



**Hodnocení výsledků PT/V/3/2023**  
**a**  
**Novinky v mikrobiologii vody**

RNDr. Dana Baudišová, Ph.D.

# Program

## Příprava a hodnocení PT#V/3/2023

- Příprava a výběr vzorků
- Hodnocení výsledků
- Diskuse k jednotlivým ukazatelům

## Novinky v mikrobiologii vody

- Zákon o ochraně veřejného zdraví schválen, na vyhlášce se finišuje
- Nové normy/metody



# Příprava PT #V/3/2023

Vzorek A – Organotrofní mikroorganismy

Cíl:

- Nenulové hodnoty
- Nechceme *Bacillus a aktinomycety*

Nová lokalita – park Na Jezerce, Praha 4



# Vzorek B a C

## – indikátory fekálního znečištění

Povrchová voda o různém stupni fekálního znečištění (Vltava Sedlec). Významné změny fekálního znečištění v týdnu před PT

Výsledky 3 dny před odběrem vzorků na PT 3 2023 (15.3.):



TC CCA	EC CCA	FC	Enterokoky	CP
KTJ/10 ml	KTJ/10 ml	KTJ/10 ml	KTJ/10 ml	KTJ/10 ml
250	60	18	13	10

# Vzorek D a E (podmíněné 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  $22^\circ\text{C}$  a  $36^\circ\text{C}$ ) ve sterilní nádobě a vše bylo důkladně zhomogenizováno a za stálého míchání ihned rozplněno.

**Vzorek E** – Přirozený vzorek teplé vody. V březnu 2023 bylo provedeno ověření potenciálního zdroje vody, což je teplá užitková voda (SZÚ, místnost 111). Vzorek byl odebrán po dvouminutovém odtočení do sterilní 10 litrové nádoby. Po zchladnutí na laboratorní teplotu byla ověřena absence volného chloru a vzorek byl zhomogenizován a za stálého míchání ihned rozplněn.

# PT - #V/3/2023 - 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 ( $\sigma$ ) 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  $\sigma$  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 10 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.*

# Organotrofní mikroorganismy

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
<b>PK 22°C</b>	48	28-68	100 %
<b>PK 36°C</b>	12	0-23	100 %

- Transport vzorku
- Vhodné ředění
- Teplota vzorku



## Indikátory fekálního znečištění

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
<b>KB (TC) ČSN 757837</b>	7	2-11	100 %
<b>KB (TC) ČSN EN ISO 9308-1</b>	Nehodnoceno		
<b>KB (TC) ČSN EN ISO 9308-2</b>	7	2-12	100 %
<b>ECOLI ČSN EN ISO 9308-1</b>	1	0-6	91 %
<b>ECOLI ČSN EN ISO 9308-2</b>	1	0-6	100 %
<b>ECOLI ČSN 757835</b>	0	0-6	100 %



# Koliformní bakterie dle ČSN EN ISO 9308-1

V	lab	výsledek (KTJ/10ml)	z-score	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
X	502	3.0	-0.78					█				
X	442	5.0	-0.68					█				
X	641	5.0	-0.68					█				
X	1326	5.0	-0.68					█				
X	936	9.0	-0.48					█				
X	741	15.0	-0.17					█				
X	526	24.0	0.28					█				
X	1071	30.0	0.59					█				
X	967	32.0	0.69					█				
X	768	37.0	0.94					█				
?	960	65.0	2.36					█	█			

vztažná hodnota: 18,4KTJ/10ml

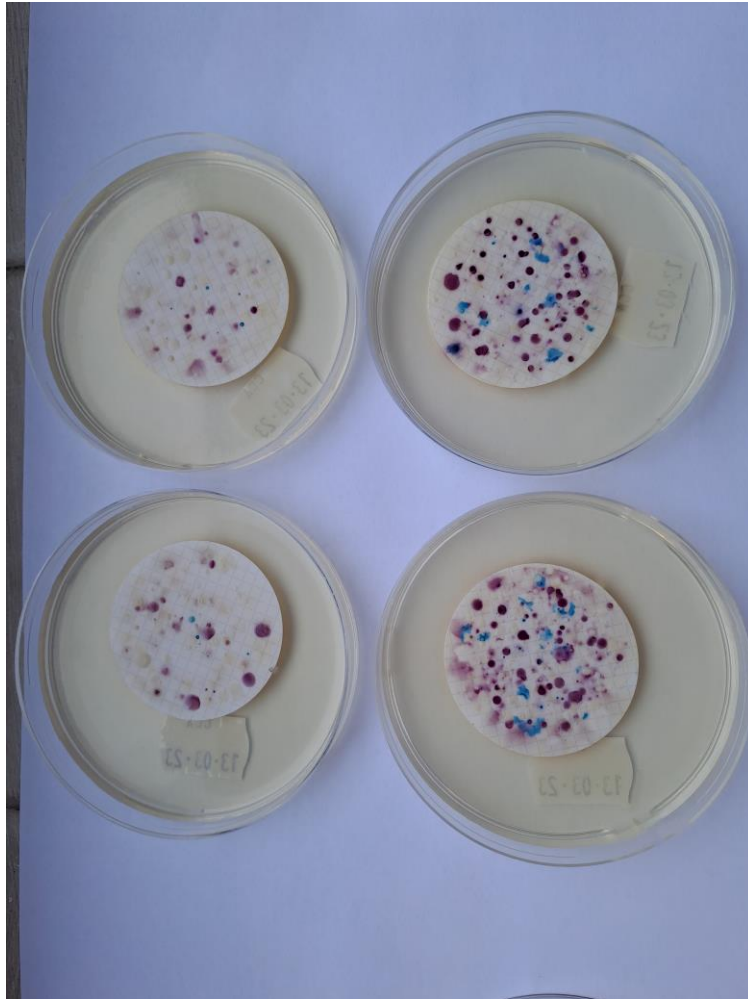
vztažná odchylka: ±215%

SZÚ	KTJ/10 ml	44 <sup>x)</sup>	9 %
-----	-----------	------------------	-----

Toto je počet kolonií v 10 ml, splňujících definici pro koliformní bakterie (po 24 hodinách  $\beta$ -D-galaktozidáza pozitivní, oxidáza negativní). Po ponechání vzorku v lednici na další analýzy po dobu jednoho týdne zůstalo „červených“, tj. D-galaktozidáza pozitivních pouze 14 kolonií.

# Koliformní bakterie

Problematický vzorek

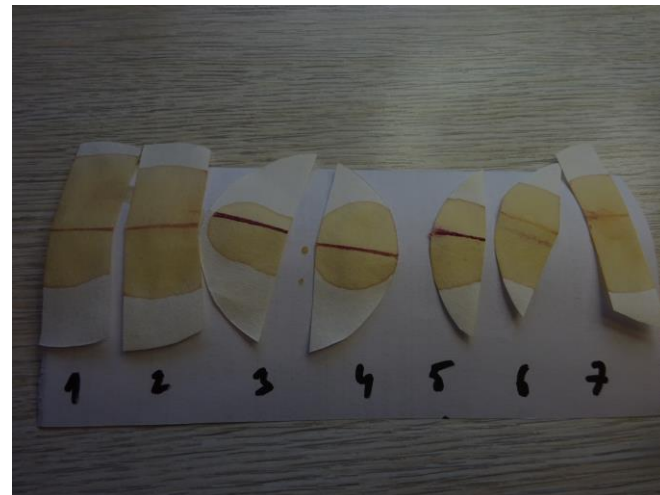


# Indikátory fekálního znečištění II

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
<b>TKB (FC)</b>	0	0-6	100 %
<b>Enterokoky</b>	9	4-14	100%

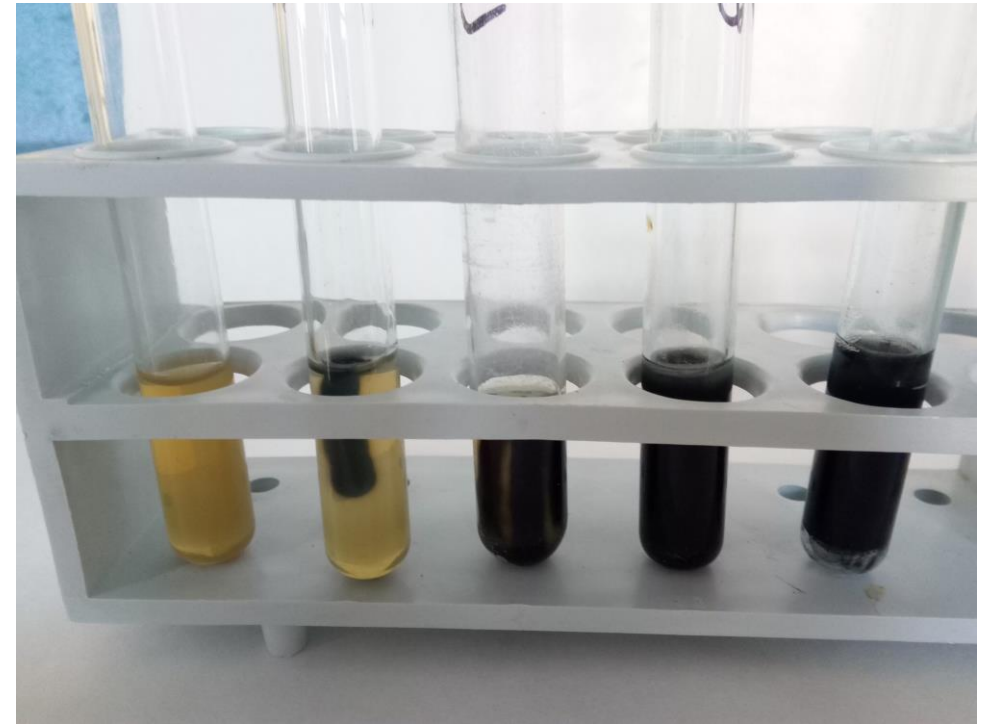
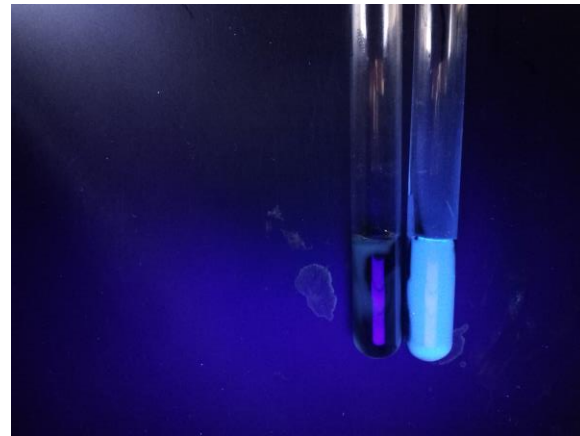
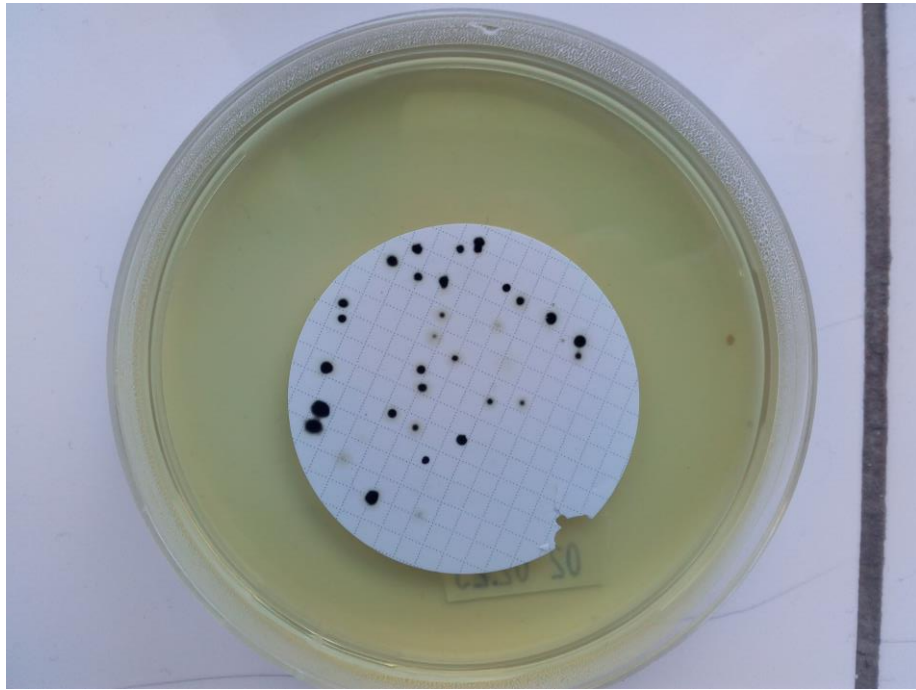
# Klostridia (*C. perfringens*)

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
<b>CP - ČSN EN ISO 14189</b>	27	11-43	100 %
<b>CP - Vyhl. 252/2004 Sb.</b>	12	6-19	80 %
<b>Siřičitany redukující anaeroby</b>	Nehodnoceno - pouze 1 účastník!		



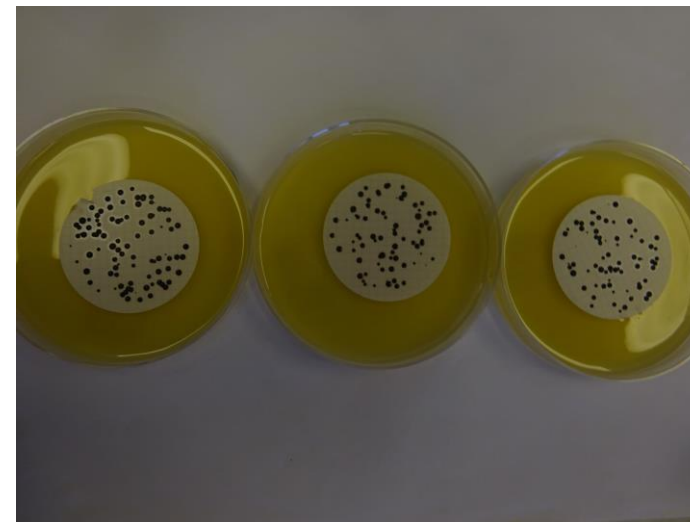
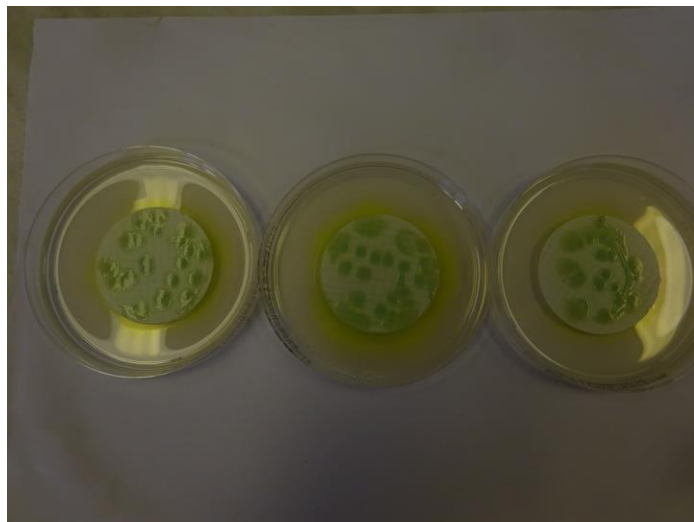
# *Clostridium perfringens*

- Osud významnost ukazatele se bude muset dořešit (viz dále) , mCP končí (jako standardizovaná metoda)
- CP dle ČSN EN ISO 14189: 8 účastníků
- Všichni uspěli
- Výrobce činidla na kyselou fosfatázu : 3\* SIFIN, 3\* Himedia, 1\* Biovendor



# Podmíněně patogenní bakterie

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
<i>P. aeruginosa</i>	707	78-1337	100 %
<i>S. aureus</i>	704	528-881	100%
<i>Legionella spp.</i>	0 <i>(15.3. 240 KTJ/10 ml)</i>	0-6	100%



# 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.



# 2023



Celkem uvedlo údaje o nejistotách 11 účastníků tj. pouze 58 %.

Je však nutno připustit, že na protokolu nebylo uvedeno hodnocení výsledku resp. porovnání s limitem.

Většina laboratoří (73 %) uváděla relativní nejistotu (v %), nejistotu měření, jako rozmezí správných hodnot uvedla 1 laboratoř (u všech ukazatelů). Kombinaci obou uvedly tři laboratoře (většinou z důvodů některých výsledků pod mezí stanovitelnosti – což je správně).

Nejistotu v případě nízkých hodnot (pod mezí stanovitelnosti) zohlednily laboratoře (36 %).

Rozmezí všech uvedených relativních nejistot bylo 15 – 150 %; nutno konstatovat, že nejistoty v mikrobiologii vody pod 20 % jsou nerealistické a neodpovídají rozložení mikroorganismů (částic) ve vzorku.

# 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“ vztažnou hodnotou), rozlišit možné chyby systémové a nesystémové, identifikace rušivých vlivů.
- Logická správnost výsledků.

# Novinky v mikrobiologii vody

- Transpozice DWD – pokračuje (vnější připomínková řízení), **novela zákona 258/2000 Sb. podepsána**
- *Clostridium perfringens*, somatické kolifágy - víc se metodicky nedotkne
- Enterokoky v kráceném rozboru

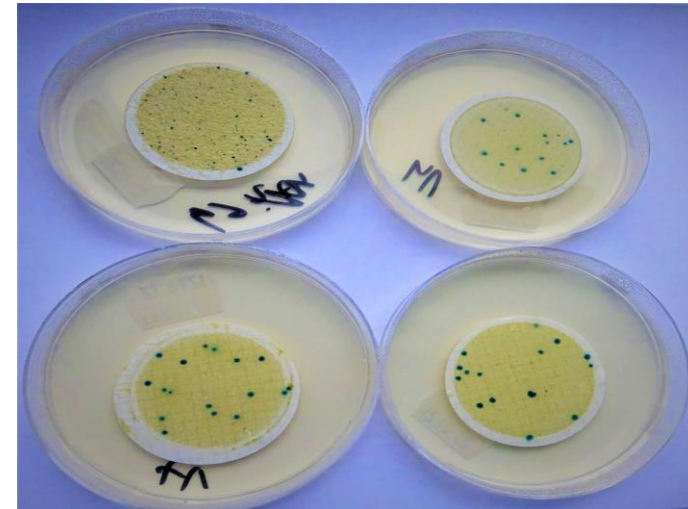
## Nové metody (normy)

R2A agar (návrh ISO 13647)

TBX (návrh ISO 9308-4)

Enterolert (návrh ISO 7899-3),

Pseudalart EN ISO 16266-2 schváleno, příští rok PT3(??) - *pouze pitné a balené vody*

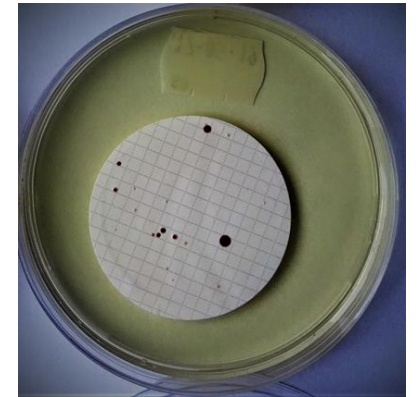


# Intestinální enterokoky

- Budou součástí i kráceného rozboru pitné vody
- Více analýz – více záchytů - **Posílejte kmeny!**
- V roce 2021 ÚV více než 5000 obyv. celkem 4377 analýz a 5 záchytů  
méně než 5000 obyv. celkem 9605 analýz a 170 záchytů

(srov. EC 12273 a 21867 analýz)

- ČSN EN ISO 7899-2 *E. faecalis, faecium, durans a hirae* (2 hodiny konfirmace)
- Enterolert DW *Enterococcus spp.*



C7  
(++) (A)

E2421

[Aerococcus viridans](#)

[2.14](#)


# Enterolert DW (ISO 7899-3)

$\beta$ -D-glukosidáza v selektivním prostředí,  
(41 +/- 0,5)°C

**NEW**

## Enterolert-DW

Accurately detects enterococci  
in drinking water in 24 hours



Enterolert-DW delivers confidence  
in enterococci detection:

- More accurate and specific compared to ISO 7899-2
- Confirmed enterococci results in 24 hours
- Same easy-to-use platform as Collert-18

**Now DWI Approved**

**IDEXX**

# Pseudalert (EN ISO 16266 -2)



hydrolýza 7 amino 4 methylokumarin aminopeptidázového substrátu v selektivním médiu , (38 +/-2)°C

# *Clostridium perfringens*

*C. perfringens* se bude stanovovat metodou dle ČSN EN ISO 14189 (kultivace *C. perfringens* na TSC agaru a konfirmace kyselou fosfatázou)

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), nižší hodnoty

Článek v dohledné době (??)



# Ukazatele relevantní pro posouzení rizik domovního rozvodného systému

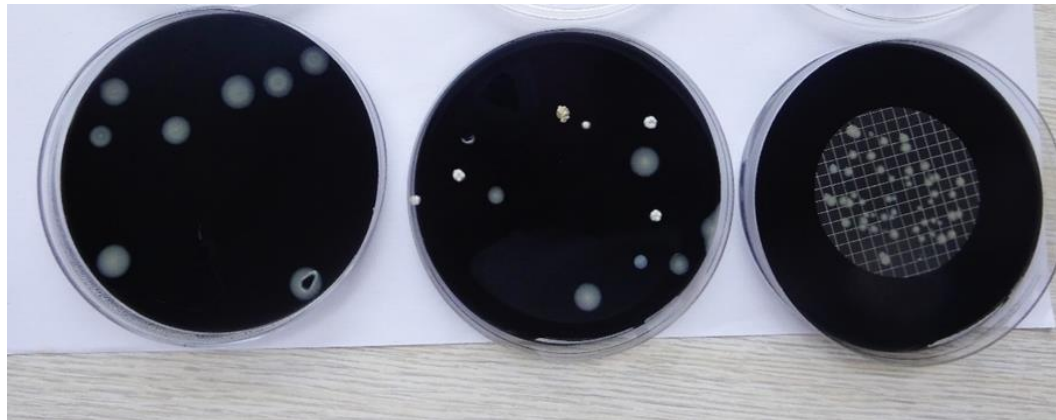
WHO ve své studii uvedla, že v EU je ročně hlášeno okolo 6 tisíc případů legionelózy (s desetiprocentní smrtností), a i když je toto číslo zřejmě značně podhodnoceno, stále to staví legionely na první místo co do příčiny úmrtí na nemoci související s vodou.

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 100 KTJ/ 100 ml
- 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



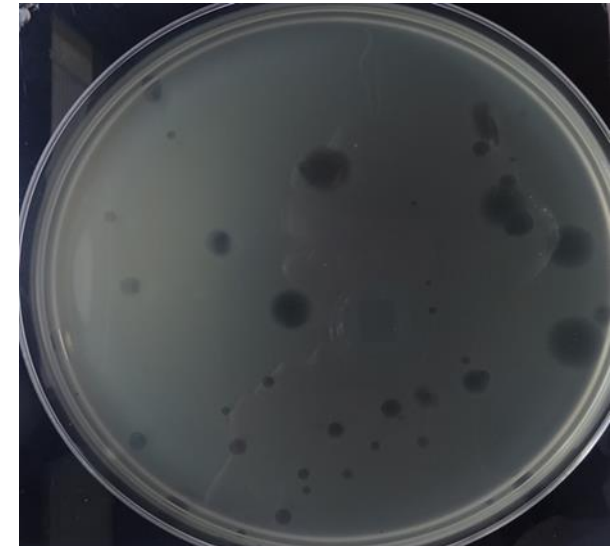
Bakteriofágy jsou nepatogenní viry, které infikují bakteriální buňky.

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!**

Už se pomalu zavádí!



# Co je třeba - (Metodický pokyn):



- 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*).
- 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).

# Nabídka naší spolupráce

Zájemce o mikrobiologické metody proškolíme:

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!**

**PROSBA o enterokoky z pitné vody**

Zajímavosti z praxe



**Děkuji za pozornost**

i

[dana.baudisova@szu.cz](mailto:dana.baudisova@szu.cz) +420 226 708 575