

Datum: 31. 3. 2026
Číslo jednací: SZÚ/04619/2026

Věc: Informace SZÚ – Národního referenčního centra pro pitnou vodu ke stanovení ukazatele *Clostridium perfringens* (možnost confirmace kyselou fosfatázou)

Úvod

Rod *Clostridium* zahrnuje patogenní a příležitostně patogenní druhy, z nejnámějších jsou to *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. perfringens* a *C. difficile*. S vodním prostředím je nejvíce spojen druh *C. perfringens*. Jedná se o anaerobní, grampozitivní bakterie, tvořící endospory.

C. perfringens se nachází v životním prostředí (půda, voda) a ve střevech teplokrevných zvířat a lidí, ovšem ne u všech jedinců – v jednom literárním review se uvádí, že pouze 13–35 % lidských výkalů obsahuje *C. perfringens* [1]. Další review [2] uvádí, že se ve stolici zdravých dětí, dospělých a starších osob nachází *C. perfringens* v množství $6,5 \cdot 10^8$ /g suché hmotnosti (pro srovnání *E. coli* $3 \cdot 10^7$ – $5,2 \cdot 10^7$ /g též vlhké hmotnosti a enterokoky $3 \cdot 10^3$ – $1,65 \cdot 10^7$ /g vlhké hmotnosti). Hodnoty se však mohou významně lišit na základě výběru testované populace (věk, onemocnění/medikace, strava). Další studie [3] uvádí, že se *C. perfringens* vyskytuje v nižších počtech (o 1–2 řády) než *E. coli* a enterokoky, což by více odpovídalo jeho záchytům ve vodním prostředí. Nízké počty spor *C. perfringens* samy o sobě pravděpodobně nepředstavují významné riziko z přímé konzumace kontaminované pitné vody u zdravých jedinců. Nicméně tyto spory mohou přijít do styku s potravinami (např. zelenina, maso, ryby), které představují vhodné podmínky pro jejich klíčení a následně množení. Infikované a nedostatečně tepelně upravené jídlo pak zvyšuje riziko infekce, zejména vážných gastrointestinálních onemocnění.

Využití *C. perfringens* jako alternativního indikátoru fekálního znečištění se diskutuje od konce 20. století a stejně tak se řeší, zda stanovovat pouze spory, které mohou sloužit vzhledem ke svým fyzikálně chemickým vlastnostem (zejména odolnosti) jako indikátor znečištění staršího data [3], nebo stanovovat zároveň buňky i spory. V evropské a české legislativě pro pitnou vodu se *C. perfringens* jako pomocný indikátor fekálního znečištění začal používat od roku 1998, původně jako indikátor výskytu parazitárních prvoků (*Giardia* a *Cryptosporidium*). Tato indikace však byla následně zpochybněna [4,5] a dnes se *C. perfringens* používá výhradně jako indikátor účinnosti čistících (úpravárenských) procesů [6,7].

V současné době se *C. perfringens* stanovuje pouze v rámci úplného rozboru u pitných vod [7] pocházejících z vod povrchových nebo u zdrojů, které jsou povrchovými vodami ovlivněny. Nově se stanovuje v úplném rozboru vod surových [8] pocházejících z povrchových zdrojů nebo podzemních zdrojů ovlivněných povrchovými vodami. V případě jeho pozitivního zachytu v surové vodě (výsledek nad mezí stanovitelnosti) může být tento indikátor využit při analýze rizik k ověření schopnosti systému eliminovat cysty a oocysty parazitických prvoků (jedna ze společných vlastností spor *C. perfringens* a oocyst parazitických prvoků je velmi malá citlivost k volnému chloru). Vzhledem k nízkým záchytům se tak ale i v tomto případě bude muset zřejmě přistoupit k analýzám vyšších objemů vzorků (1000 ml a více). Z databáze surová voda ČHMÚ bylo zjištěno, že *C. perfringens* bylo v roce 2024 stanoveno v 55 odběrných objektech povrchové vody a u 38 % z nich bylo aspoň v jednom odběru detekováno více než 10 KTJ/100 ml.

Metody stanovení

Od roku 2014 platí na stanovení *C. perfringens* norma ČSN EN ISO 14189 [9], která stanovuje tuto bakterii anaerobně na trypton siřičitanovém médiu s cykloserinem s následnou konfirmací kyselou fosfatázou. Tato norma je v současné době závazná pro analýzy pitných vod [7]. Celková doba analýzy trvá minimálně 48 hodin: černé, šedé nebo až šedožluté kolonie, které vyrostly na TSC médiu, jsou přeočkovány na vysoce úživný neselektivní agar (krevní agar, TSA) a po další 24 hodinové kultivaci v anaerobních podmínkách jsou kmeny jednotlivě testovány na přítomnost a aktivitu kyselé fosfatázy (činidlo obsahuje kancerogenní složky 1-naftylfosfát disodnou sůl a Fast Blue B Salt, a také octanový tlumivý roztok). Testovány mají být všechny vyrostlé typické kolonie, nebo alespoň jejich reprezentativní vzorek (minimálně 10 kolonií zahrnující všechny typy) a výsledky jsou následně přepočítány na původní počet presumptivních kolonií. Činidla na testování kyselé fosfatázy jsou již běžně komerčně dostupná. Metoda funguje dobře, což potvrzují i výsledky zkoušek způsobilosti. Na druhou stranu, v případě velkého počtu narostlých kolonií se metoda stává do určité míry problematickou, protože přeočkování kolonií není někdy úplně jednoduché (řada kolonií roste velmi blízko sebe) a před testováním kyselé fosfatázy může být nutné jejich „čištění“. Navíc následný přepočet na původní počet kolonií může učinit konečný výsledek velmi nepřesný.

Jak již bylo uvedeno, nově se *C. perfringens* stanovuje v rámci úplného rozboru surové vody [8], kde se očekávají mnohem vyšší počty kolonií, než u pitné vody, kde bývá záchyt *C. perfringens* velmi sporadický. Pro surové vody také není ve výše uvedené vyhlášce předepsána žádná závazná metoda. Nabízí se tedy možnost využití jiného způsobu testování kyselé fosfatázy, a to přidáním 4-methyl-umbelliferyl fosfátu (MUP) přímo do TSC média a po kultivaci 24 hodin v anaerobních podmínkách počítáním rovnou cílových kolonií (černé, šedé nebo až šedožluté kolonie, které vyrostly na TSC médiu s jasnou bleděmodrou fluorescencí pod dlouhovlnným UV zářením). Tento způsob testování se poprvé objevil v roce 2001 [10], a jedná se o naprosto stejný princip konfirmace, jako u předepsané normované metody [9].

Specifikace účelu testování

Účelem testování, které bylo provedeno v laboratoři Oddělení hygieny vody SZÚ, bylo zjistit, zdali je metoda na médiu TSC s MUP vhodná pro stanovení *Clostridium perfringens* především v surových vodách (u pitných vod s očekávaným nulovým zachytem této bakterie velké využití tohoto postupu, především z finančních důvodů, neočekáváme). Bylo důležité především zjistit:

- zda přidání 4-methyl-umbelliferyl fosfátu do TSC média neovlivňuje jeho produktivitu
- zda oba testy kyselé fosfatázy dávají shodné výsledky
- zda jsou výsledky *C. perfringens* stanovené oběma metodami srovnatelné.

Výsledky testování

- Produktivita TSC s MUP média vždy odpovídala požadavkům normy ČSN EN ISO 14189 (např. v lednu 2026 to bylo 110 % oproti TSA agaru). Opakovatelnost byla srovnatelná s ostatními mikrobiologickými metodami v naší laboratoři (17%; rozmezí cílových kolonií 16-25), a uspokojivé byly i výsledky počítání tří osob (9 %; rozmezí cílových kolonií 6- 24). Presumptivní kolonie (minimálně 20 pozitivních a 10 negativních) testované jak metodou se zakapáním činidla dle normy ČSN EN ISO 14189, tak fluoreskující na TSC médiu s MUP vykazovaly shodné výsledky.

- Při počítání bylo zjištěno, že je vhodné snížit horní pracovní rozsah celkového počtu kolonií na membránovém filtru na 50 KTJ. Při vyšších počtech se již cílové kolonie hůře počítají, protože může docházet ke splynutí fluorescencí v jejich okolí.
- Vlastní stanovení počtu *Clostridium perfringens* pomocí obou způsobů detekce kyselé fosfatázy není úplně jednoduché srovnávat díky nepřesným výsledkům získávaným metodou dle ČSN EN ISO 14189 (vzhledem k přeočkování části kolonií a následným přepočtem na celkový počet presumptivních kolonií). Byly proto využity výsledky z několika kol zkoušení způsobilosti, které dopadly velmi dobře (viz tabulka 1).

Tab. 1. Výsledky stanovení SZÚ *Clostridium perfringens* na TSC médiu s MUP v rámci několika kol zkoušení způsobilosti

Zkoušení způsobilosti	Rozmezí správných hodnot	<i>C. perfringens</i> TSC s MUP (SZÚ)
	KTJ/10 ml	KTJ/10 ml
PT41: PT/MB/1/2022	8-20	20
PT#V/3/2024	12-36	31
PT#V/3/2025	8-26	19
PT41: PT/MB/1/2025	59-163	132

Vybrané kolonie z TSC média s MUP byly identifikovány metodou MALDI-TOF po aplikaci kyseliny mravenčí k rozrušení buněčné stěny s dostatečnou přesností. Typické kolonie jak s pozitivní, tak negativní kyselou fosfatázou byly identifikovány jako *C. perfringens* či *C. bifermentans* (resp. *Paraclostridium bifermentans* - jak bylo v roce 2016 překlasifikováno na základě fylogenetických studií). V některých vzorcích byl nalezen i druh *Fusobacterium mortiferum*, který bude standardně detekován jako *C. perfringens* (černé kolonie s pozitivní kyselou fosfatázou), ale kyselá fosfatáza u něj byla pozitivně detekována oběma způsoby. Jedná se o anaerobní druh z čeledi Bacillaceae (původně byl klasifikován jako *Bacillus mortiferus*), tudíž patří mezi sporulující bakterie a při účelu testování – tj. ověřit schopnosti technologií eliminovat spory – by to nemělo vadit. Navíc bývá i tento druh spojován i s lidským mikrobiomem. Jednorázově byl zachycen i druh *C. nitritogenes*, ten však kyselou fosfatázu neprodukuje (potvrzeno oběma způsoby).

Závěr

Na základě získaných výsledků výsledky stanovení *C. perfringens* s konfirmací kyselou fosfatázou na médiu s 4-methyl-umbelliferyl fosfátem považujeme za srovnatelné s výsledky získanými metodou dle ČSN EN ISO 14189. Její využití vidíme především při analýzách vod surových, kde se jedná o zjednodušení a zpřesnění metody vzhledem k vyššímu očekávanému počtu narostlých kolonií (*C. perfringens* i případně doprovodná mikroflóra) na membránových filtrech.

Seznam literatury:

- [1] Lamy MC, Sanseverino I, Niegowska M and Lettieri T. Microbiological Parameters under the Drinking Water Directive. Current state of art on somatic coliphages and *Clostridium perfringens* and spores, EUR 29932 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2020, ISBN 978-92-76-12593-8, doi:10.2760/005492, JRC118219.
- [2] Cabral J.P.S. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. Review. Int. J. Environ. Res. Public Health 2010, 7, 3657-3703; doi:10.3390/ijerp7103657

- [3] Niegowska M., Pitkänen T., Sommer R., Brandao J., Bonadonna L., Baudišová D., Burlion N., Benoit Gassilloud, Pissarides N., Prokšová M., Rupel T., Schaefer B., Schets C., Slapokas T., Vargha M., Lettieri T.: Recast Drinking water Directive – State of play: Guidance Note for the analysis of microbiological parameters, EUR 31130 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2022, ISBN 978-92-79-53688-8, doi: 10.2760/14494, JRC129755.
- [4] Till D., McBride G., Ball A., Taylor K., Pyle E. Large scale freshwater microbiological study: rationale, results and risks. J. Wat. Health 2008, 06.4; 443-460. doi:10.2166/wh.2008.071
- [5] Korajcic A., McMinn B. R, Harwood V. J. Relationship between Microbial Indicators and Pathogens in Recreational Water Settings. Int. J Environ. Res. Public Health 2018, 15, 2842; doi:10.3390/ijeroh15122842.
- [6] Směrnice Evropského parlamentu a RADY (EU) 2020/2184 ze dne 16. prosince 2020 o jakosti vody určené k lidské spotřebě (přepřacované znění).
- [7] 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.
- [8] Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 428/2001 Sb., kterou se provádí zákon č. 274/2001 Sb., o vodovodech a kanalizacích pro veřejnou potřebu a o změně některých zákonů (zákon o vodovodech a kanalizacích), ve znění pozdějších předpisů.
- [9] ČSN EN ISO 14189 (757865) Kvalita vod – Stanovení *Clostridium perfringens* – Metoda membránových filtrů.
- [10] Adcock P.W., Sainti Ch. P. Rapid Confirmation of *Clostridium perfringens* by Using Chromogenic and Fluorogenic Substrates. Appl. Env. Microbiol. 2001, 67(9): 4382-4384, doi 10.1128/AEM.67.9.4382-4384.2001

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

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