

Datum: 2. 1. 2025
Číslo jednací: SZU/00042/2025

Věc: Informace SZÚ – Národního referenčního centra pro pitnou vodu k možnostem screeningové detekce mikrobiální (fekální) kontaminace pitné vody

Úvod

Standardní mikrobiologický rozbor pitné vody se podle platné legislativy (1) provádí podle předepsaných (normovaných) kultivačních metod. Jak již z této charakteristiky vyplývá, vzorky vody se kultivují, což zabere určitý čas a první výsledky stanovení jsou k dispozici nejdříve po 18 hodinách od zpracování vzorku, resp. uložení „detektoru“ do příslušného termostatu (viz tab. 1). Přestože patogenních mikroorganismů, které mohou způsobovat onemocnění z kontaminované pitné vody je celá řada (2), za nejdůležitější se považují střevní (enterické) patogeny, jejichž možnou přítomnost v kontaminované vodě indikují tzv. indikátory fekálního znečištění v čele s bakterií *Escherichia coli*. Za nespornou výhodu těchto standardizovaných metod lze považovat především to, že jsou velmi běžně dostupné, a toto stanovení může provést kterákoliv laboratoř mikrobiologie vody. Jen je třeba dbát na to, aby byl vzorek správně odebrán a zpracován max. do 18 hodin po odběru (a nedocházelo k nadbytečným prodlevám v rámci zprostředkujících odběrových firem, či termínu svozových akcí).

Tab. 1: Přehled dostupných standardních metod ke stanovení indikátorů fekálního znečištění

Ukazatel	Normalizovaná metoda	Výsledek poskytne za dobu (v hod)	Poznámka
<i>E. coli</i>	ČSN EN ISO 9308-2	18 - 24	Colilert® – 18/Quanti-Tray®
<i>E. coli</i>	ČSN EN ISO 9308-1	21 ± 3 (po 8 hodinách inkubace lze na membránovém filtru pozorovat mikrokolonie)	Médium CCA
Enterokoky	ČSN EN ISO 7899-2	(44 ± 4) + 2 *	Média SB a ŽEA
<i>Clostridium perfringens</i>	ČSN EN ISO 14189	(21 ± 3) + (21 ± 3) **	Médium TCA, konfirmasi kyselou fosfatázou

* Základní doba kultivace je 44 ± 4 hodiny, poté je třeba confirmace, která trvá 2 hodiny. Pokud nevyrostly žádné kolonie, lze negativní výsledek potvrdit již po 44 hodinách.

** (21 ± 3) hodin je základní doba kultivace. Pokud nevyrostou žádné presumptivní kolonie, je potvrzen negativní výsledek. Jinak se podezřelé kolonie přeočkují a po dalších (21 ± 3) hodinách kultivace se provádí confirmační test na kyselou fosfatázu. Dnes však i činidla, která umožní detekovat kyselou fosfatázu v rámci primární kultivace, nebo přímo poté (selektivní suplement s cykloserinem a 4-methylumbelliferyl-fosfátem, nebo činidlo pro kyselou fosfatázu od firmy SIFIN).

Poslední dobou dochází v souvislosti s klimatickou změnou k nerovnoměrnému rozložení srážek, a to může vést k častějším intenzivnějším epizodám, tj. přívalovým deštům a povodním, což může způsobit zaplavení a mikrobiální kontaminaci zejména více zranitelných vodních zdrojů, které je třeba otestovat. Díky tomu sice začíná být poptávka po metodách, které poskytují rychlejší výsledky

mikrobiologických analýz, na druhé straně je dobré si uvědomit, co přesně takové „krizové situace“ potřebují. A právě přehled a hodnocení těchto možností je předmětem předloženého informačního sdělení, **které má sloužit především laboratorním provádějícím rozbory pitné vody.** Informativně však může posloužit i orgánům ochrany veřejného zdraví a výrobcům pitné vody, popř. zástupcům postižených obcí.

Specifikace účelu testování

K testování lze využít několik možných přístupů, z nichž každý má své výhody a nevýhody. Každý zainteresovaný (postižený) subjekt by jistě uvítal, aby byly k dispozici rychlé a cenově dostupné (byť orientační) metody k detekci mikrobiálního (fekálního) znečištění a i většina firem dodávající potřeby pro mikrobiologické laboratoře takové metody vyvíjí a nabízí. Problémem je však jejich dostupnost a to především ekonomická. Nejde jen o to, že alternativní metody jako takové nejsou nijak levné, ale aby byly okamžitě k dispozici v případě potřeby, je nutné jejich udržování ve funkčním stavu v dlouhé časové periodě bez dalšího využití (chemikálie s dobou expirace, dostatečný a vhodně proškolený personál s určitou časovou flexibilitou apod.), což si prakticky žádný subjekt nemůže dovolit nebo jen opravdu velké laboratoře.

Je třeba si uvědomit, jestli jde opravdu především o čas. V případě jakéhokoliv podezření na kontaminaci vodního zdroje (i s využitím jednoduchých fyzikálně chemických a senzorických metod: změna barvy, zákalu, konduktivity, pachu či chuti vody) je nutné vodní zdroj odstavit (přestat používat) a využít konzumaci balené vody či nouzového zásobování. Poté se situace řeší dál (sanace, případné opravy) a poté samozřejmě přijde na řadu ta nezbytná kontrola s tím, že opravdu významný čas zabere práce připravující vlastní akci, tj. vzorkování, zajištění vhodné laboratoře s dostatečnou kapacitou, zajištění vhodných vzorkovnic, vlastní odběr vzorků, transport vzorků do laboratoře, a příjem vzorků. Z tohoto výčtu vyplývá, že tento přípravný proces zabere tolik času, že (zejména kdyby byla dlouhá svozová trasa) ušetření cca 10 hodin (což může být rozdíl mezi získáním výsledku rychlejší metodou oproti standardní) nemusí být nijak významné.

Příklady alternativních mikrobiologických metod pro analýzu vody

Na druhé straně je dobré znát alternativní metody, které lze využít při tzv. screeningu (v terénu přímo na místě), nebo ji mohou používat méně odborní, pouze zaškolení pracovníci (vzorkaři, provozovatelé, armáda, HZS). To může být v některých případech vhodné pro získání alespoň orientačních výsledků (terénní akce, možnost zúžení rozsahu odběrů a zpracování počtů vzorků, apod.). V každém případě spolehlivost těchto orientačních metod významně závisí na masívnosti mikrobiální kontaminace – čím větší znečištění, tím rychlejší a spolehlivější jsou získané výsledky). V tabulce 2 je uveden přehled alternativních metod stanovení mikrobiální kontaminace, jejich charakteristika, včetně výhod a nevýhod. Další podrobnosti u metod, se kterými máme praktické zkušenosti, jsou uvedeny v textu nad tabulkou. Jako „rychlometody“ mohou mít význam pro praktické využití pouze metody, které poskytnou výsledky maximálně během 1 pracovního dne (tj. do 8 hodin). Výčet metod zcela jistě není úplný, uvádíme pouze metody, se kterými jsme se alespoň v nějaké formě setkali.

Stanovení ATP

Stanovení adenosintrifosfátu (ATP) je nespecifické stanovení, které detekuje „obecné“ mikrobiální znečištění (3). I když může mít určitý vztah s fekální kontaminací, jednoznačné důkazy pro zdroje pitné vody (dostatek analyzovaných vzorků) zatím nejsou. Nespornou výhodou je, že se jedná o jednoduché terénní stanovení, které může provádět pracovník pouze proškolený, a tudíž se může využít např. při výběru (resp. zúžení počtů) odebraných vzorků. V současné době je však pouze minimum laboratoří, které mají tento systém k dispozici. Firma Hygiena začíná dodávat i test

Microsnap *E. coli*, se kterým však zatím nemáme žádné zkušenosti. Tento test by měl detekovat *E. coli* „během pracovního dne“, nicméně stanovení zahrnuje i několikahodinovou kultivaci, tudíž není použitelný jako terénní měření. Ověření funkčnosti tohoto testu se budeme nadále věnovat.

Metody molekulární biologie

Přestože metody molekulární biologie mají velký potenciál a rutinně se používají v klinické nebo potravinářské mikrobiologii, toto uplatnění zatím nenalezly v mikrobiologii vody. Je to způsobeno především vysokou mezí detekce cílových mikroorganismů (200 - 500 KTJ) a vysokým obsahem doprovodné mikroflóry, tj. balastní DNA. Na metodikách, které by odlišily živou a mrtvou DNA, se v současnosti v České republice i ve světě pracuje. Stanovení např. *E. coli* metodami molekulární biologie existují (4), nicméně se provádějí pouze v nejspecializovanějších laboratořích a ne rutinně. Je to tedy pro rychlé využití velmi komplikované – a pokud by se netestovala větší série vzorků – i drahé.

Termotolerantní koliformní bakterie na M-7h-FC agaru:

Praktické zkušenosti s tímto médiem byly získány v několika českých laboratořích za povodní v r. 1997. Za příznivých podmínek (počet termotolerantních koliformních bakterií v analyzovaném vzorku je větší než 15 KTJ) je čas detekce 7 hodin, jak deklaruje výrobce i standardní metoda. Při méně příznivých podmínkách je doba stanovení asi 9 hodin. Médium M-7h-FC komerčně vyrábí např. firma HiMedia, nicméně dodací lhůta tohoto média (protože se v Evropě prakticky nepoužívá) je několik týdnů. Vzorek se zkoncentruje membránovou filtrací na filtrech o porozitě 0,45 µm, a kultivuje se při teplotě 41,5°C. Typické kolonie vykazují žlutou barvu, při jejich verifikaci bylo potvrzeno 97,3% žlutých kolonií, patřících do skupiny termotolerantních koliformních bakterií. Doba inkubace 9 hodin postačí k předběžné informaci o kontaminaci vzorku vody. Ponechání ploten za laboratorní teploty 12-24 hod umožní vybarvení netypických (nežlutých) kolonií. Metoda je orientační, její hlavní výhodou je minimální čas k poskytnutí první informace o znečištění – při vyšší mikrobiální kontaminaci okolností již za 7 hodin, jinak za 9 hodin.

Tab. 2 Přehled možností alternativního testování mikrobiální kontaminace vod

Metoda/ukazatel	Odkaz, výrobce	Výsledek poskytne za dobu (v hod)	Výhody	Nevýhody
Stanovení ATP	(3), Hygiena, Merck life, Ekotechnika	Okamžitě (20 sekund)	Jednoduché terénní stanovení	Zatím validováno pouze pro celkové mikrobiální znečištění
<i>E. coli</i> , enterokoky	IDEXX Water Tecta system	7-18 podle kontaminace	Jednoduché stanovení pro zaškolené pracovníky	Cenově náročnější, v jednom přístroji lze provést 16 stanovení
<i>E. coli</i> (a další ukazatele) – Metody molekulární biologie	(4)	8	Lze stanovit více druhů najednou	Nutné specializované pracoviště, mez detekce 500 KTJ/100 ml
Termotolerantní koliformní bakterie	(5) Himedia (médium M-7h-FC agar)	7-9	Jednoduchá laboratorní metoda, kterou by měla zvládnout každá laboratoř, prakticky vyzkoušeno	V tuto chvíli nemá žádná laboratoř metodu zavedenou, doba dodání média je 6-8 týdnů

Závěr

V tuto chvíli se zdá být nejjednodušší odvézt odebrané vzorky do běžné laboratoře mikrobiologie vody a provést stanovení *E. coli* standardizovanými metodami (dle ČSN EN ISO 9308-1 nebo lépe ČSN EN ISO 9308-2). Pro screening v terénu (pro případně zúžení počtů vzorků) lze využít terénní stanovení ATP, jehož použití u pitných vod bude dále zkoumáno.

Upozornění

Bakterie nemusí být jediným biologickým rizikem při povodních nebo jiných velkých srážkových epizodách resp. havarijních situacích. Zatímco ale virová problematika je co do možných nápravných opatření podobná té bakteriální, odlišná je situace u prvoků. Zde odkazujeme na naše metodické doporučení (6), které lze rovněž najít na webových stránkách Státního zdravotního ústavu.

Seznam literatury

- (1) Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, ve znění pozdějších předpisů.
- (2) Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first and second addenda ISBN 978-92-4-004506-4 (electronic version), WHO, 2022. Dostupné on-line: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240045064>
- (3) Baudišová D.: Význam a limity využití ukazatele ATP. Vodní hospodářství 5/2024, str. 10-12.
- (4) Bobková Š, Baudišová D., Mayerová L., Myšáková M., Kothan F., Pouzarová T., Pummann P.: Přístupy při monitorování mikrobiálního znečištění koupacích vod. Acta hygienica epidemiologica et microbiologica 2/2022.
- (5) Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (23 th. Ed). American Public Health Association, Washington, D.C. 2017 [9211 Rapid Detection Methods, 9211 B Seven-Hour Fecal Coliform Test].
- (6) Metodické doporučení SZÚ – Národního referenčního centra pro pitnou vodu k opatřením bránícím výskytu parazitických prvoků v pitné vodě. Leden 2005.

MUDr. František Kožíšek, CSc.
vedoucí NRC pro pitnou vodu

Připravila: RNDr. Dana Baudišová, Ph.D., tel. 267082575, e-mail dana.baudisova@szu.cz