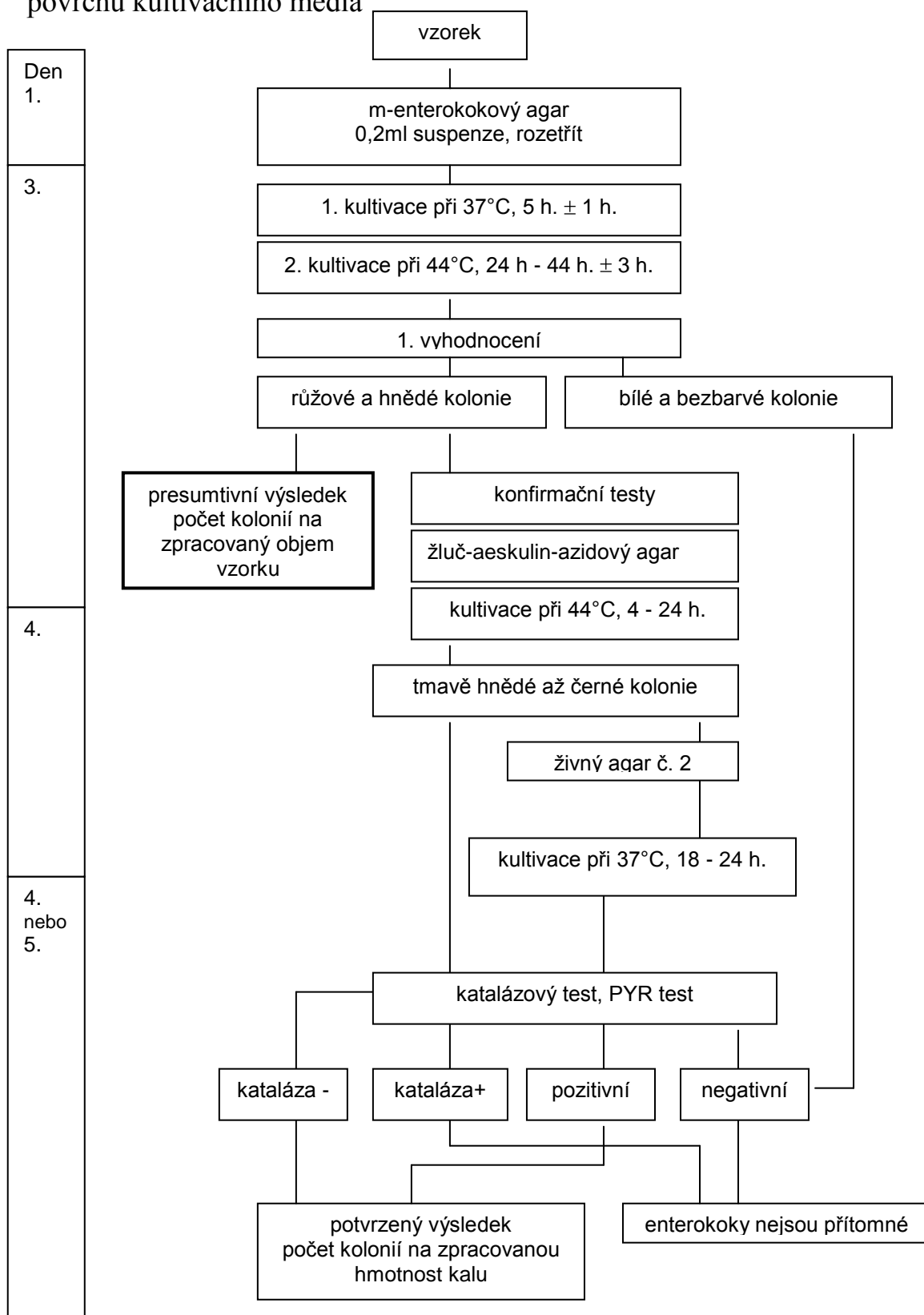
Příloha č. 1

Schéma stanovení termotolerantních koliformních bakterií metodou přímého výsevu na povrchu kultivačního média "m-FC agar"



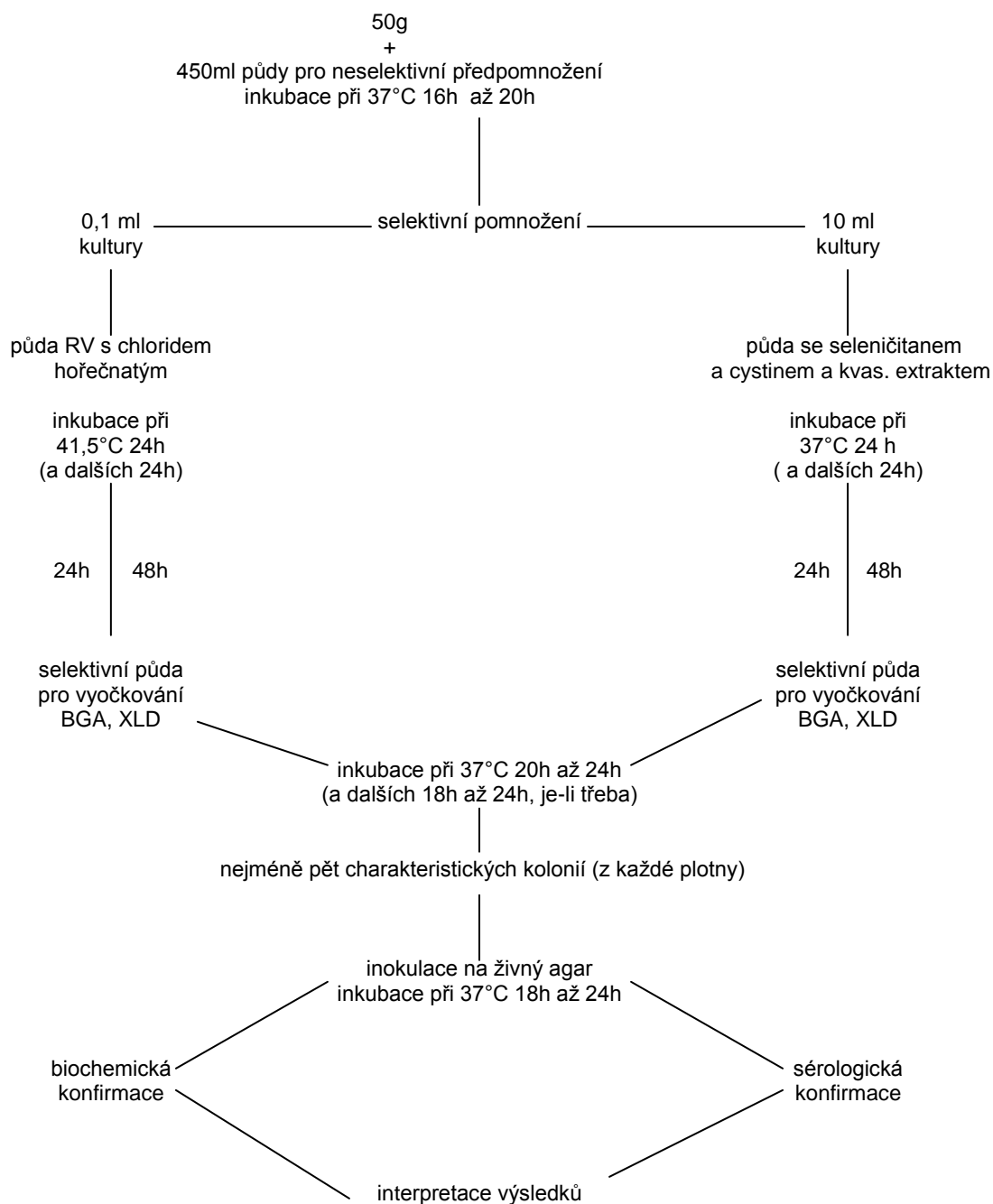
Příloha č. 2

Schéma stanovení enterokoků metodou přímého výsevu na povrchu kultivačního média



Příloha č. 3

Schéma postupu zkoušky detekce salmonel v kalech



PŘÍLOHA Č. 4 K VYHLÁŠCE Č. 382/2001 Sb.

**MIKROBIOLOGICKÁ KRITÉRIA PRO POUŽITÍ KALŮ
NA ZEMĚDĚLSKÉ PŮDĚ**

Kategorie kalů	Přípustné množství mikroorganismů (KTJ*) v 1 gramu sušiny aplikovaných kalů		
	termotolerantní koliformní bakterie	enterokoky	<i>Salmonella sp.</i>
I.	$< 10^3$	$< 10^3$	negativní nález
II.	$10^3 - 10^6$	$10^3 - 10^6$	nestanovuje se

* KTJ- kolonie tvořící jednotku

Vysvětlivky:

Kategorie I - kaly, které je možno obecně aplikovat na půdy využívané v zemědělství při dodržení ostatních ustanovení této vyhlášky.

Kategorie II – kaly, které je možno aplikovat na zemědělské půdy určené k pěstování technických plodin, a na půdy, na kterých se nejméně 3 roky po použití čistírenských kalů nebude pěstovat polní zelenina a intenzivně plodící ovocná výsadba, a při dodržení zásad ochrany zdraví při práci a ostatních ustanovení vyhlášky.

Ročník 2001

1/2001 Současné poznatky o první pomoci při expozici chemickým látkám a při kontaminaci těmito látkami. Autor: Daniela Pelclová, Klinika nem. z povol. VFN a 1. LF UK Praha 2.

2/2001 Seznam dezinfekčních, dezinfekčních a deratizačních přípravků, sterilizačních přístrojů a pomůcek a přípravků pro dezinfekci vody schválených HH ČR k 1. 1. 2001. Autoři: kol. aut. - SZÚ-CEM.

3/2001 Metodické doporučení SZÚ pro hodnocení škodlivých a nežádoucích látek uvolňujících se z vybraných skupin výrobků pro stavby do vody a půdy. Autor: Magdalena Zimová, Jarmila Preslová, SZÚ - CHŽP.

4/2001 Ochrana zdraví v českých technických normách (7. pokračování). Autor: Alexandr Fuchs, Eva Navrkalová - SZÚ - HPNP.

5/2001 Cestovní zprávy pracovníků SZÚ za rok 2000. Kol. pracovníků SZÚ. (Určeno pro hygienickou službu a int. potřebu).

6/2001 Výroční zpráva o mykobakteriologické diagnostice v ČR a SR v roce 2000. Kol. autorů SZÚ-CEM, KHS Ostrava, NÚTaRCH Bratislava.

7/2001 - Stanovení indikátorových mikroorganismů pro mikrobiologická kritéria pro použití kalů na zemědělské půdě ve smyslu vyhlášky č. 382/2001 Sb., o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě. Autor Ing.Matějů-SZÚ-CZŽP.

8/2001 Ochrana zdraví v českých technických normách (8. pokr.). Autor: A. Fuchs, E.Navrkalová, SZÚ - HPNP.

Mimořádné č. AHM: Personální bibliografie pracovníků SZÚ 1999-2000 (NIPH Bibliography).

Sdělení odběratelům

Na níže uvedených internetových stránkách SZÚ najdete kromě jiných informací seznamy jednotlivých titulů Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica vydaných od roku 1971 a dále jejich plná znění od roku 2001.

Internetová adresa: www.szu.cz/svi/ahem.html

Aktualizace adresy odběratelů

Vaše původní adresa se nalézá na obálce zásilky, kterou jste právě obdrželi. Pokud si ji přejete upřesnit, popř. změnit, sdělte Vaši novou adresu e-mailem, písemně nebo telefonicky. Toto opatření zamezí případným reklamám odběru. Naše spojení je uvedeno v tiráži každého čísla tohoto periodika.