

ACTA      HYGIENICA  
              EPIDEMIOLOGICA  
              ET MICROBIOLOGICA  
              1/2023



## **Metody detekce vybraných patogenů a podmíněných patogenů v pitné vodě**

Aktualizace Přílohy č. 5/1990 k AHEM – Jednotné metody detekce nových mikrobiálních kontaminantů pitné vody

Dana Baudišová  
Monika Havlíčková  
Martina Bielaszewska  
Jaroslav Šašek

Státní zdravotní ústav  
ISSN 1804-9613

## Metody detekce vybraných patogenů a podmíněných patogenů v pitné vodě

*Abstrakt:* Toto monotematické číslo vzniklo jako aktualizace 33 let starého dokumentu AHEM, příloha č. 5/1990 Jednotné metody detekce nových mikrobiálních kontaminantů pitné vody. Od té doby došlo k velkému posunu a modernizaci mikrobiologických diagnostických metod, včetně zavádění metod molekulárně biologických. Zároveň řada rutinně používaných postupů byla na mezinárodní úrovni standardizována. Toto číslo AHEM tak shrnuje současné metody stanovení nejvýznamnějších patogenních a podmíněně patogenních mikroorganismů v pitné vodě a ty metody, které nejsou doposud standardizované (detekce bakterií rodu *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, Shiga toxin-produkujících *Escherichia coli*, mikroskopických hub a bakterií rodu *Streptomyces*), uvádí v aktuální podobě. Publikace by měla být využita v rámci řešení nenadálých situací souvisejících s kontaminací pitné vody, jako jsou např. havárie, epidemie apod.

**Klíčová slova:** pitná voda – kvalita, mikrobiologické vyšetřování vody, patogeny – metody detekce

## Methods of detection of selected pathogens and potential pathogens in drinking water

*Abstract:* This monothematic issue was created as an update of the 33-year-old AHEM document, Supplement No. 5/1990 Uniform Methods for the Detection of New Microbial Contaminants in Drinking Water. Since then, there has been a major shift and modernization of microbiological diagnostic methods, including the introduction of molecular biological methods. At the same time, a number of routinely used procedures have been standardized at the international level. This issue of AHEM thus summarizes the current methods for determining the most important pathogenic and potential pathogenic microorganisms in drinking water and the methods that have not yet been standardized (detection of bacteria of the genus *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, microscopic fungi and bacteria of the genus *Streptomyces*) are listed in the current form. The publication should be used when sudden situations related to the contamination of drinking water, such as accidents, epidemics, etc., are addressed.

**Key words:** drinking water – quality, microbiological investigation of water, pathogens – methods of detection

*Doporučená citace:* Baudišová D, Havlíčková M, Bielaszewska M, Šašek J. Metody detekce vybraných patogenů a podmíněných patogenů v pitné vodě. Acta Hyg Epidemiol Microbiol. 2023;(1):1-17.

©Státní zdravotní ústav 2023

Žádná část časopisu nesmí být reprodukována tiskem, fotografickou cestou, počítačovými soubory dat nebo jinými způsoby bez předchozího písemného svolení vydavatele.

Redakční rada:

MUDr. Barbora Macková, MHA (předsedkyně)

MUDr. Jozef Dlhý, Ph.D., Mgr. Markéta Dvořáková, Ph.D., Mgr. Matyáš Fošum, MUDr. Hana Jeligová, MUDr. Jana Kozáková, prof. MUDr. Jiří Ruprich, CSc., MUDr. Stanislav Wasserbauer, Mgr. Martin Weiszenstein, Ph.D.

Mgr. Jana Veselá (tajemnice redakce)

Adresa redakce:

Státní zdravotní ústav, redakce časopisu AHEM, Šrobárova 49/48, 100 00 Praha 10, telefon: 267082567, e-mail: jana.vesela@szu.cz.

Publikováno 19. 12. 2023

ACTA HYGIENICA  
EPIDEMIOLOGICA  
ET MICROBIOLOGICA

## **Metody detekce vybraných patogenů a podmíněných patogenů v pitné vodě**

Aktualizace Přílohy č. 5/1990 k AHEM – Jednotné metody detekce nových mikrobiálních kontaminantů pitné vody

RNDr. Dana Baudišová, Ph.D.<sup>1</sup>, Ing. Monika Havlíčková, Ph.D.<sup>2</sup>,  
doc. MUDr. Martina Bielaszewska, CSc.<sup>2</sup>, RNDr. Jaroslav Šašek<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Státní zdravotní ústav, Centrum zdraví a životního prostředí, Oddělení hygieny vody

<sup>2</sup>Státní zdravotní ústav, Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Oddělení stafylokokových a alimentárních bakteriálních infekcí

<sup>3</sup>Státní zdravotní ústav, Centrum zdraví a životního prostředí, Oddělení hygieny vody (emeritní pracovník)

## Obsah

Úvod .....	3
Metody detekce vybraných patogenů a podmíněných patogenů v pitné vodě.....	5
1. Detekce shigel.....	5
2. Detekce <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	6
3. Detekce mikroskopických hub.....	7
4. Detekce rodu <i>Streptomyces</i> .....	8
5. Detekce Shiga toxin produkujících <i>Escherichia coli</i> .....	9
Literatura:.....	11
Přílohy.....	13
Souhrnný přehled metod detekce vybraných mikrobiálních kontaminantů pitné vody .....	13
Obrazová příloha .....	14

## Úvod

Je tomu již 33 let, co bylo vydáno číslo AHEM věnované jednotným metodám detekce nových mikrobiálních kontaminantů pitné vody (1). Metody však byly použitelné i pro povrchové, některé i pro odpadní vody, jak je ostatně vyznačeno v jednotlivých postupech. Na jejich zpracování se podíleli pracovníci hygienické služby z tehdejšího Institutu hygieny a epidemiologie (dnes Státní zdravotní ústav), z Krajské hygienické stanice v Plzni a z Lékařské fakulty hygienické UK (dnes 3. LF UK). Řada těchto metod se v praxi více či méně využívala, některé sloužily jen jako odborný základ pro stanovení příslušných agens v případě potřeby. Jedná se vesměs o patogenní či podmíněně patogenní mikroorganismy, jejichž stanovení není součástí běžné kontroly kvality pitné vody. Rutinní vyšetřování a hodnocení kvality pitných vod je založeno na systému indikátorů fekálního znečištění (především *Escherichia coli* (*E. coli*) a intestinální enterokoky). Využití metod zde uveřejněných nebo odkazovaných tak přichází v úvahu jen ve speciálních případech epidemií či podezření na ně, popř. ve sporadických případech infekce. V takových chvílích ale vyvstává potřeba co nejrychlejší analýzy komplikovaná skutečností, že žádná laboratoř tyto metody rutinně nepoužívá, resp. ne ve svém celku.

V průběhu času byly některé tyto metody vydány na mezinárodní úrovni jako normalizované postupy, ty evropské jsou pak přejímány do soustavy národních technických norem. Jiné postupy byly časem v souvislosti s novými znalostmi a technologiemi modifikovány, zdokonaleny a doznaly tak určitých změn. Proto přichází tato aktualizace, aby se všechny nové přístupy, postupy a modifikace mohly dostat do praxe mikrobiologického vyšetřování vod, nebo aby byl alespoň odborný základ pro analýzy těchto kontaminantů v případě potřeby.

Existují sice také postupy stanovení těchto agens v potravinářské či humánní mikrobiologii, je zde však velký rozdíl především při jejich záchytu (resp. izolaci) z dané matrice. Postupy confirmace či identifikace pak mohou být již stejné nebo podobné. V mikrobiologii vody většinou identifikace končí jen na úrovni confirmačních testů; identifikace rodu, druhu (species) či ještě podrobnější identifikace (na úrovni poddruhu – subspecies, variety, sérotypu, subtypu, sekvenace úseků DNA) je požadována jen u některých ukazatelů. V případě vodního prostředí také musíme počítat s tím, že budou na rozdíl od potravin či biologického/klinického materiálu **jiné počty** cílových agens ve vodě, bude **jiný jejich fyziologický stav** a bude **jiná doprovodná mikroflóra** (jak její **kvantita**, tak i **kvalita**), což se **musí odrazit především na postupech jejich záchytu** z vody. Při identifikaci je nutno využít spolupráce se specializovanými pracovišti.

Jak bylo zmíněno výše, stanovení (podmíněných) patogenů v pitných nebo jiných vodách se obvykle provádí při podezření na sporadické nebo epidemické výskyty nálezů souvisejících s vodou. Při šetření takových případů je důležité postupovat systematicky, což se vztahuje i na rozhodnutí, kdy a kde odebrat vzorky vody. Upozorňujeme zde na užitečný metodický manuál WHO zaměřený na šetření vodou přenosných epidemií „Surveillance and outbreak management of water-related infectious diseases associated with water-supply system“ (především část B věnovanou praktickým krokům při šetření a zvládnutí epidemie) (2), dostupný i v českém překladu.

Stručný přehled změn u jednotlivých metod uvedených v Příloze č. 5/1990 k AHEM:

- detekce shigel – modifikace stávajícího postupu;
- detekce *Yersinia enterocolitica* – modifikace stávajícího postupu;

- detekce *Campylobacter jejuni* – postup nahrazen normalizovanou metodou ČSN ISO 17995 (3);
- detekce mikromycet – postup ponechán;
- detekce mykobakterií – postup nahrazen normalizovanou metodou ČSN 757840 (4);
- detekce enterovirů – postup byl nahrazen normalizovanou metodou pro stanovení lidských enterovirů (ČSN EN 14486) (5). S touto metodou však v ČR nejsou v současné době žádné zkušenosti. NRC pro enteroviry používá metodu dle WHO – Manual for the virological investigation of poliomyelitis, která zahrnuje dvoufázovou separaci, izolaci pomocí tkáňových kultur a konfirmaci metodou PCR (6);
- detekce kolifágů – postup nahrazen normalizovanými metodami na stanovení somatických kolifágů – ČSN EN ISO 10705-2 (7) a ČSN EN ISO 10705-3 (8) a stanovení F-specifických RNA bakteriofágů – ČSN ISO 10705-1 (9). Nejedná se však o lidské patogeny, nicméně se kolifágy využívají jako indikátor eliminace virů (virových částic) v čistících procesech;
- detekce rodu *Streptomyces* – ponechán stávající postup, identifikaci je třeba provést ve specializované laboratoři ([NRC pro patogenní aktinomycety, oblastní nemocnice Trutnov](#)).

#### Nově zařazené ukazatele/metody:

- detekce salmonel – dle normalizovaného postupu ČSN ISO 19250 (10);
- detekce *Listeria monocytogenes* (pro koupací vody ve volné přírodě) – dle normalizovaného postupu ČSN EN ISO 11290-2 (11);
- detekce Shiga toxin produkujících *E. coli*;
- detekce enterických virů – dle normalizovaného postupu ČSN P CEN ISO/TS 15216-1 (12).

Změny provedené v jednotlivých metodách jsou shrnuty v příloze. Všechna kultivační média je třeba používat od výrobců certifikovaných podle ČSN EN ISO 9001:2015 (13), jako jsou např. Merck, Oxoid, HiMedia, XEBIOS, BIORAD a další.

# Metody detekce vybraných patogenů a podmíněných patogenů v pitné vodě

## 1. Detekce shigel

Modifikace postupu spočívá především v modernizaci používaných kultivačních médií a využití moderních diagnostických metod (PCR, MALDI-TOF, sérotypizace apod.). Modifikaci navrholo Oddělení stafylokokových a alimentárních bakteriálních infekcí (SABI) z Centra epidemiologie a mikrobiologie Státního zdravotního ústavu.

**Charakteristika:** Bakterie rodu *Shigella* jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní nesporující tyčinky z čeledi *Enterobacteriaceae* o velikosti  $2 \times 0,5 \mu\text{m}$ . Rostou dobře na živných médiích. Jsou metabolicky málo aktivní, řadu sacharidů zkvašují za tvorby kyseliny bez plynu, nefermentují laktózu (a většinou jsou i  $\beta$ -D-galaktosidáza negativní) ani inositol a adonitol, neutilizují citrát a neprodukují  $\text{H}_2\text{S}$ . Nedekarboxylují lysin a jsou nepohyblivé. *Shigella* je podle genetické shody stejný rod jako *Escherichia* (97 % DNA mají stejné) a nelze je rozlišit metodou hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF).

**Princip stanovení:** Princip stanovení spočívá v selektivním pomnožení zkoncentrovaného vzorku vody, kultivaci na selektivně-diagnostických médiích, orientační identifikaci metodou MALDI-TOF, PCR detekci genu *ipaH* (kódujícího invazin a specifického pro shigely a enteroinvazivní *E. coli*) (14), rodové a druhové identifikaci na základě biochemických reakcí a sérotypizaci skličkovou aglutinací.

### Potřeby:

- běžné vybavení mikrobiologické laboratoře,
- zařízení na membránovou filtraci a sterilní membránové filtry o porozitě  $0,45 \mu\text{m}$ ,
- pomnožovací média: Na selenitové médium, GN bujón o pH 8 (dle Hajna),
- selektivně-diagnostická média MacConkey agar, DC agar, XLD agar, Hektoen enteric agar (15), případně Chromocult Coliformen agar (dále CCA, běžně používaný ke stanovení koliformních bakterií v laboratořích hygieny vody),
- potřeby pro biochemickou diagnostiku (diagnostické sety, konvenční biochemické půdy nebo komerční biochemické testy), MALDI-TOF a molekulárně-genetickou (zařízení na PCR),
- potřeby pro sérotypizaci (komerční antiséra, sklička, fyziologický roztok).

### Pracovní postup:

- Podle očekávaného znečištění se odebere vzorek za sterilních podmínek a za stálého chlazení se dopraví do laboratoře tak, aby jej bylo možné zpracovat max. do 18 hodin po odběru. Odebraný objem vzorku se řídí očekávanou kontaminací, ale v případě pitné vody by měly být vždy odebrány minimálně 2 litry.
- Vzorek se zkoncentruje membránovou filtrací. Pro pitnou vodu koncentrujeme minimálně 1000 ml pro každé pomnožovací médium; pro povrchovou vodu a pro odpadní vodu filtrujeme obvykle 500 ml, ale kvůli možnému nespecifickému nárůstu ostatních bakterií z čeledi

*Enterobacteriaceae* filtrujeme i malé objemy, např. 1 ml, 10 ml, 100 ml. Používáme sterilní membránové filtry o porozitě 0,45 µm. Srolované membránové filtry se poté sterilně umístí paralelně do dvou pomnožovacích médií (Na selenitové médium a GN bujón).

- V Na selenitovém médiu inkubujeme 18 hodin při 36–37 °C, v GN bujónu inkubujeme 9 hodin při 36–37 °C. Poté vyočkujeme pomnoženou kulturu do jednotlivých kolonií na různá selektivně-diagnostická média: MacConkey agar, DC agar, XLD agar, Hektoen enteric agar, případně i CCA. V případě analýzy pitné vody, u které se neočekává velký obsah doprovodné mikroflóry, lze membránové filtry paralelně umístit přímo na výše uvedená selektivně-diagnostická média.
- Identifikace: typické kolonie (laktóza negativní, světlé, apod.) se ověří na MALDI-TOF (tato metoda je však jen orientační, neboť *Shigella* bývá na MALDI-TOF identifikována jako *Escherichia*), dále se provede průkaz genu kódujícího invazin IpaH pomocí PCR. Izolace DNA na PCR bývá prováděna paralelně i z mikrobiální biomasy narostlé na membránovém filtru. Izoláty suspektních shigel jsou následně identifikovány do druhu využitím komerčních nebo konvenčně připravených (většinou zkumavkových) biochemických testů. Potvrzené izoláty shigel jsou sérotypovány sklíčkovou aglutinací.

## 2. Detekce *Yersinia enterocolitica*

Modifikace postupu spočívá především v modernizaci používaných kultivačních médií a využití moderních diagnostických metod (PCR, MALDI-TOF, sérotypizace, apod.). Modifikaci navrhl Oddělení stafylokokových a alimentárních bakteriálních infekcí (SABI) z Centra epidemiologie a mikrobiologie Státního zdravotního ústavu.

**Charakteristika:** *Yersinia enterocolitica* je gramnegativní tyčinka o rozměrech 0,8–3 µm × 0,8 µm z čeledi *Enterobacteriaceae* opatřená peritrichálními bičíky. Přežívá v prostředí při pokojové teplotě různě dlouhou dobu, ve studniční vodě do 6 týdnů, v povrchové vodě s obsahem organických látek déle než rok (16). K nejčastějším biosérotypům *Y. enterocolitica* vyvolávajícím humánní onemocnění patří 1B/O8, 2/O5, 27, 2/O9, 3/O3 a 4/O3 (16).

Je pohyblivá při pokojové teplotě, ale ne při 37 °C. Je růstově nenáročná, na DC agaru tvoří malé kulaté kolonie s celistvým okrajem o průměru 1 mm. Růstové optimum je 29 °C, roste však dobře i při nízkých teplotách 4–7 °C, čehož se využívá při izolaci z kontaminovaného materiálu (15). Jako selektivní půda pro izolaci je vhodný CIN agar (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin agar) potlačující růst jiných enterobakterií (17). Z biochemických vlastností je pro ní charakteristická hydrolýza močoviny.

**Princip stanovení:** Princip stanovení spočívá v selektivním pomnožení zkoncentrovaného vzorku vody, kultivaci na selektivně-diagnostických médiích a identifikaci na základě biochemických reakcí, případně MALDI-TOF (metodou hmotnostní spektrometrie lze spolehlivě dourčit do druhu) a sérotypizaci.

### Potřeby:

- běžné vybavení mikrobiologické laboratoře,
- zařízení na membránovou filtraci a sterilní membránové filtry o porozitě 0,45 µm,



- pomnožovací média: selektivní Rappaport-Vassiliadisovo médium (17) nebo fyziologický roztok s fosfátovým pufrům (16),
- selektivně-diagnostická média: CIN agar,
- potřeby pro diagnostiku biochemickou (diagnostické sety) nebo MALDI-TOF,
- potřeby pro sérotypizaci (PCR nebo sklíčková aglutinace).

#### Pracovní postup:

- Podle očekávaného znečištění se odebere vzorek za sterilních podmínek a za stálého chlazení se dopraví do laboratoře tak, aby jej bylo možné zpracovat max. do 18 hodin po odběru. Odebraný objem vzorku se řídí očekávanou kontaminací, ale v případě pitné vody by měl být odebrán vždy minimálně 1 litr.
- Vzorek se zkoncentruje membránovou filtrací (pro pitnou vodu koncentrujeme minimálně 500 ml pro každé médium). Používáme sterilní membránové filtry o porozitě 0,45 µm. Srolované membránové filtry se poté sterilně umístí do pomnožovacího média (Rappaport-Vassiliadisovo médium) a paralelně se pokládá přímo na CIN agar.
- Kultivace v pomnožovacím médiu probíhá při teplotě 30 °C (někdy i při laboratorní teplotě) až 21 dní a po 7 dnech i na konci kultivační doby se pomnožená kultura vyočkuje na CIN agar.
- Paralelně se provádí tzv. chladové pomnožení. Srolovaný inokulovaný membránový filtr se umístí do 10 ml fyziologického roztoku s fosfátovým pufrům (nebo Rappaportova bujónu) a inkubuje se 4–5 dní (nebo až 21 dní) při 4 °C. Po 5, resp. 7 a 21 dnech se vyočkovává na CIN agar.
- Kultivace na CIN agaru (jak membránového filtru, tak pomnožené kultury) probíhá 24 až 48 hodin při 30 °C nebo paralelně i při 28 nebo 37 °C.
- Identifikace: typické kolonie (světle růžové kolonie s tmavě červeným středem) se dále identifikují do druhu biochemicky nebo metodou MALDI-TOF. Dále se provede sérotypizace.

### 3. Detekce mikroskopických hub

**Charakteristika:** Pod názvem mikromycety rozumíme mikroskopické houby, které na speciálních agarových médiích vytvářejí vláknité nebo hladké (kvasinkovité) kolonie. Typické „vodní houby“ (Chytridiomycota a Oomycota) žijí většinou saprofytycky ve vodním prostředí a z hygienického hlediska nemají význam. Jejich izolace a identifikace je obtížná. Toto stanovení se týká tzv. pravých hub (Eumycota) patřících do tříd Zygomycetes, Endomycetes, Ascomycetes, Deuteromycetes (Fungi imperfecti) a Mycelia sterilis. Zástupci třídy Basidiomycetes se ve vodě prakticky nevyskytují. Většina mikromycet nalezených ve vodě patří k druhům žijícím v půdě a do vody se dostávají druhotně, např. vyplavením z půdy, větrem nebo s různými organickými zbytky živočišného nebo rostlinného původu, jejichž rozkladu se mohou intenzivně zúčastnit. Mohou se zde vyskytnout i mikromycety, o nichž je známo, že vyvolávají nebo za určitých okolností (tzv. oportunní mykoorganismy) mohou vyvolat lidská onemocnění. Jde o nepříliš početný, ale přece jen dost pestrý výběr mikromycet. Mikromycety mohou

ve vodním prostředí přežívat ve formě spor či jiných odpočinkových struktur nebo částí vláken, málokdy tu však dochází k jejich pomnožování.

**Princip stanovení:** Stanovení počtu mikromycet (kolonie tvořících jednotek) vyrostlých na speciálních agarových živných půdách z určitého objemu vzorku vody.

Vzorek očkujeme buď přímo na povrch média, nebo použijeme membránové filtrace.

Po kultivaci v termostatu počítáme množství vyrostlých kolonií, případně provádíme jejich izolaci a identifikaci.

**Metody stanovení:** V současné době stále není jednotná metodika tohoto stanovení, rozdíly v metodologii uváděné v odborné literatuře jsou značné. Liší se objem vyšetřeného vzorku vody od 1 ml přímo aplikovaného na médium až po membránovou filtrací vyšetřený objem 20–1000 ml. Různá jsou i kultivační média a další identifikace, použitá inkubační teplota kolísá v rozmezí 20–37 °C. Nejčastěji se pro stanovení patogenů používají média Sabouraudův agar (případně s chloramfenikolem), Czapek-Dox agar či sladinkový agar. Je vhodné použít paralelně minimálně 2 různá média. Je možné zaslat do specializované laboratoře ke confirmaci i kolonie vyrostlé na tryptózovém médiu s kvasničným extraktem, které se používá k detekci kultivovatelných mikroorganismů ve vodách.

Poznámky ze zahraniční literatury: Americké Standardní Methody, ed. 19<sup>th</sup> z roku 1992 (18) uvádí následující média pro stanovení mikromycet: neopepton- glucose-rose bengal – aureomycin agar, Czapek nebo Czapek-Dox agar, pro kvasinky Yeast extract- Malt extract- glucose agar, nebo Malt extract agar. Uveden je též Neopeptone-glucose agar. Němečtí autoři (19) použili pro mykologická vyšetření pitných vod Blood agar base a Oxoid a vyšetřovali 1 ml vody (vyrostlé kolonie mikromycet byly dále přeneseny na PDA agar, Merck (Potato-dextrose agar) a MEA agar, Merck (Malt extrakt agar). Norská šetření pitných vod (20) se opírala o objemy 100 ml vody zpracované membránovou filtrací s kultivací při 20 °C na médiu DN - 18 agar (dichloran 18% glycerol agar), se kterým získali nejlepší zkušenost a výsledky, co se týče kvantity i kvality před ostatními, např. DRBC médium (dichloran rose bengal chloramfenikol agar) a jinými médii s obsahem bengálské červeni.

#### 4. Detekce rodu *Streptomyces*

**Charakteristika:** Rod *Streptomyces*, tvořící coenocytická grampozitivní vlákna o průměru 0,5–2 μm, je řazen do čeledi *Streptomycetaceae*. Na pevném podkladě vytváří různě modifikovaná vzdušná mycelia nesoucí velká množství spor. Podle složení živného substrátu produkují jednotlivé druhy celou řadu antibiotik, pigmentů a dalších, často výrazně páchnoucích metabolitů. V naprosté většině se jedná o saprofytické organismy, výrazně aerofilní, zkvašující glukózy, hydrolyzující želatinu, kasein a škrob, redukcující nitráty a mající schopnost využít chitin jako zdroj organického dusíku. Teplotní optimum je 25–30 °C, optimální pH je 6,5–8.

**Princip stanovení:** Stanovení spočívá v kultivaci vzorku vody na pevných kultivačních médiích dle Krajinského a Waksmana s přidavkem streptomycinu a cycloheximidu pro potlačení nežádoucího růstu mikroflóry a mikromycet.

**Potřeby:**

- běžné vybavení mikrobiologické laboratoře,
- diagnostická média agar dle Krajinského a agar dle Waksmana,
- sterilní fyziologický roztok,
- antibiotika streptomycin, cykloheximid s přípravou: ve 2 ml sterilního fyziologického roztoku se rozpustí 40 mg cykloheximidu a 80 mg streptomycinu. Na povrch plotny se pak nanese 0,05 ml každého z takto připravených roztoků, tj. 2 mg cykloheximidu a 4 mg streptomycinu. Vlastní preparaci je nutno provést na předsušené plotně těsně před nanesením vzorku. U naočkovaných ploten se nechá při teplotě 37 °C (v termostatu) odpařit přebytečná vlhkost. Plotny se pak uzavřou a kultivují při teplotě 22–25 °C po dobu minimálně 14 dnů. Během této doby se naočkované plotny průběžně kontrolují, nebo se prodlouží kultivační doba.

**Pracovní postup:**

- Podle očekávaného znečištění se odebere vzorek (hladinová vrstva) za sterilních podmínek a za stálého chlazení se dopraví do laboratoře tak, aby jej bylo možné zpracovat max. do 18 hodin po odběru. Odebraný objem vzorku se řídí očekávanou kontaminací, ale běžně se odebírá 100 ml.
- Povrch médií se těsně před očkováním připravuje roztokem streptomycinu a cykloheximidu.
- Na povrch kultivačních médií – agaru dle Krajinského a agaru dle Waksmana, rozlitých v Petriho miskách a předsušených se pipetou naočkuje po 1 ml vzorku či případně jeho ředění. Vzhledem k možnosti přerůstání plotny doprovodnou mikroflórou včetně mikromycet, očkují se paralelně vždy 2–3 plotny od každého média.
- Případná izolace narostlých kolonií se provádí na šikmém agaru (Krajinský, Waksman) a identifikace mikroskopicky dle tvaru vzdušného mycelia podle dostupného identifikačního klíče ve specializované laboratoři.

## 5. Detekce Shiga toxin produkujících *Escherichia coli*

Postup byl navržen ve spolupráci Oddělení hygieny vody a Oddělení stafylokokových a alimentárních bakteriálních infekcí Státního zdravotního ústavu.

**Charakteristika:** Shiga toxin-produkující *E. coli* (STEC) jsou původci průjmového onemocnění různé závažnosti, které může být komplikováno rozvojem hemolyticko-uremického syndromu (HUS). Schopnost vyvolat HUS činí STEC nejzávažnějším patotypem průjem vyvolávajících *E. coli*. K celosvětově nejčastějším séro skupinám patří O157, O26, O111, O103, O145, O121 a O45. Ke zvýšení pravděpodobnosti detekce a úspěšné izolace kmene STEC z primárního materiálu (tam, kde se očekává snížené množství bakterií STEC, ať už v důsledku pozdního odběru nebo nižší koncentrace, např. ve vodě) se používá imunomagnetická separace (IMS) s užitím komerčně dostupných reagensů proti séro skupinám O157, O26, O111, O103 a O145, případně dalších (21, 22).

**Princip stanovení:** Princip stanovení spočívá v selektivním pomnožení zkoncentrovaného vzorku vody, IMS, kultivaci pomnoženého vzorku (a paralelně vzorku zpracovaného IMS) na selektivně-diagnostických médiích, identifikaci na základě detekce genů kódujících Shiga toxiny metodou PCR, identifikaci rodové a druhové metodou MALDI-TOF, případně biochemickými testy, dále sérotypizaci k určení O antigenu.

**Potřeby:**

- běžné vybavení mikrobiologické laboratoře,
- zařízení na membránovou filtraci a sterilní membránové filtry o porozitě 0,45 µm,
- pomnožovací médium: GN bujón (dle Hajna),
- selektivně-diagnostická média: SMAC agar (MacConkey agar se sorbitolem), CT SMAC (MacConkey agar se sorbitolem, cefiximem a teluritem), EHLy agar (speciální krevní agar pro detekci hemolyzinu produkovaného STEC, tzv. EHEC-hemolyzinu), případně CCA,
- potřeby pro diagnostiku molekulárně-genetickou (PCR pro detekci genů kódujících Shiga toxiny a některé O antigeny) a sklíčkovou aglutinaci,
- potřeby pro IMS, MALDI-TOF, biochemickou diagnostiku.

**Pracovní postup:**

- Podle očekávaného znečištění se odebere vzorek za sterilních podmínek a za stálého chlazení se dopraví do laboratoře tak, aby jej bylo možné zpracovat max. do 18 hodin po odběru. Odebraný objem vzorku se řídí očekávanou kontaminací, ale v případě pitné vody by měly být vždy odebrány minimálně 2 litry.
- Vzorek se zkoncentruje membránovou filtrací (pro pitnou vodu koncentrujeme minimálně 1000 ml pro každé médium). Používáme sterilní membránové filtry o porozitě 0,45 µm. Srolované membránové filtry se poté sterilně umístí do pomnožovacího média (GN bujón), případně paralelně i na selektivně-diagnostické půdy (SMAC, CT SMAC) a dále CCA agar, který se standardně používá na detekci koliformních bakterií a *E. coli*.
- GN bujón inkubujeme 24 hodin při 36–37 °C. Poté vyočkujeme pomnoženou kulturu (a paralelně i pomnoženou kulturu zpracovanou IMS) do jednotlivých kolonií na různá selektivně-diagnostická média: SMAC, CT SMAC, EHLy agar, případně i CCA.
- Kultivace na pevných selektivně-diagnostických médiích probíhá 24 hodin při 36–37 °C.
- Identifikace: typické kolonie (sorbitol pozitivní i negativní na SMAC a CT SMAC, EHEC-Hly pozitivní na EHLy agaru) přeočkujeme a podrobíme PCR na detekci genů pro Shiga toxiny a vybrané O antigeny (O26, O157, ...). Izolace DNA na PCR bývá též prováděna z mikrobiální biomasy narostlé na membránovém filtru. Současně se provádí PCR z celkové biomasy („směsné kultury“) narostlé po vyočkování pomnoženého bujónu (a paralelně pomnoženého bujónu zpracovaného IMS) na pevná selektivně-diagnostická média (21).

## Literatura:

1. Jednotné metody detekce nových mikrobiálních kontaminant pitné vody. Acta Hyg Epidemiol Microbiol. 1990;příloha 5:1-34.
2. World Health Organization. Surveillance and outbreak management of water-related infectious diseases associated with water-supply systems. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2019.
3. ČSN ISO 17995 (757875): Kvalita vod - Stanovení termotolerantních bakterií rodu *Campylobacter*. Praha: Česká agentura pro standardizaci; 2021.
4. ČSN 757840 (757840): Kvalita vod - Stanovení atypických mykobakterií ve vodě. Praha: Česká agentura pro standardizaci; 2022.
5. ČSN EN 14486 (757885): Jakost vod - Stanovení lidských enterovirů pomocí zkoušky jednovrstvých plaků. Praha: Český normalizační institut; 2005.
6. World Health Organization. Expanded Programme on Immunization and Division of Communicable Diseases. Manual for the virological investigation of poliomyelitis. Geneva: WHO; 1990.
7. ČSN EN ISO 10705-2 (757871): Jakost vod - Průkaz přítomnosti a kvantitativní stanovení bakteriofágů - Část 2: Kvantitativní stanovení somatických kolidfágů. Praha: Český normalizační institut; 2002.
8. ČSN ISO 10705-3 (757871): Kvalita vod - Průkaz přítomnosti a kvantitativní stanovení bakteriofágů - Část 3: Validace metod pro zkoncentrování bakteriofágů z vody. Praha: Česká agentura pro standardizaci; 2020.
9. ČSN ISO 10705-1 (7578771): Jakost vod - Průkaz přítomnosti a kvantitativní stanovení bakteriofágů - Část 1: Kvantitativní stanovení F-specifických RNA bakteriofágů. Praha: Český normalizační institut; 1996.
10. ČSN ISO 19250 (757855): Jakost vod - Průkaz přítomnosti bakterií rodu *Salmonella*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví; 2011.
11. ČSN EN ISO 11290-2 (560093): Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* a *Listeria spp.* - Část 2: Metoda stanovení počtu. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví; 2017.
12. ČSN EN ISO 15216-1 (560087): Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda pro stanovení viru hepatitidy A a noroviru pomocí RT-PCR v reálném čase - Část 1: Metoda pro kvantitativní stanovení. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví; 2017.
13. ČSN EN ISO 9001 (010321): Systémy managementu kvality - Požadavky. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví; 2016.
14. Li Y, Cao B, Liu B, Liu D, Gao Q, Peng X, et al. Molecular detection of all 34 distinct O-antigen forms of *Shigella*. J Med Microbiol. 2009 Jan;58(Pt 1):69-81.
15. ČSN EN ISO 21567 (560134): Mikrobiologie potravin a krmiv - horizontální metoda průkazu bakterií rodu *Shigella*. Praha: Český normalizační institut; 2005.
16. Standardní metody laboratorní diagnostiky nákaz vyvolaných druhem *Yersinia enterocolitica*. Acta Hyg Epidemiol Microbiol. 1981;příloha 6:1-20.
17. Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Funke G, Landry ML, Richter SS, et al. Manual of clinical microbiology. 11th ed. Washington, DC: ASM press; 2015.

18. Baird RB, Eaton AD, Rice EW, editors. Standard methods for the examination water and wastewater. 23th ed. Washington, DC.: APHA; 2017.
19. Göttlich E, van der Lubbe W, Lange B, Fiedler S, Melchert I, Reifenrath M, et al. Fungal flora in groundwater-derived public drinking water. *Int J Hyg Environ Health*. 2002 May;205(4):269-79.
20. Hageskal G, Gaustad P, Heier BT, Skaar I. Occurrence of moulds in drinking water. *J Appl Microbiol*. 2007 Mar;102(3):774-80.
21. Ileninová Z, Klimešová P, Schlosserová K, Kotiš J, Kseničová L, Daniel O, et al. Laboratorní diagnostika Shiga toxin-produkujících *E. coli* v Národní referenční laboratoři pro *E. coli* a shigely a metodická doporučení pro klinické laboratoře. *Zpr Cent Epid Mikrobiol*. 2022;31(1):15-22.
22. Kraft AL, Lacher DW, Shelver WL, Sherwood JS, Bergholz TM. Comparison of immunomagnetic separation beads for detection of six non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in different matrices. *Lett Appl Microbiol*. 2017;65(3):213-19.

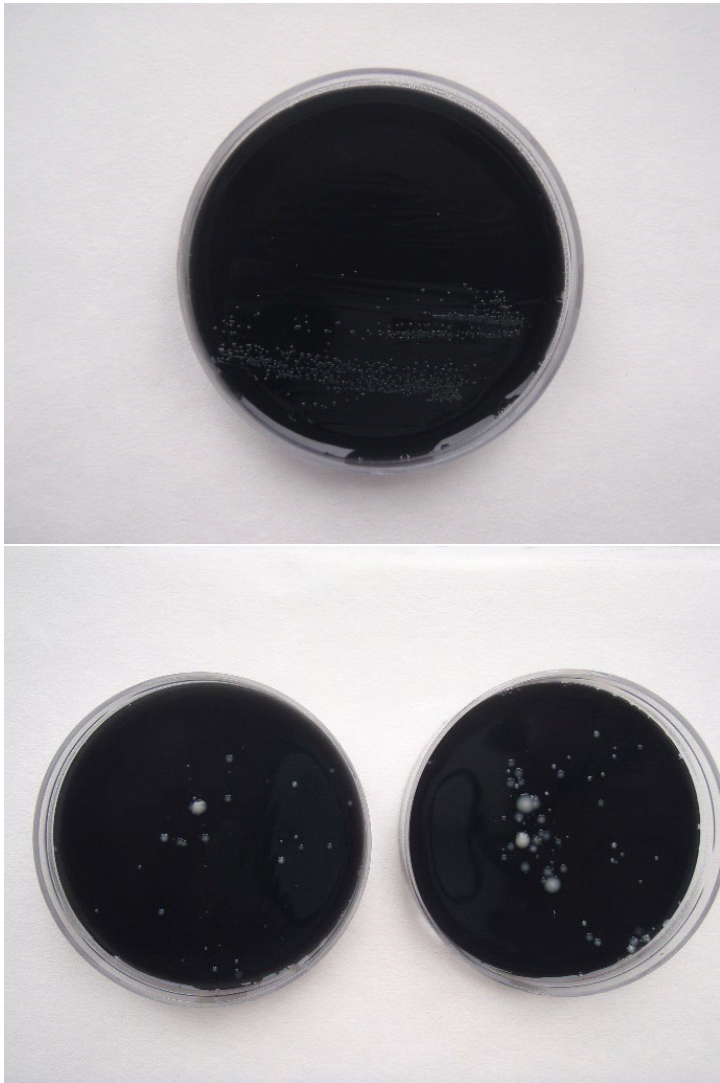
## Přílohy

### Souhrnný přehled metod detekce vybraných mikrobiálních kontaminantů pitné vody

<b>Ukazatel</b>	<b>Původní metoda stanovení</b>	<b>Nová metoda stanovení</b>
Shigely	strana 1 AHEM př. č. 5/1990	modifikováno
<i>Yersinia enterocolitica</i>	strana 4 AHEM př. č. 5/1990	modifikováno
<i>Campylobacter jejuni</i>	strana 10 AHEM př. č. 5/1990	ČSN ISO 17995
Mikromycety	strana 14 AHEM př. č. 5/1990	ponecháno, poznámky
Mykobakteria	strana 17 AHEM př. č. 5/1990	ČSN 757840
Enteroviry	strana 21 AHEM př. č. 5/1990	WHO – Manual for the virological investigation of poliomyelitis
Kolifágy	strana 25 AHEM př. č. 5/1990	ČSN (EN) ISO 10705-1,2,3
<i>Streptomyces</i>	strana 28 AHEM př. č. 5/1990	ponecháno
Salmonely	-	ČSN EN ISO 19250
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	ČSN EN ISO 11290-2
Shiga toxin-produkující <i>E. coli</i>	-	viz uvedený popis
Enterické viry	-	ČSN EN ISO 15216-1

## Obrazová příloha

Foto: Dana Baudišová, Monika Havlíčková, Státní zdravotní ústav.

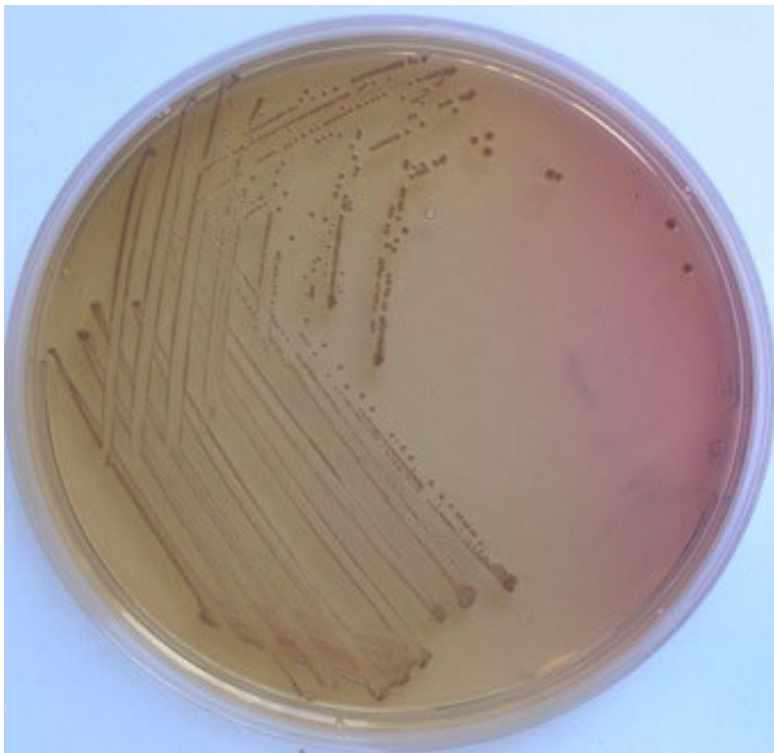


*Campylobacter spp.* – vlevo *C. jejuni* – čistá kultura, vpravo izolace kampylobakterů z povrchové vody na mCCDA agaru.





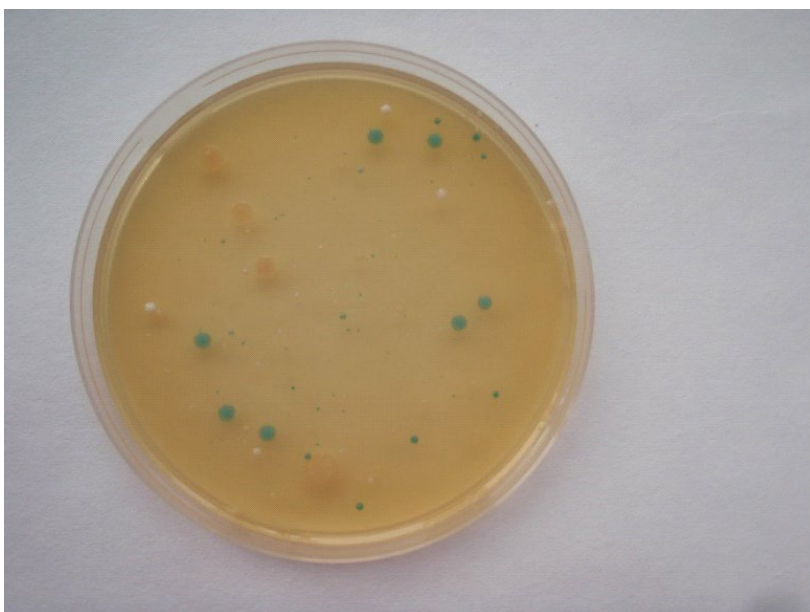
Sorbitol-nefermentující STEC O157:H7: typické sorbitol negativní (průhledné) kolonie na SMAC agaru.



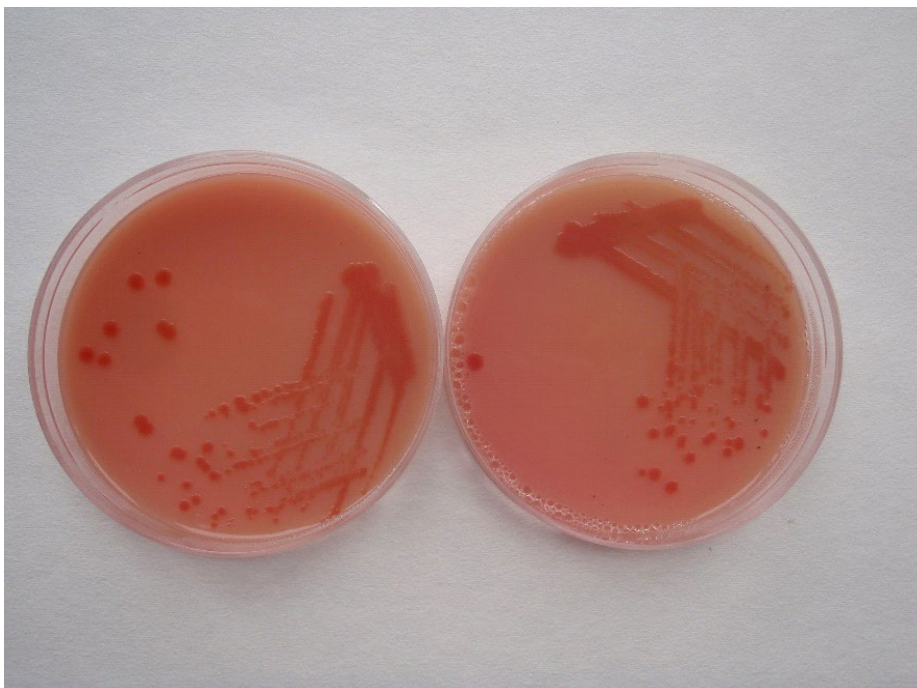
Sorbitol-nefermentující STEC O157:H7 na CT SMAC (průhledné kolonie s černým středem v důsledku redukce teluritu).



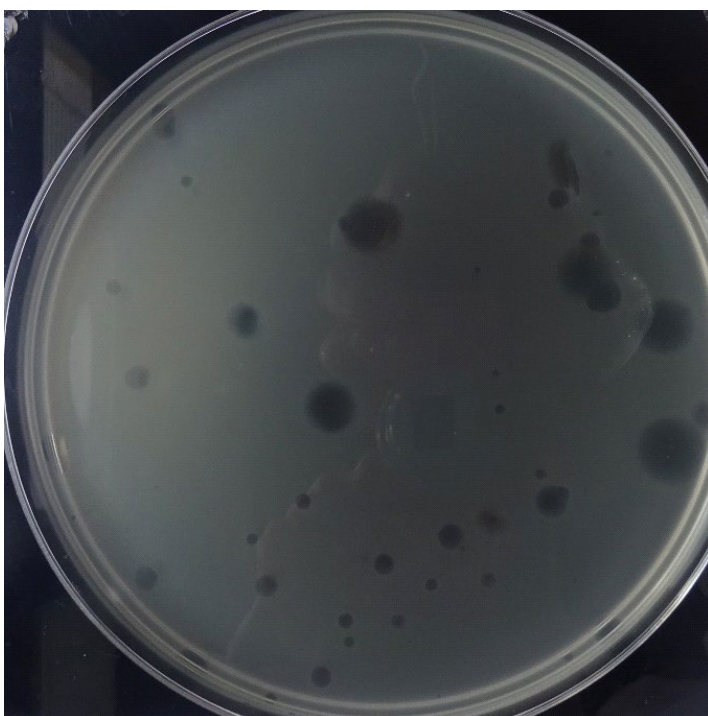
EHLV hemolýza: úzká, neúplná hemolýza vyvolaná hemolyzinem STEC (tzv. EHEC hemolyzin).



*Listeria monocytogenes* – izolace z odpadní vody. Listerie tvoří na ALOA agaru typické tyrkysové kolonie.



*Salmonella enteritidis* na Rambachově agaru.



Stanovení somatických kolifágů plakovou titrací ze vzorku surové vody.