



Hodnocení výsledků PT/V/3/2024 a Novinky v mikrobiologii vody

RNDr. Dana Baudišová, Ph.D.

Program

Příprava a hodnocení PT#V/3/2024

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

Novinky v mikrobiologii vody

- Zákon o ochraně veřejného zdraví schválen, nová vyhláška vyšla
- Nové normy/metody
- Testování membránových filtrů
- Enterokoky v pitných vodách



Příprava PT #V/3/2024



Vzorek A – Organotrofní mikroorganismy

Cíl:

- Nenulové hodnoty
- Nechceme *Bacillus a aktinomycety*

Lokalita – park Na Jezerce, Praha 4

	PK 22	PK 36
	KTJ/ml	KTJ/ml
18.03.2024	1350	210
09.04.2024	775	55
14.04.2024	1183	75



Vzorek B a C

– indikátory fekálního znečištění

Povrchová voda o různém stupni fekálního znečištění (Vltava Sedlec).

Výsledky 3 dny před odběrem vzorků na PT 3 2024 (10.4.2024):

TC CCA	EC CCA	Enterokoky	CP
KTJ/10 ml	KTJ/10 ml	KTJ/10 ml	KTJ/10 ml
800	100	18	38



Vzorek D (podmíněné patogeny)

Vzorek D – uměle připravený vzorek. Bakteriální kmeny (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* izolované z biokoupališť a ověřené metodou MALDI TOF) byly 24 hodin při $(36 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ kultivovány na KA. Poté byla na základě opakovaného testování připravena suspenze o vhodné denzitě. Příslušný objem této suspenze byl dále přidán do 6 litrů fyziologického roztoku z odstáté pitné vody (předem otestované na obsah volného chloru a pH) ve sterilní nádobě a vše bylo důkladně zhomogenizováno a za stálého míchání ihned rozplněno.



A11 (++) (A)	ORPA1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.25	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.99
A12 (++) (A)	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.25	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.86
++ (A)	ORSA1	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.35	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.33
B3 (++) (A)	2	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.21	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.21

Vzorek E – legionely

Vzorek E – Přirozený vzorek teplé vody. V březnu a dubnu 2024 bylo provedeno ověření potenciálního zdroje vody, což je teplá užitková voda (v panelovém domě v Praze 10 a v SZÚ, místnost 111). Vzorek byl odebrán po dvouminutovém odtočení do 2*3 litrové nádoby. Po zchladnutí na laboratorní teplotu byla ověřena absence volného chloru, vzorek byl smíchán, zhomogenizován a za stálého míchání ihned rozplněn.

		KTJ/100 ml
SZÚ	5.2.	3400
Jahodová	5.2.	4400
SZÚ	18.3.	1800
Jahodová	18.3.	9600
SZÚ	8.4.	1600
Jahodová	8.4.	3400
mix	14.4.	3570



PT - #V/3/2024 - 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.

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
PK 22°C	824	440 -1208	80 %
PK 36°C	75	17-132	95 %

- Transport vzorku
- Vhodné ředění - letos nutné ředění u PK 22
- Temperace vzorku (3*0,5-1h, 4* více než 1 h),
z toho 2 nevyhovující (vysoké) výsledky)
- Teplota zalévání – dle ČSN EN ISO 6222 (45+/-1)°C



Indikátory fekálního znečištění

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
KB (TC) ČSN 757837	259	113-404	100 %
KB (TC) ČSN EN ISO 9308-1	278	153-403	94 %
KB (TC) ČSN EN ISO 9308-2	326	228-423	100 %
ECOLI ČSN EN ISO 9308-1	40	27 -54	94 %
ECOLI ČSN EN ISO 9308-2	48	28 -68	100 %
ECOLI ČSN 757835	32	11-52	85 %

Pozn. Colilert 18 vers COLIKAT 4:3, výsledky se nelišily, pozor na 100 ml!

Indikátory fekálního znečištění II

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
TKB (FC)	64	15-113	100 %
Enterokoky	12	8-15	95 %



NÁVRH ISO 7899-3 Enterolert (IDEXX) – 7,4 MPN/10 ml
(ilustrační obrázek)

Klostridia (*C. perfringens*)

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
CP - ČSN EN ISO 14189	24	12-36	100 %
CP - Vyhl. 252/2004 Sb.	15	3-27	100 %
Siřičitany redukující anaeroby	Nelze hodnotit		

V	lab	výsledek (KTJ/10 ml)	z-score	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
X	716	10.0	-0.46									
X	997	27.0	-0.28									
X	1337	155.0	1.02									

počet laboratoří: 3

z toho vyhovuje: 3

z toho nevyhovuje: 0

vztažná hodnota: 55 KTJ/10 ml

vztažná odchylka: 98,4 KTJ/10ml

interval správných hodnot: -141,8 - 251,8 KTJ/10 ml

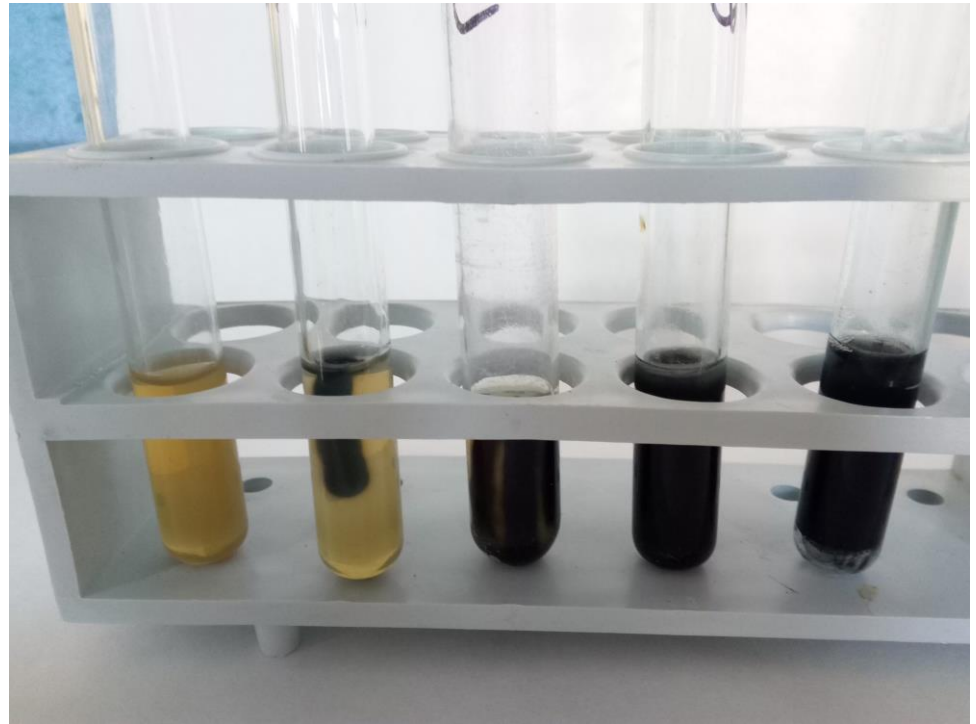
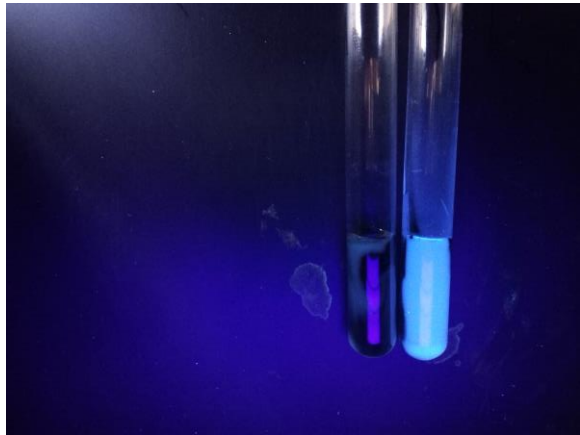
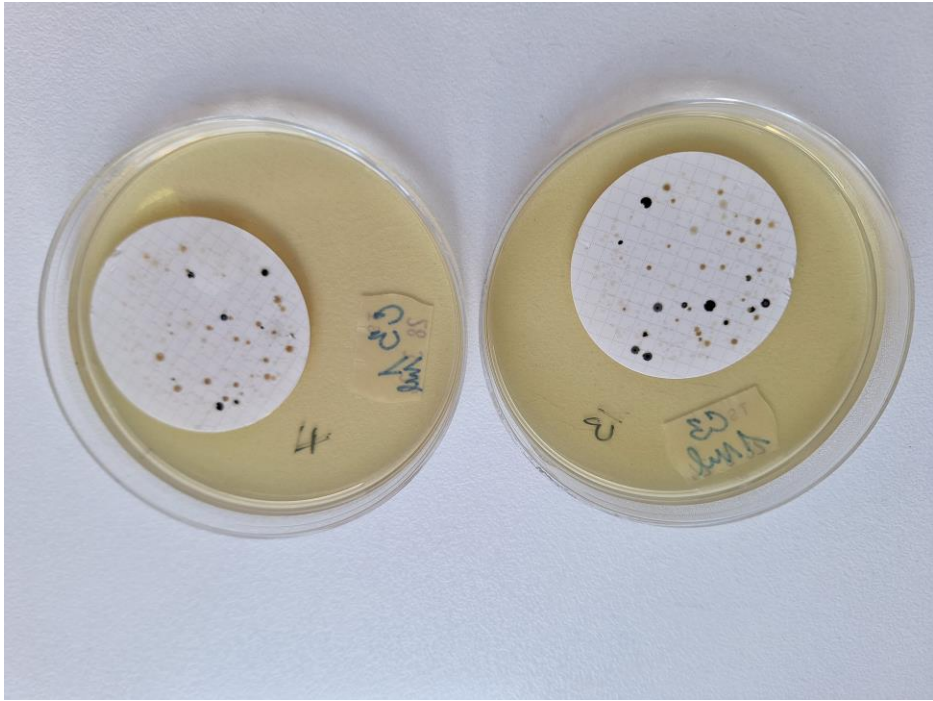
nejistota vztažné hodnoty: 61,5 KTJ/10 ml

SZÚ 300 KTJ/10 ml

X-vyhovuje, ? - sporné, ! - nevyhovuje

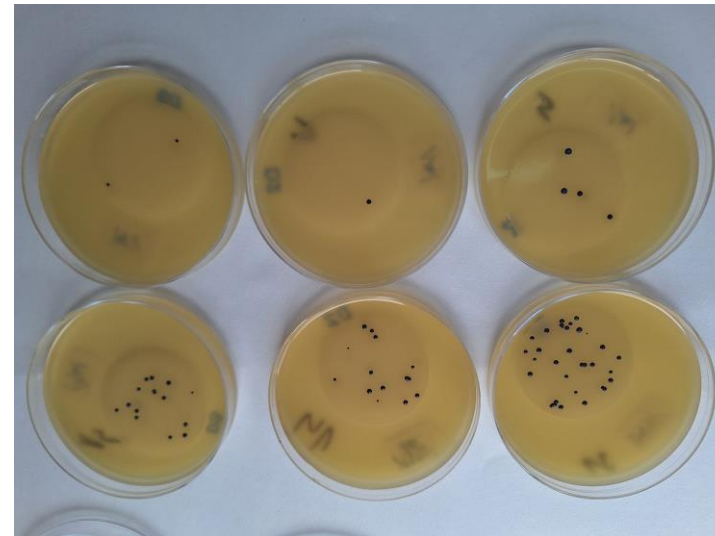
Clostridium perfringens

- Osud významnost ukazatele se bude muset dořešit (viz dále) , mCP končí (jako standardizovaná metoda)
- CP dle ČSN EN ISO 14189: **5 účastníků**
- Všichni uspěli
- Výrobce činidla na kyselou fosfatázu : Himedia (uvedli 2), Sifin (uvedl 1),2 neuvedli nic, proto *dále nehodnoceno*



Podmíněně patogenní bakterie

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
<i>P. aeruginosa</i>	76	46-106	80%
<i>S. aureus</i>	39	12-66	100%
<i>Legionella spp.</i>	231	150-312	100%



Stanovení legionel

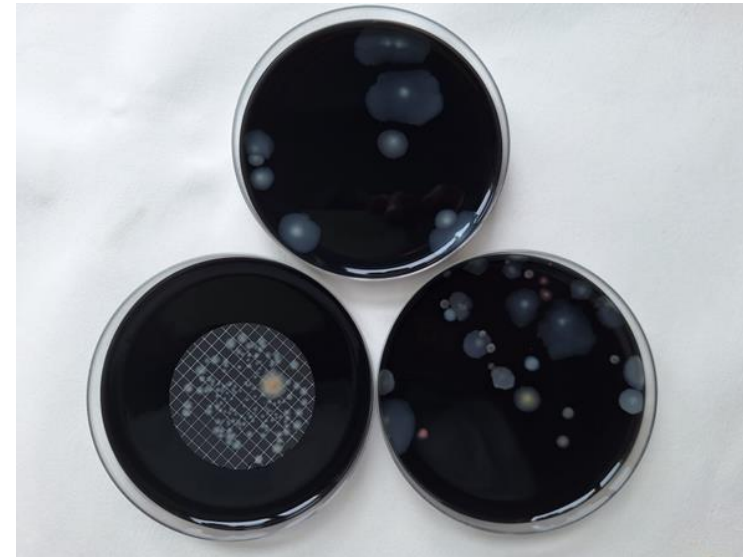
Uvedlo účastníků

Průměrná hodnota 3

Maximální (bez dalších podrobností)

Maximální na membránovém filtru v 10 ml 1 účastník (přerostlé, 155 nejnižší hodnota !)

Maximální na GVPC (bez dalších podrobností) 1



<u>B4</u> (++) (A)	ORL1	Legionella pneumop hila	<u>02.XII</u>	Legionella pneumop hila	<u>01.IX</u>
<u>B5</u> (++) (A)	2	Legionella pneumop hila	<u>II.24</u>	Legionella pneumop hila	<u>02.I</u>
<u>B6</u> (++) (A)	3	Legionella pneumop hila	<u>II.17</u>	Legionella pneumop hila	<u>02.III</u>

Pseudalert (ČSN EN ISO 16266 -2)

- Možnost zúčastnit se v rámci tohoto PT
- Nikdo nevyužil
- Průměr našich získaných hodnot byl 49 MPN/100 ml (n=3)
- Možnost využití pro balené vody ve (vyhláška 252/2004 Sb. v platném znění) a asi i bazény (novela stávající vyhlášky)

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

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.

2024

- Celkem uvedlo údaje o nejistotách 20 účastníků tj. 87 %.
- Je také nutno připustit, že na protokolu nebylo uvedeno hodnocení výsledku resp. porovnání s limitem. V letošním roce se ale také prakticky nevyskytovaly výsledky pod mezí stanovitelnosti.
- Všechny laboratoře uváděly alespoň ve většině ukazatelů relativní nejistotu (v %), i když v některých případech znak % chyběl, bylo to patrné. Kombinaci obou uvedly tři laboratoře.
- Rozmezí všech uvedených relativních nejistot bylo 15 – 67 %; nutno konstatovat, že nejistoty v mikrobiologii vody pod 20 % jsou nerealistické a neodpovídají rozložení mikroorganismů (částic) ve vzorku. V jednom případě byla uvedena i nejistota stanovení 150 %, ale to bylo vztaženo k hodnotě 2 KTJ, tudíž zcela na místě.

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.

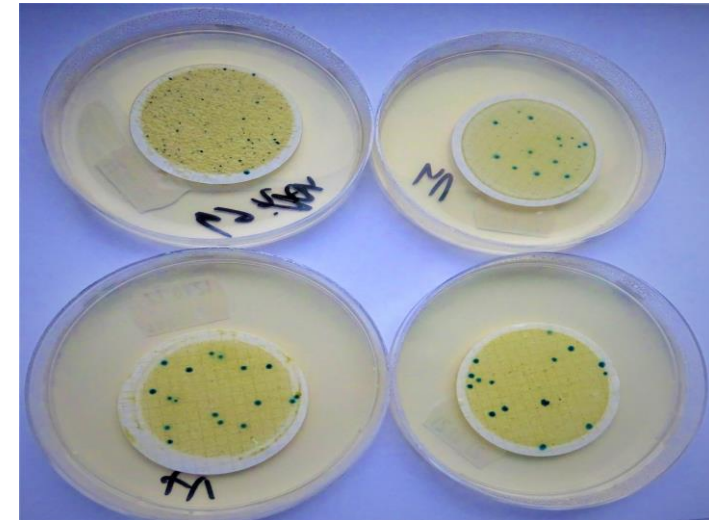
Novinky v mikrobiologii vody

- Nová vyhláška, novela zákona 258/2000 Sb. platí od ledna 2024
- *Clostridium perfringens*, somatické kolifágy - víc se metodicky nedotkne
- Enterokoky v kráceném rozboru

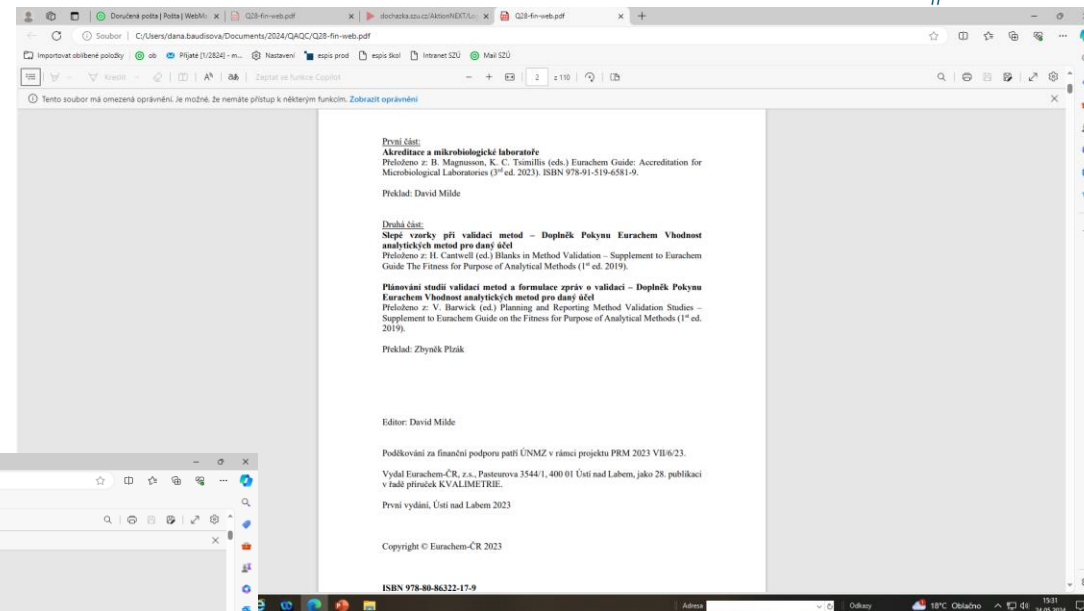
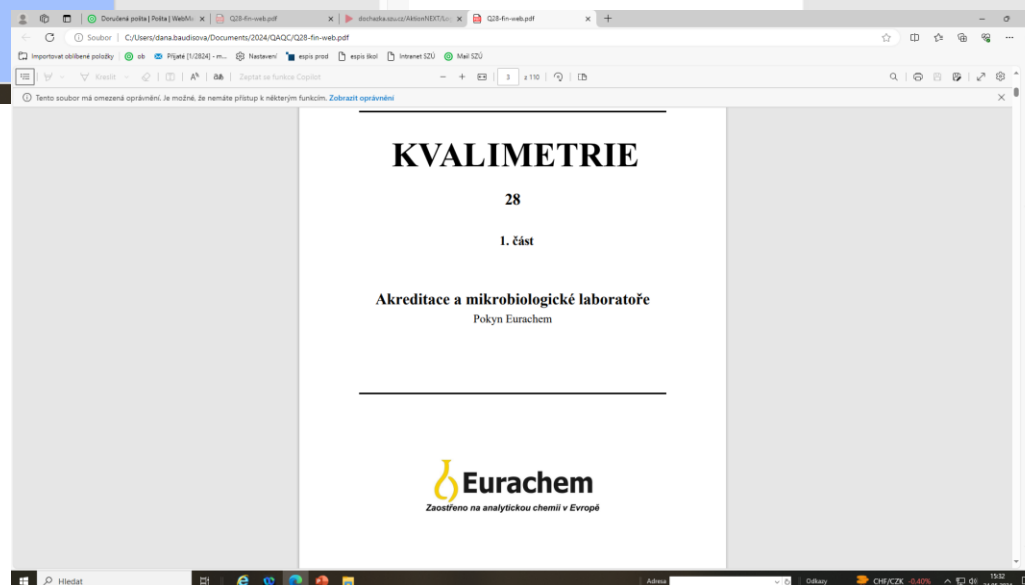
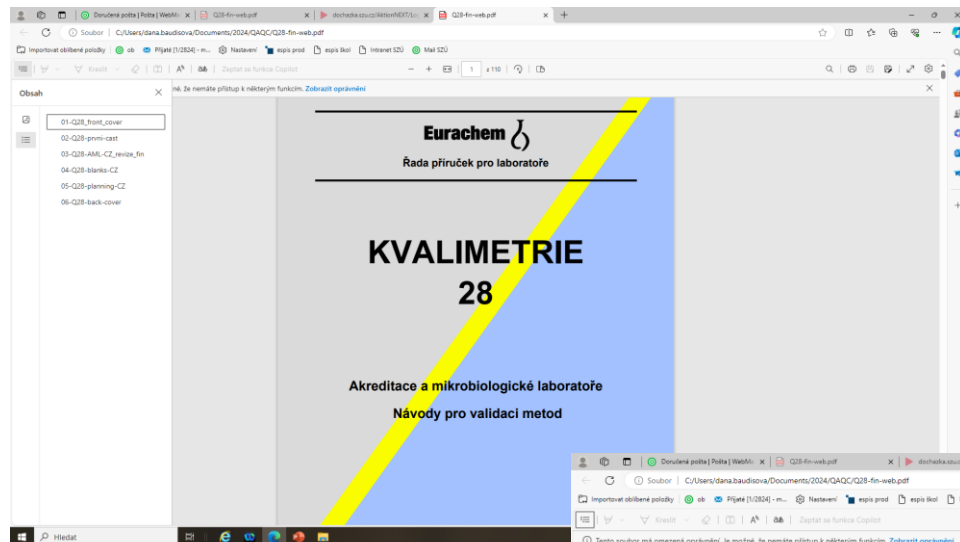
Nové metody (normy)

ČSN EN ISO 7704

Revize EN ISO 11133 (testování médií)



Obečné práce v mikrobiologické laboratoři

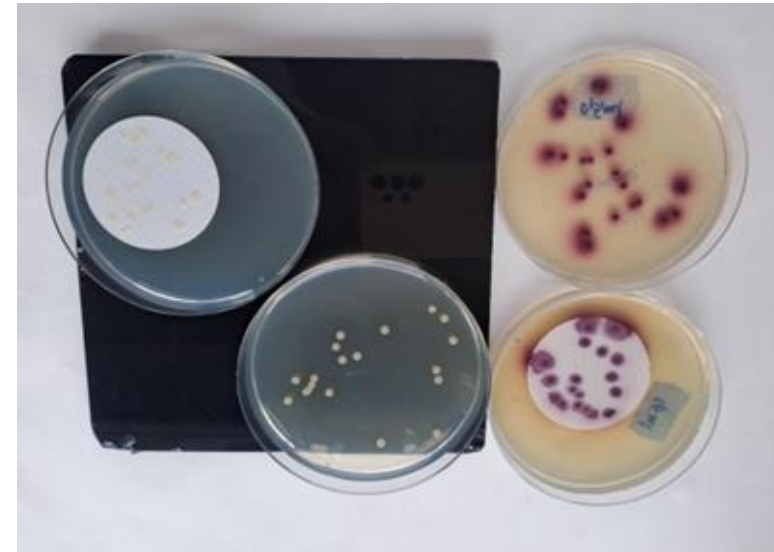


Rozpracované normy v ISO

- ISO/AWI 7014 Water quality – General requirements for the determination of SARS-CoV-2 and its variants in wastewater
- ISO/DIS 7899-3 Water quality – Enumeration of intestinal enterococci – Part 3: Most probable number method
- ISO/CD 9308-4 Water quality – Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria – Part 4: Membrane filtration method for *Escherichia coli* in water with high levels of background bacteria
- ISO/CD 13647 Water quality – Enumeration of culturable microorganisms – Colony count by spread plate inoculation on R2A medium
- ISO/CD TS 16099 Water quality – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of microorganisms and viruses – General requirements, quality assurance and validation
- ISO/AWI 25017-1 Water quality – Recovery and detection methods for *Acinetobacter baumannii* in aquatic ecosystems –Part 1: Natural water, Part 2: Raw drinking water

Nová norma ČSN EN ISO 7704

- Testování membránových filtrů
- Závaznost (??)
- Účelnost pro laboratoře (?)
- Analýza rizik?



Už nyní vhodné pro speciální případy:

- Zaškolení pracovníků – práce s kulturami, přesnost přípravy kultur
- Ověření zachytu filtrů ve speciálních případech, např. u legionel

Příklad *Staphylococcus aureus*

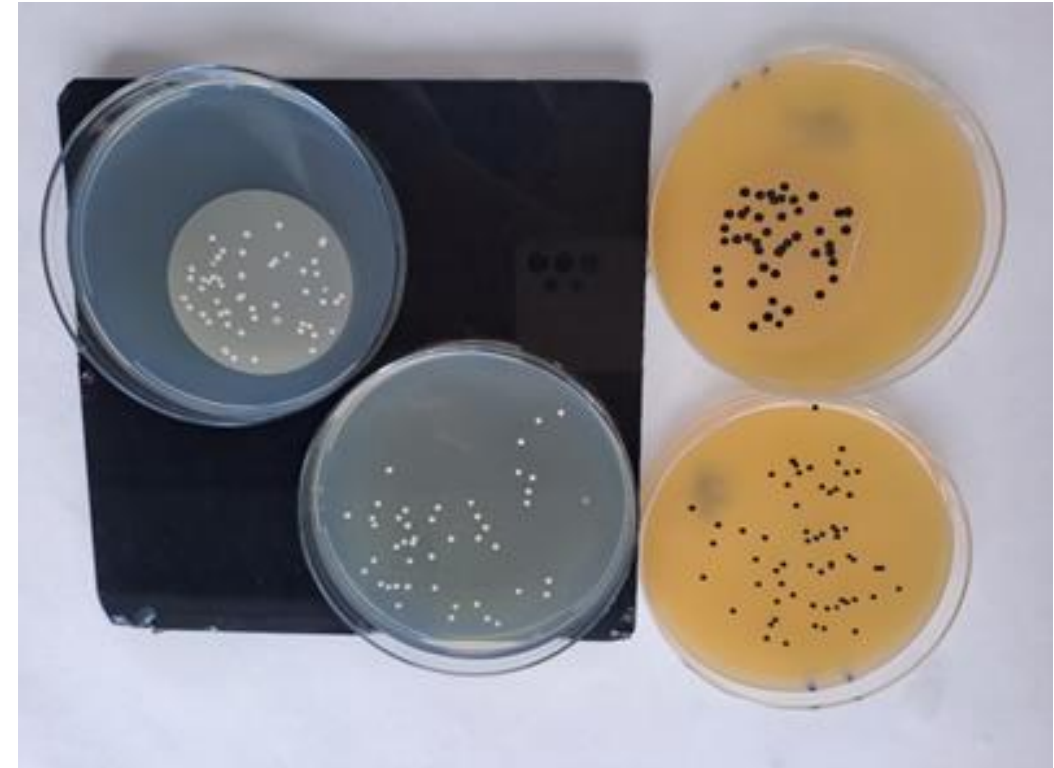
S. aureus 3953

BP šarže VM945706040

TYA 424181

známá koncentrace kmenu (11-15), ředění -5 , -6

BP		TYA		
MF	PV	MF	PV	
11.10. (-6)	50	64	56	49
11.10. (-5)	14	6	17	5
	78%			

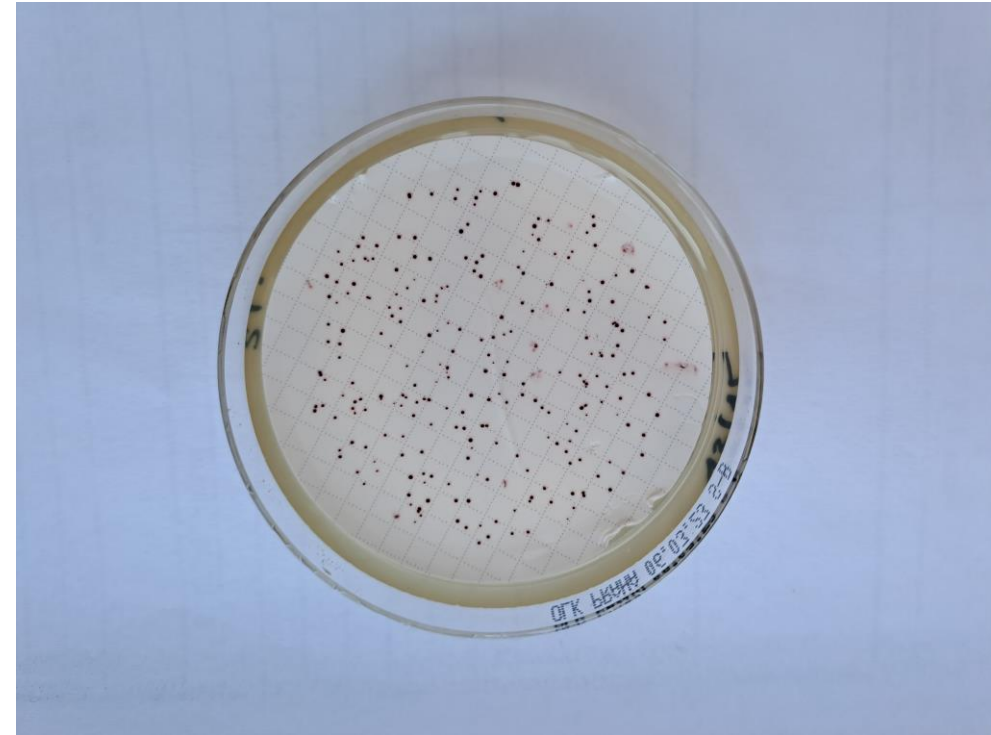


Intestinální enterokoky

- Jsou (měly by být) součástí i kráceného rozboru pitné vody
- Více analýz – více záchytů - **Posílejte kmeny!**
- V roce 2022 ÚV více než 5000 obyv. celkem 4356 analýz a 15 záchytů
méně než 5000 obyv. celkem 9978 analýz a 222 záchytů
(srov. EC 12171 a 22545 analýz)
- ČSN EN ISO 7899-2 *E. faecalis, faecium, durans a hirae* (2 hodiny konfirmace)
- Enterolert DW: *Enterococcus spp.*

Aerococcus viridans

- Původně do roku *Streptococcus*
- α hemolytický
- Na KA nazelenalé kolonie
- Gaffkaemiae (onemocnění ústřic)
- Izolován z veterinárního materiálu



C7
(++) (A)

E2421

Aerococcus viridans

2.14

Enterokoky naše průběžné výsledky z pitných vod

Intestinální enterokoky

N=28

Po 2 hodinách na ŽEA negativní (7 %)

Vše pozitivní na Enterolertu DW

Druhy:

hirae (9), casseliflavus (8),

faecium (4)

mundtii (2), durans (2), faecalis (2),

gallinarum (1)

Další druhy izolované z média SB

N=30

4 ŽEA pozitivní (13 %)

3 pozitivní na Enterolertu DW (10 %)

Druhy

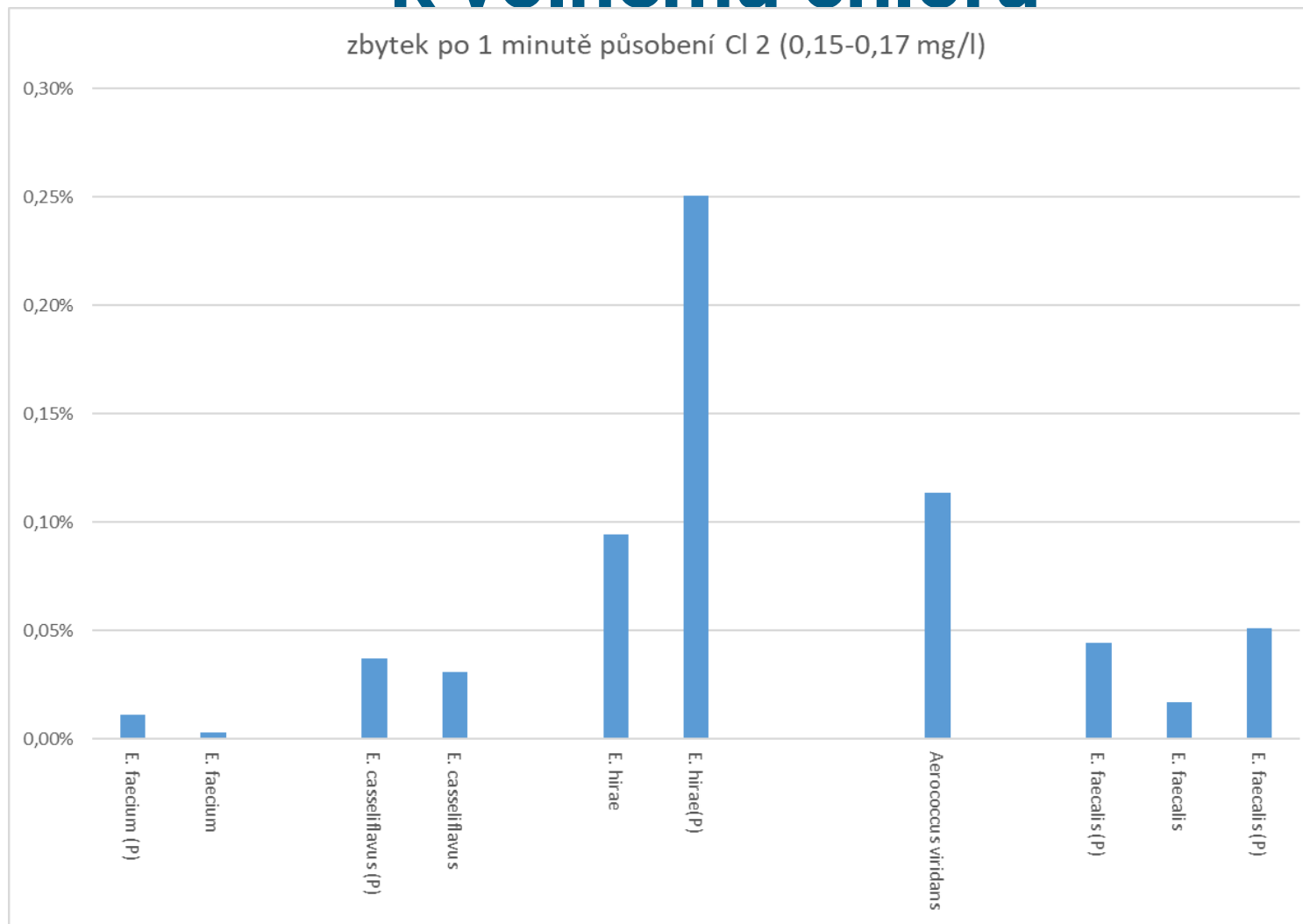
Aerococcus viridans (28)

Lactobacillus plantarum (1) – ten
bývá vždy ŽEA +

Streptococcus infantarius (1)

a další “mrtvolky” – nevyrostly ani nereagovaly

Citlivost různých druhů enterokoků k volnému chloru



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 vyplýne z posouzení rizik.**

Proč je problém mCP? Produktivita média musí být větší než 50 % (EN ISO 11133), nižší hodnoty

Problematika legionel

Ještě před zahájením novely si EK nechala zpracovat od Světové zdravotnické organizace (WHO) studii, které ukazatele by se mohly ze směrnice vypustit a které naopak by se měli nově zařadit, resp. u kterých ukazatelů by měla být upravena limitní hodnota. WHO ve své zprávě 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.

Drinking Water Parameter Cooperation Project. Support to the revision of Annex I Council Directive 98/83/EC on the Quality of Water Intended for Human Consumption (Drinking Water Directive). Recommendations. WHO Euro, Bonn 2017, 240 s

Prioritní prostory – legionely (zákon 258/2000 Sb. aktuální znění: Hlava II, díl 1, § 3d (2) - zodpovědný je provozovatel)



- a) zdravotnická zařízení, ve kterých je poskytována lůžková péče,
- b) zařízení sociálních služeb, ve kterých jsou poskytovány pobytové služby, nebo
- c) ubytovací zařízení podle § 21a s kapacitou nad 50 osob.



Jak provádět?

Příloha č. 8 k vyhlášce č. 252/2004 Sb.: Postup vypracování posouzení a řízení rizik vnitřního vodovodu a přípojky v prioritních prostorech:

Tabulka 4. Seznam rizikových faktorů pro bakterie rodu *Legionella* v rozvodu teplé vody a jejich hodnocení: způsob a místo ohřevu, existence projektové dokumentace, materiál potrubí, izolace potrubních systémů, izolace potrubních systémů, **místa se stagnující vodou**, **regulace systému** teplé vody co do teploty, průtoku a tlaku, cirkulace teplé vody, dezinfekce teplé vody, teplotní režim, zásobníky a způsob jejich odkalování, stagnace vody v zásobnících, možnost propojení s jiným rozvodem vody, nedostatečná údržba systému, **kontrola kvality vody**, **zařízení generující aerosol**, **vnímavost spotřebitelů**

Tabulka 5. Způsob stanovení míry rizika pro přítomnost bakterií rodu *Legionella*

Počet bodů / míra rizika

Metody stanovení legionel

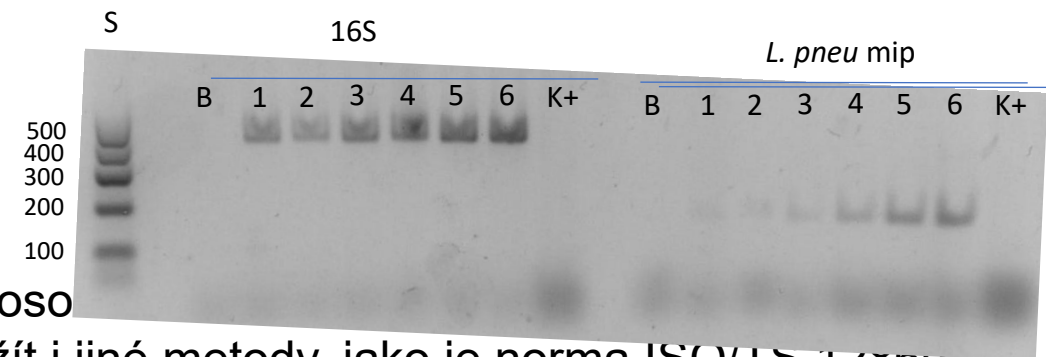
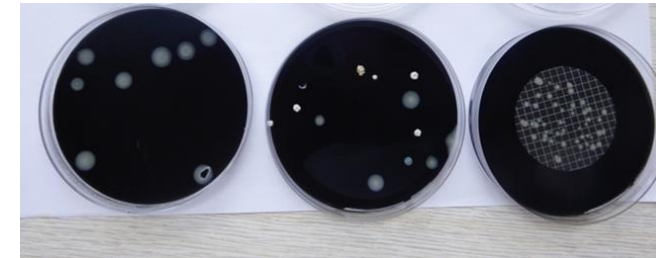
Příloha č. 6 k vyhlášce č. 252/2004 Sb.

Požadavky na analytické metody

A. Ukazatele, pro které jsou stanoveny metody rozboru

Legionella spp. ČSN EN ISO 11731 *)

*) pro účely ověřovacího monitorování založeného na posouzení pitnou vodou 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)



Složité a komplexní je to problematika

- *Legionella pneumophila* vers. *Legionella* spp.
- Provozní monitoring domovních rozvodů (technický indikátor) vers. zdravotní riziko (minimalizace zdravotního rizika)
- *Legionella pneumophila* sg. 1, skupina Pontiac
- Všudypřítomnost legionel vers. PREVENCE nadměrného rozvoje
- Imunosuprimované osoby
- Někdo to musí platit a někdo to musí umět (týmová spolupráce, nejde jen o analytiku)

Provozní monitorovací program



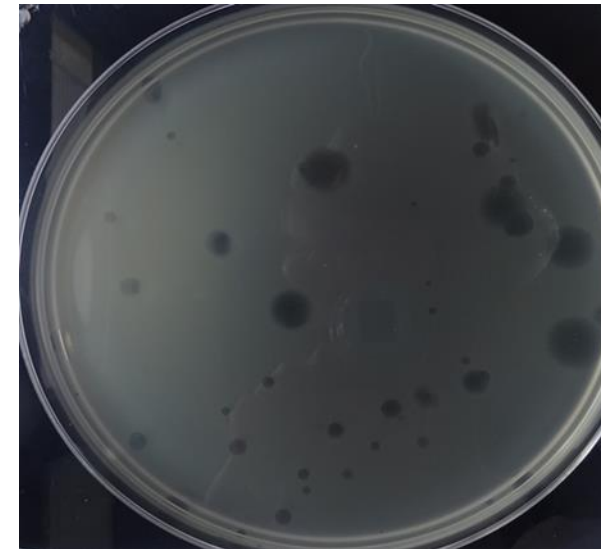
Bakteriofágy jsou nepatogenní viry, které infikují bakteriální buňky.

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 zavádí!



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 pozdním podzimním/zimním termínem

PROSBA O VYPLNĚNÍ ZPĚTNÉ VAZBY!

PROSBA o enterokoky z pitné vody

Zajímavosti z praxe

Mezilaboratorní porovnání metody ATP



Děkuji za pozornost

i

dana.baudisova@szu.cz +420 226 708 575