

**Hodnocení výsledků
PT/V/3/2022
a
Novinky v mikrobiologii vody**

RNDr. Dana Baudišová, Ph.D.
Státní zdravotní ústav
23.6.2022 Praha

Program

- Příprava a hodnocení PT#V/3/2022

Novinky v mikrobiologii vody

- Transpozice nové směrnice EU o pitné vodě, *Legionella*
- Nové normy
- R2A agar /TBX, shift i na pseudomonády?

Příprava PT #V/3/2022

Vzorek A – organotrofní mikroorganismy

- Počty kolonií při 36°C a 22°C
- V loňském pramen Václavka, Praha 4 – letos nešlo a další se ukázaly jako ne úplně vhodné
- TUV SZÚ ... nízké počty/velký počet laboratoří 😊

2022			PK 22	PK 36
			KTJ/ml	KTJ/ml
21.3.	TUV	SZÚ	50	36
21.3.	TUV	Jahodová	61	36
21.3.	studánka	Chitussiho	22	8
30.3.	TUV	SZÚ	128	178
30.3.	TUV	Jahodová	4	50
30.3.	studánka	Chitussiho	45	1

Vzorek B a C

– indikátory fekálního znečištění

- Povrchová voda o různém stupni fekálního znečištění (Vltava Podbaba, Vltava Sedlec). Významné změny fekálního znečištění v týdnu před PT
- Problém současného stanovení koliformních bakterií a *E. coli* (dostatek *E. coli*, přerostlé filtry). Vhodnost přepočtu na 10 ml? Změny v rozložení ukazatelů?



Vzorek D a E (potenciální patogeny)

- **Vzorek D** – uměle připravený vzorek. Bakteriální kmeny (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* izolované v rámci řešení výzkumných projektů a ověřené metodou MALDI TOF) byly 24 hodin při $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ kultivovány na neselektivním médiu (tryptózový agar s kvasničným extraktem). Poté byla na základě opakovaného testování připravena suspenze o vhodné denzitě. Příslušný objem této suspenze byl dále přidán do 5 litrů odstáté pitné vody (předem otestované na obsah volného chlóru a počet kolonií při 22°C a 36°C) ve sterilní nádobě a vše bylo důkladně zhomogenizováno a za stálého míchání ihned rozplněno.
- **Vzorek E** – Přirozený vzorek teplé vody. V březnu 2021 bylo provedeno o ověření potenciálního zdroje vody, což je teplá užitková voda (SZÚ, místnost 111). Vzorek byl odebrán po dvouminutovém odtočení do sterilní 10 litrové nádoby. Po zchlazení na laboratorní teplotu byla ověřena absence volného chloru a vzorek byl zhomogenizován a za stálého míchání ihned rozplněn.

PT - #V/3/2022 - vyhodnocení

- Pro stanovení vztažných hodnot u ukazatelů použity výsledky všech zúčastněných laboratoří. Vztažná hodnota byla vypočítána jako robustní průměr z výsledků všech zúčastněných laboratoří.
- Hodnota cílové směrodatné odchylky (σ) byla stanovena jako robustní směrodatná odchylka souboru výsledků všech účastníků, která mohla být při zohlednění dalších faktorů rozšířena.
- Následně pak každému výsledku laboratoře (X) bylo přiřazeno z-score vypočtené podle vztahu: $z = (X - x) / \sigma$, kde je x vztažná hodnota a σ cílová směrodatná odchylka.
- Z-score je interpretováno následujícím způsobem: $|z| \leq 2$ jako uspokojivé, $2 < |z| \leq 3$ jako sporné a $|z| > 3$ jako neuspokojivé. Z-score charakterizuje přesnost dat produkovaných laboratoří a je definováno jako systematická chyba laboratoře vztažená na cílovou hodnotu směrodatné odchylky.
- Pro ukazatele ze vztažnou hodnotou nižší než 15 bylo použito Poissonovo rozdělení (P99).

Kontrolní vzorky ze SZÚ byly využity pouze k potvrzení homogenity a stability vzorků (výsledky jsou uvedeny ve zprávě (tab.1). Nebyly využity ke stanovení vztažné hodnoty, kromě koliformních bakterií dle ČSN 757837.

Organotrofní mikroorganismy

- Transport vzorku
- Vhodné ředění
- Teplota vzorku

16 laboratoří teplota do
30 minut 😊

3-4 laboratoře 2 hodiny

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
PK 22°C	6,3	1-12	88,5 %
PK 36°C	13,4	5-23	92 %

Indikátory fekálního znečištění

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
KB (TC) ČSN 757837	227,6	73-380	88,9%
KB (TC) ČSN EN ISO 9308-1 (CCA)	168,1	73-264	82,6 %
KB (TC) ČSN EN ISO 9308-2 (MPN)	150	95-206	100 %
ECOLI ČSN EN ISO 9308-1	30,4	20-41	95,7 %
ECOLI ČSN EN ISO 9308-2 (MPN)	28,6	17-40	100 %
ECOLI ČSN 757835	21,5	11-32	92,9 %

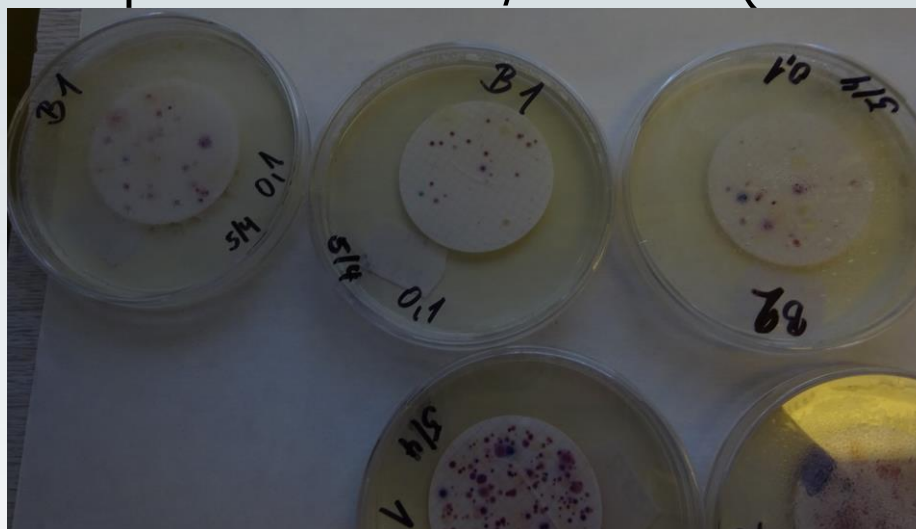
Indikátory fekálního znečištění II

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
FC (TKB) ČSN 757835	42	16-68	100 %
Enterokoky	10,5	3-19	96,1 %



Koliformní bakterie

- Při stanovení koliformních bakterií na CCA nebyl typ agaru (výrobce) při hodnocení zohledňován zejména proto, že ne všichni účastníci tento údaj uvedli. 8 firem (6* Merck, 6* Trios, 3* Himedia)
- Objem zpracovaných vzorků (3* počítáno z 10 ml! ☹, ale celkově zlepšení 😊)
- Teplota vzorku? Vztažná hodnota 168,1 KTJ/100 ml , průměr laboratoří s dlouhou teplotou 493 KTJ/100 ml (z toho 3 nad vztažnou hodnotou)



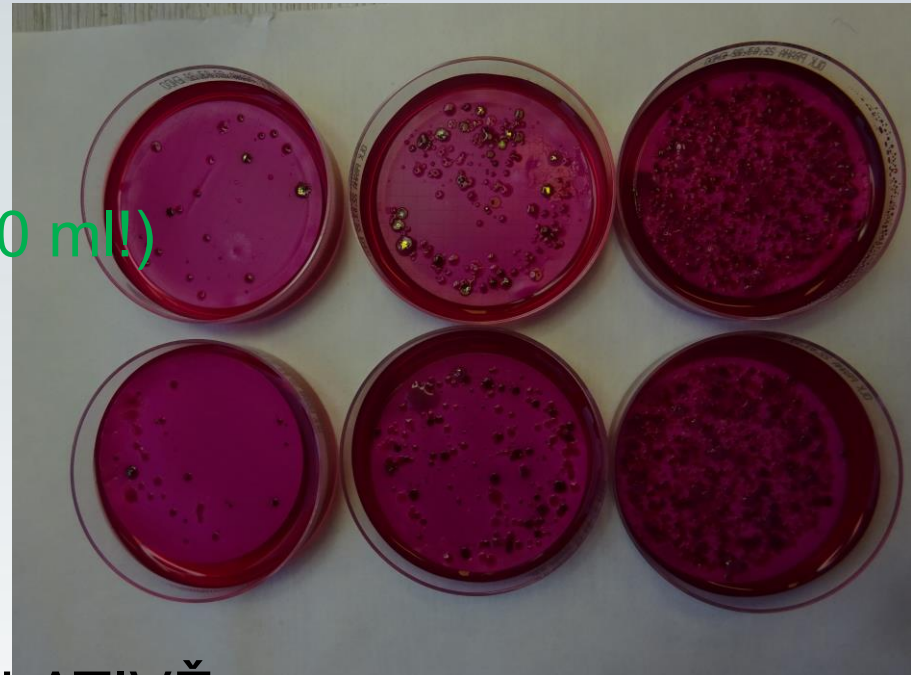
Stanovení koliformních bakterií na Endo agaru

- Tato metoda je určena výhradně pro stanovení koliformních bakterií v nedezinfikovaných vodách.

- Aktuální využití?

- Málo laboratoří

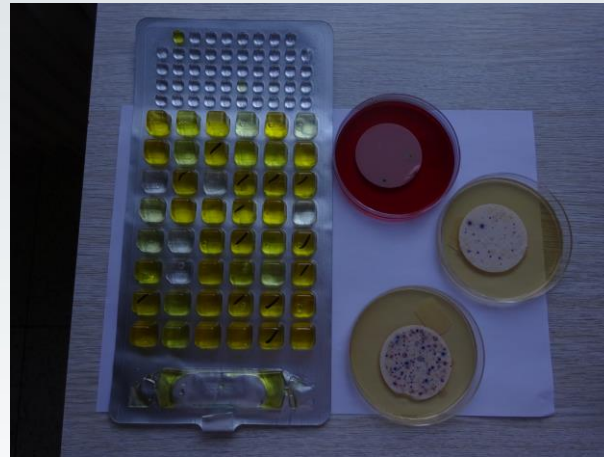
(9 a z toho 3 výsledky z 10 ml!)



- NENÍ V ŽÁDNÉ LEGISLATIVĚ

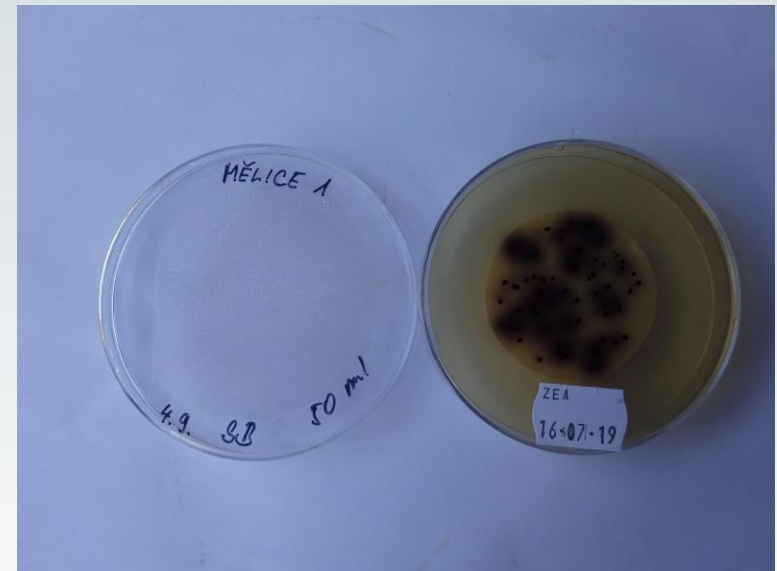
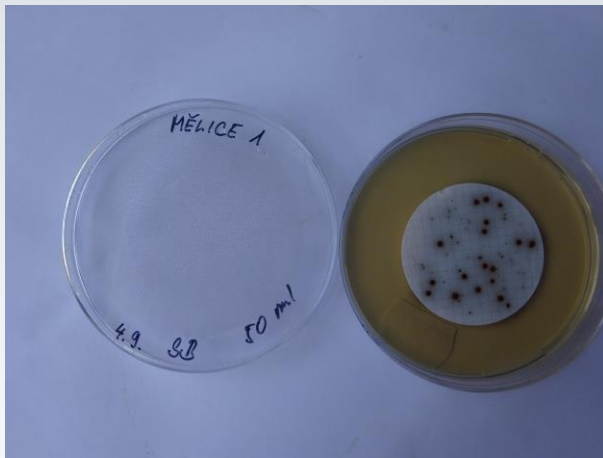
Termotolerantní koliformní bakterie a *E. coli*:

- Nebyly významné problémy – dostatečně selektivní metody
- Výsledky *E. coli* celkem srovnatelné různými metodami – ČSN 757835 nižší – problém se statistikou – EC přerůstá koliformními na CCA
- O těchto ukazatelích bude ještě zmínka v další části prezentace)



Intestinální enterokoky

- Malé počty
- Konfirmace 2 hodiny – doporučuje se asi kvůli selektivitě
- Pozor na falešné kmeny
(koupání)



Klostridia (*C. perfringens*)

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
CP - ČSN EN ISO 14189	29,2	21-38	90 %
CP - vyhl. 252/2004 Sb.	26	13-39	88,2%
Siřičitany redukující anaeroby (klostridia)	26,9	27-47	91,6 %



Clostridium perfringens

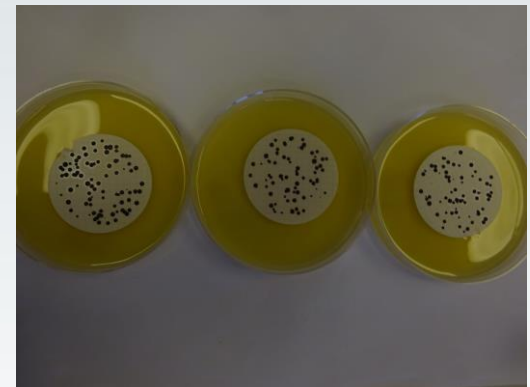
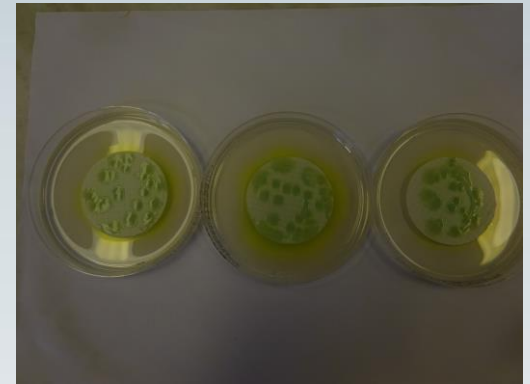
– ještě o něm uslyšíme 😊

- Osud významnost ukazatele se bude muset dořešit (viz dále)
- V PT/V/3/2022 pouze 10 účastníků

4:5 Sifin vers. Himedia (1 neuvedl)

Patogenní bakterie

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
<i>P. aeruginosa</i>	188	103-272	100%
<i>S. aureus</i>	160	25-295	93,8%
<i>Legionella</i> spp.	70,9	44-98	100 %



Patogenní bakterie

- Na rozdíl od bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* nebyla při přípravě vzorků na stanovení *Legionella* spp. použita čistá kultura (environmentální kmeny) ale přirozená kontaminace teplé vody (SZÚ, budova 5, místnost 111). V posledních letech však bývá nedostatek doprovodné mikroflóry.
- Legionely nejčastěji dodán průměrný výsledek (8*, maximální hodnota 3*). AT nebylo třeba (málo doprovodné mikroflóry, na 10 ml vyrostlo méně legionel než po přepočtu nízkých číle z přímého výsevu - LOGICKY). Pouze 1 laboratoř uvedla výhradně hodnoty přepočtené z 1 ml (nejvyšší hodnota)



Nejistoty stanovení

- *V případě, že je výsledek nad mezí stanovitelnosti (min 10 KTJ, lépe 15, někdy dokonce 30 KTJ) by měla být uvedena nejistota stanovení (povinnost při interpretaci výsledků)*
- Pro stanovení vztažné hodnoty a intervalu správných hodnot nebyly nejistoty stanovení brány v úvahu.
- Uvedené nejistoty stanovení lze využít především při hodnocení úspěšných či neúspěšných výsledků jednotlivými účastníky.
- Celkem uvedlo údaje o nejistotách 21 účastníků tj. (78 %). *Je však nutno připustit, že na protokolu nebylo uvedeno hodnocení výsledku resp. porovnání s limitem.* Převážná většina laboratoří (81 %) uváděla relativní nejistotu (v %), nejistotu měření, jako rozmezí správných hodnot uvedly 4 laboratoře (u všech ukazatelů). Nejistotu v případě nízkých hodnot (pod mezí stanovitelnosti) zohlednilo 9 laboratoří (necelých 43 %).
- Rozmezí všech uvedených relativních nejistot bylo 15 - 53 %; nutno konstatovat, že nejistoty v mikrobiologii vody pod 20 % jsou nerealistické a neodpovídají rozložení mikroorganismů (částic) ve vzorku. Jeden účastník u jednoho ukazatele uvedl k výsledku 1 KTJ/10 ml nejistotu stanovení <1-2 %.

Možné chyby při OR

- Dodržovat teplotu při transportu vzorků 2-8°C.
- Pozor na teplotu lednic (chladicích brašen)!
- Dodržovat určenou dobu zpracování!
- Dodržovat předepsané postupy – složení médií apod. Lze si samozřejmě ověřit i svoje média, ale bez záruky.
- **Správné jednotky**
- **Správně vyplněný protokol**

Hodnocení výsledků

- **Výsledky nepřeceňovat, ale ani nepodceňovat**
- Výsledky probrat (zpětná vazba), zhodnotit možné chyby (vertikální audit vzorku), provést o tom **záznam**, mít k dispozici v pracovních listech všechna primární data.
- Při hodnocení využít **nejistoty** výsledku (vlastní).
- Důležité jsou **trendy výsledků** (opakované hodnoty „nad“, nebo „pod“ vztahnou hodnotou), rozlišit možné chyby **systemové a nesystemové**, identifikace rušivých vlivů.
- **Logická správnost výsledků.**

Novinky v mikrobiologii vody

- Transpozice DWD – pokračuje
(připomínková řízení)

Clostridium perfringens, somatické kolifágy
- víc se asi nedotkne

Enterokoky v kráceném rozboru

- Nové metody – R2A agar, TBX

Clostridium perfringens

- *C. perfringens* se bude stanovovat metodou dle ČSN EN ISO 14189 (kultivace *C. perfringens* na TSC agaru a konfirmace kyselou fosfatázou) – nejspíš
- Pro *C. perfringens* je ve směrnici uvedena hodnota 0 KTJ/100 ml s tím, že se má stanovovat „včetně spor“. Tento termín je však zavádějící, spory se totiž stanovují vždy. Znamená to, že se budou stanovovat jak spory, tak vegetativní buňky, tudíž se nebude provádět eliminační krok (tepelná inaktivace buněk).
- ***C. perfringens* se má stanovovat v případě, že to vyplyne z posouzení rizik.**

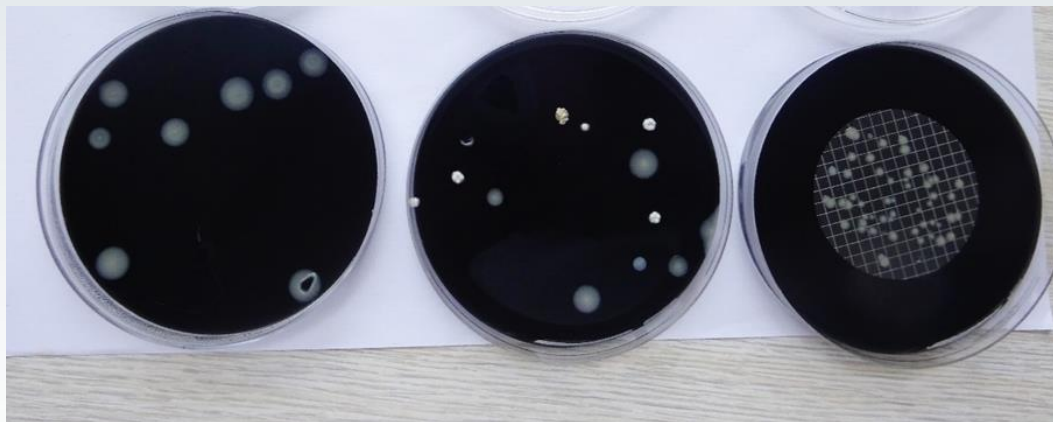
Proč je problém mCP?

- Produktivita média musí být větší než 50 % (EN ISO 11133)
- ČSN EN ISO 17994 – stanovení ekvivalence metod, studii poslat do EMEGu a tam se musí schválit

Ukazatele relevantní pro posouzení rizik domovního rozvodného systému

- WHO ve své studii uvedla, že v EU je ročně hlášeno okolo 6 tisíc případů legionelózy (s desetiprocentní smrtností), a i když je toto číslo zřejmě značně podhodnoceno, stále to staví legionely na první místo co do příčiny úmrtí na nemoci související s vodou.
- Bakterie rodu *Legionella* nebyly dosud ve směrnici uvedeny. V české legislativě jsou uvedeny od roku 2004.
- Legionely jsou jedním z hlavních ukazatelů pro posouzení rizik v domovních systémech.
- *Prioritní budovy, na které se bude tato povinnost vztahovat, si určí na základě subsidiarity samy členské státy EU; může se jednat např. o zdravotnická zařízení, věznice, domovy pro seniory, vzdělávací zařízení, budovy s ubytovací kapacitou, sportovní a rekreační zařízení apod. - upravuje zákon*

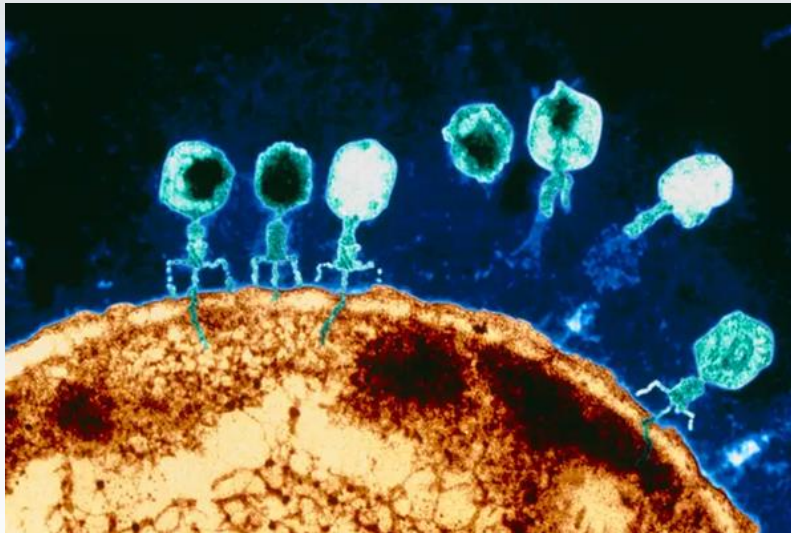
- Pro bakterie rodu *Legionella* (*Legionella* spp.) je stanovena hodnota 1 000 KTJ/litr.
- Nápravná opatření lze zvažovat i v případě, že této hodnoty ukazatele není dosaženo, například v případě prokázaných infekcí a ohnisek nálezů. V takových případech by měl být zdroj infekce potvrzen a určen jeho biologický druh.
- Legionely **se za účelem dodržování výše uvedené hodnoty** detekují metodou dle ČSN EN ISO 11731.
- Pro účely ověřovacího monitorování založeného na posouzení rizik a na doplnění kultivačních metod lze použít i jiné metody, jako je norma ISO/TS 12869, rychlé kultivační metody, nekultivační metody a molekulární metody, zejména kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR).



Provozní monitorovací program

- Bakteriofágy jsou nepatogenní viry, které infikují bakteriální buňky.
- **Kolifágy** jsou podskupinou bakteriofágů se specifickým názvem, neboť napadají právě druh *E. coli*.
- Somatické kolifágy se běžně vyskytují ve střevním traktu člověka a teplokrevných zvířat, ale v nižším počtu než např. *E. coli* nebo intestinální enterokoky. Zdají být **velmi dobrým ukazatelem účinnosti procesů úpravy**, čištění a desinfekce vod (úpravny vod, čistírny odpadních vod).

NEJSOU VHODNÝM INDIKÁTOREM FEKÁLNÍHO ZNEČIŠTĚNÍ!



Science Photo library (článek od Michael Le Page)

Směrnice Evropského parlamentu a RADY (EU) 2020/2184 ze dne 16. prosince 2020 o jakosti vody určené k lidské spotřebě (přepracované znění)

Příloha II, část A:

- **Somatické kolifágy - indikátor provozního monitoringu.**
- Jejich stanovení by mělo být prováděno v rámci posouzení a řízení rizik – a to v souvislosti s prověřením schopnosti dané technologie eliminovat enterické viry.
- Jako referenční hodnota v surové vodě je stanoveno 50 PTJ/100 ml.

Tento ukazatel se objeví nejen v novelizované vyhlášce č. 428/2001 Sb. (jako další ukazatel surové vody), ale také v novelizované vyhlášce č. 252/2004 Sb. (jako nový a jediný ukazatel se stanovenou referenční hodnotou).

Metody stanovení

Kultivační metoda – plaková titrace

Jednotky: PTJ(U) (plakotvorné jednotky (units)) nebo PFP (plaque forming particles) v definovaném objemu vzorku

	Hostitelský kmen	Citlivost	Nevýhody
ČSN EN ISO 10705-2 (2000)	<i>E. coli</i> kmen C (pro málo znečištěné přírodní vody), <i>E. coli</i> kmen CS (WG5 -pro znečištěné vody)	1 PFU per ml	Pro 100 ml vzorku je nezbytná koncentrace dle ČSN ISO 10705-3
USEPA 1601-1 (2001) -	<i>E. coli</i> kmen CN-13	1 PFU/100 ml	Validováno pouze pro podzemní vody
USEPA 1602 (2001)	<i>E. coli</i> kmen CN-13	1 PFU /100 ml	Dtto



Metodické aspekty

- Očekávaný **nízký výskyt** ve vodách,
 - nutnost koncentrace (*výtěžnost 19-70 %*)
- **Referenční hodnota 50 PFU/100 ml**
 - pro hodnocení účinnosti jejich eliminace velmi nízká, protože *snížení z 50 PFU na 0 PFU představuje „>98 %“.....*
- **Stabilita vzorků:** somatické kolifágy lze stanovit do 48 hodin po odběru případně lze vzorek zamrazit s glycerolem (objemových 10 %).

Zkušenosti z jiných zemí (EU)

- Aktuální problém všech evropských zemí
- Literární údaje existují – je málo systematických zkušeností ze surové vody,
- 4 země (Belgie, Maďarsko, Slovenská republika a Portugalsko) ze 14 zemí, které dodaly informace, neměly na podzim 2021 žádnou zkušenost se stanovením somatických kolifágů.
- Převážná většina zemí postupně testuje/zavádí metodu dle ČSN EN ISO 10750-2.

Kolika zdrojů surové vody se to může týkat?

- Odborná literatura (viz příspěvek ve sborníku konference Pitná voda 2022 v Táboře): faktory ovlivňující jejich výskyt jsou **zákal (průtok) a typ hospodaření v povodí**, podobný vzorec výskytu má *E. coli*.

Tj. přívalové deště, jarní tání apod.

V České republice by si tato problematika určitě zasloužila podrobnější výzkum (studii). Výsledky by poté mohly pomoci při tvorbě monitorovacích plánů.

Počty zdrojů surové vody (podzemní voda), které ve své maximální hodnotě *E. coli* překročily v letech 2018-2020 hranici 50 KTJ/100 ml (databáze ČHMÚ)

Podzemní voda

	2018	2019	2020
Celkem	2648	2852	2759
Počet zdrojů co překročily 50 KTJ/100 ml u <i>E. coli</i>	23	28	53
%	0,910 %	1,002 %	2,166 %

Povrchová voda

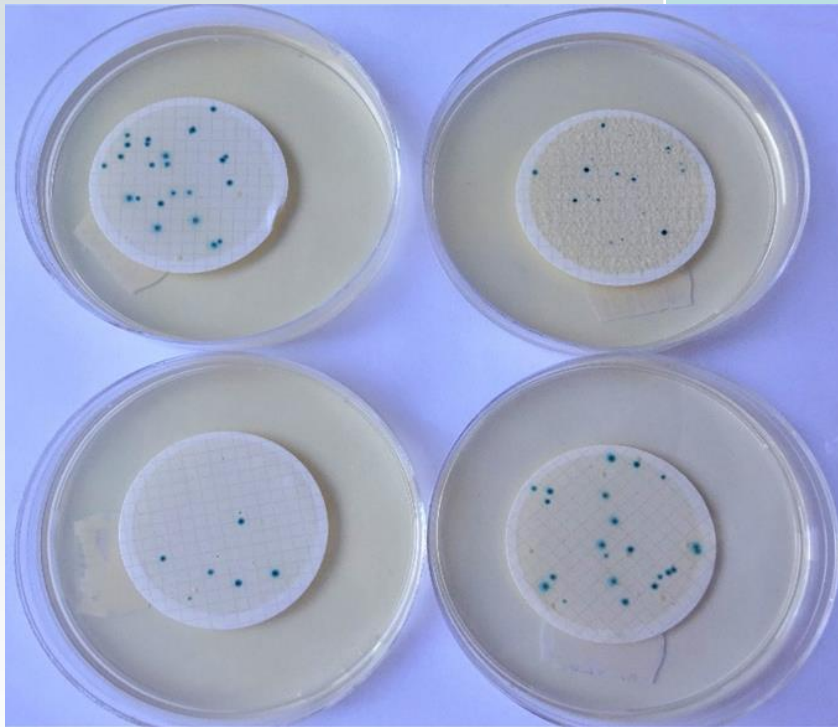
	2018	2019	2020
Celkem	121	122	124
Počet zdrojů co překročily 50 KTJ/100 ml u <i>E. coli</i>	38	40	40
%	31 %	33 %	35 %

Co je třeba:

- Určit realistické požadavky na dostatečnou redukci ($4 \log_{10}$?, $6 \log_{10}$?) malých (vč. virových) částic v procesu úpravy pitné vody. Kdo to určí? Kde to bude uvedeno/jak to bude závazné?
- Provést výběr relevantních lokalit odběru surových vod, kterých se bude stanovení somatických kolifágů týkat (zranitelné zdroje s fekálním znečištěním, i občasným).
- Určit, s jakou minimální četností se bude tato verifikace provádět (*v případě, že bude pro danou lokalitu relevantní*).
- Zavést (alespoň v pilotních) laboratořích stanovení somatických kolifágů a získat s tím praktické zkušenosti. Zajistit mezilaboratorní porovnání.
- Na základě zkušeností stanovit parametry výše uvedených metod, výtěžnost při koncentraci, apod.
- Určit objemy vzorků surových a pitných vod, které bude třeba zpracovávat (zohlednit výtěžnost koncentračních metod a zároveň požadavky na verifikaci eliminace virových částic).

Možnosti stanovení *E. coli* z oživených vod na TBX médiu

Primární kultivace	Sekundární kultivace	Městská fontána	Šedá voda 1	Šedá voda 2	Dešťová voda 1	Dešťová voda 2
-	TBX 44 °C	40	70	2 200	6	88
-	TBX 36 °C	130	60	přerostlé	15	110
neselektivní agar 36 °C 4 h	TBX 44 °C	170	90/ 30	1 600	21	129
TBX 36 °C 4 h	TBX 44 °C	130	80	2400	21	121
-	Colilert 18 36 °C	120	82	5475	9	135,4



EN ISO 9308-4?

Pseudomonas aeruginosa???

Návrh - využití R2A agaru

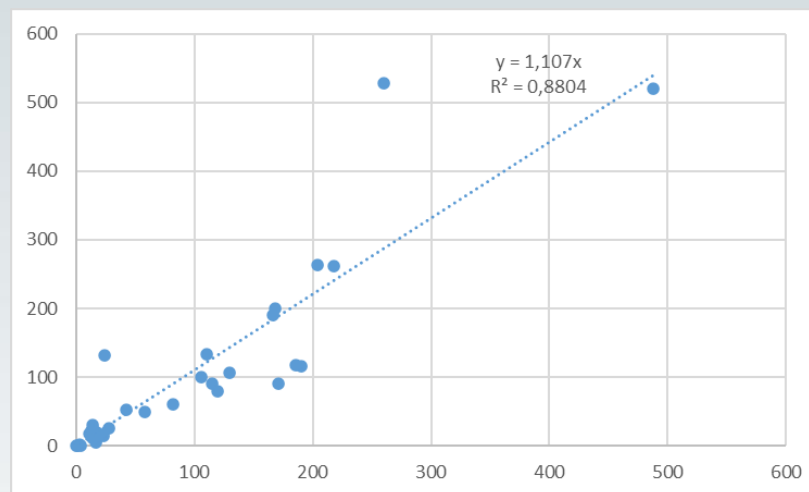
- Návrh ISO 13647
- Kultivovatelné mikroorganismy na R2A médiu
- Kultivace 7 dní při 22°C
- Využitelné pro kontrolu úpravy vody

Předběžné výsledky

Vodovodní voda

	TYA (22°C)	R2A
1	23	75
2	1	15
3	1	5
4	1	30
5	4	10

Oživená voda (Aqua purificata/ rybníky)



Nabídka naší spolupráce

Zájemce o mikrobiologické metody proškolíme až bude vhodná epidemiologická situace:

- v menších skupinách max 6 lidí
- součástí školení je praktická část
- pro začátečníky i pokročilé
- počítáme s pozdějším podzimním termínem
- **PROSBA O VYPLNĚNÍ ZPĚTNÉ VAZBY!**

Zajímavosti z praxe