

**Hodnocení výsledků
PT/V/3/2020
a
Novinky v mikrobiologii vody**

RNDr. Dana Baudišová, Ph.D.

Státní zdravotní ústav

24.6. 2021 Praha

Program

- Příprava a hodnocení PT - #V/3/2021

Novinky v mikrobiologii vody

- Nová směrnice EU o pitné vodě
- Revize normy EN ISO 9308 -2
- Bude norma ISO 9308-4 ?

Příprava PT - #V/3/2021

Vzorek A – organotrofní mikroorganismy

- Počty kolonií při 36°C a 22°C
- V loňském a předloňském roce teplá voda – drobné kolonie, méně tradiční výsledky
- Hledání jiného zdroje / pramen Václavka, Praha 4



Vzorek B a C

– indikátory fekálního znečištění

- Povrchová voda o různém stupni fekálního znečištění (Vltava Podbaba, Vltava Sedlec). Významné změny fekálního znečištění v týdnu před PT
- Problém současného stanovení koliformních bakterií a *E. coli* (dostatek *E. coli*, přerostlé filtry). Vhodnost přepočtu na 10 ml? Změny v rozložení ukazatelů?



Vzorek D a E (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°C a 36°C) ve sterilní nádobě a vše bylo důkladně zhomogenizováno a za stálého míchání ihned rozplněno.
- **Vzorek E** – Přirozený vzorek teplé vody. V březnu 2021 bylo provedeno o 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/3/2021 - 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 odchyly (σ) byla stanovena jako robustní směrodatná odchylna 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 odchylna.
- 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 odchyly.
- Pro ukazatele ze vztažnou hodnotou nižší než 15 bylo použito Poissonovo rozdělení.

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

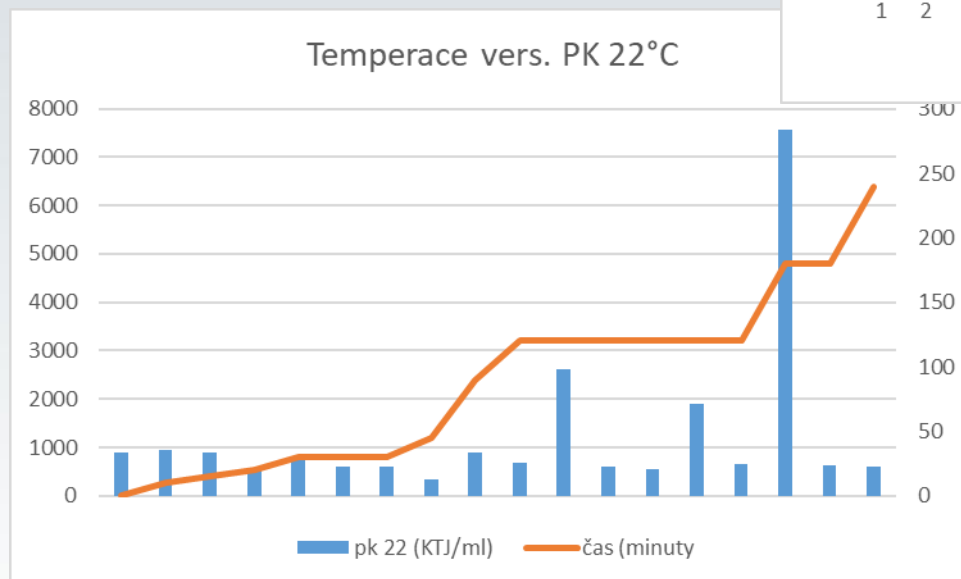
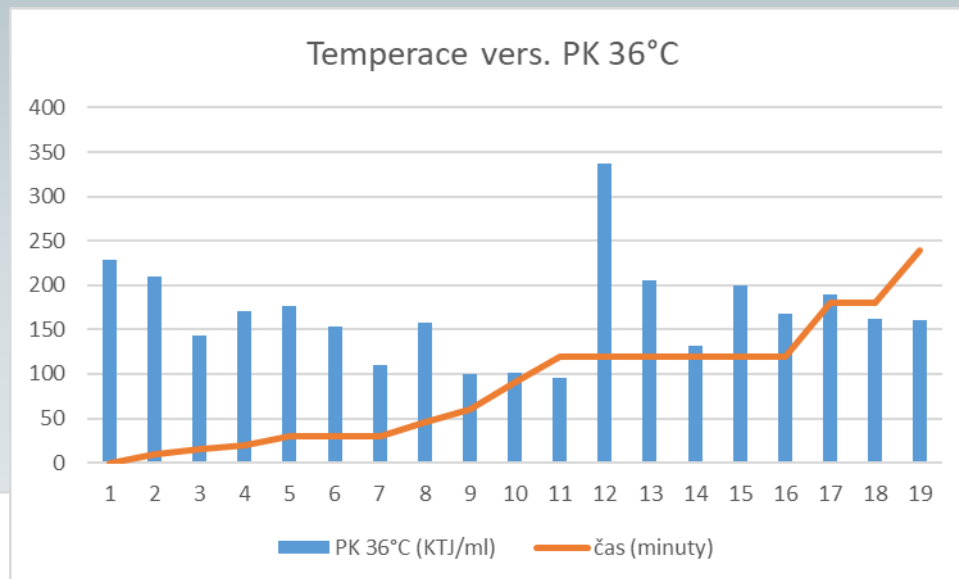
- Transport vzorku
- Vhodné ředění
- Teperace vzorku

POKUS:

teplota vzorku - po
vyndání z lednice 4,3°C,
1 ml kápnut ("teplou
pipetou" do "teplé misky" -
ihned 18,3°C,
po 10 minutách 23,8°C
(laboratorní teplota)

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
PK 22°C	687	288- 1085	85,7 %
PK 36°C	161	68-255	95 %

Temperace vzorku



Indikátory fekálního znečištění

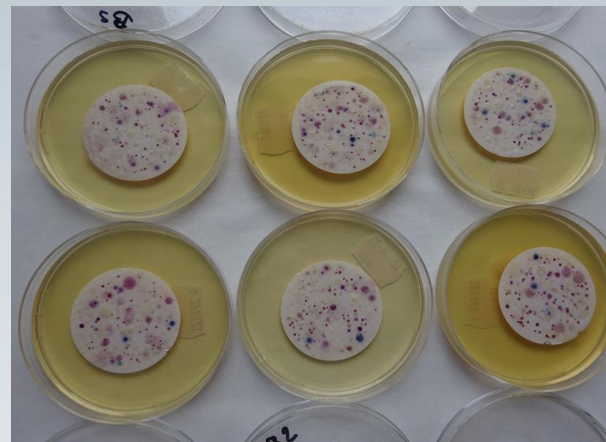
	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
KB (TC) ČSN 757837	Nelze spolehlivě vyhodnotit		
KB (TC) ČSN EN ISO 9308-1 (CCA)	86	14-157	90 %
KB (TC) ČSN EN ISO 9308-2 (MPN)	66	30-101	90 %
ECOLI ČSN EN ISO 9308-1	11,4	5-17	95 %
ECOLI ČSN EN ISO 9308-2 (MPN)	11,3	6,4-16,11	100 %
ECOLI ČSN 757835	10,7	5-17	100 %

Indikátory fekálního znečištění II

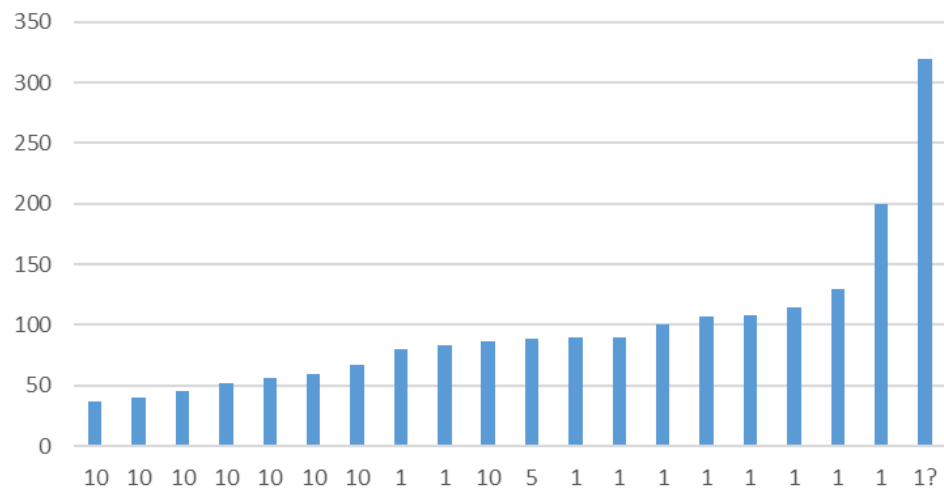
	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
FC (TKB) ČSN 757835	19,6	10-30	88,2%
Enterokoky	9,7	4-15	100 %

Koliformní bakterie

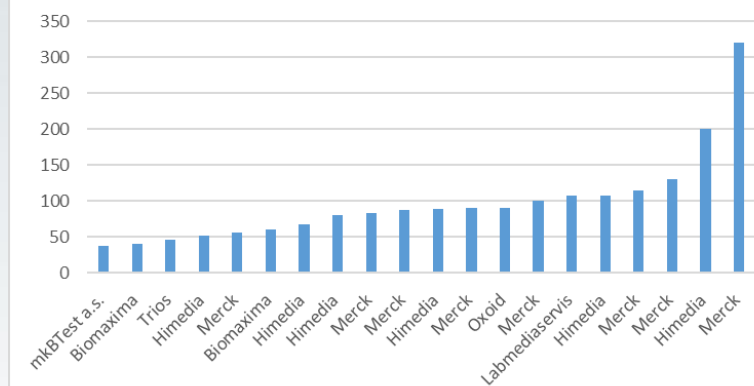
- Při stanovení koliformních bakterií na CCA nebyl typ agaru (výrobce) při hodnocení zohledňován zejména proto, že ne všichni účastníci tento údaj uvedli.
- Objem zpracovaných vzorků?
- Temperace?



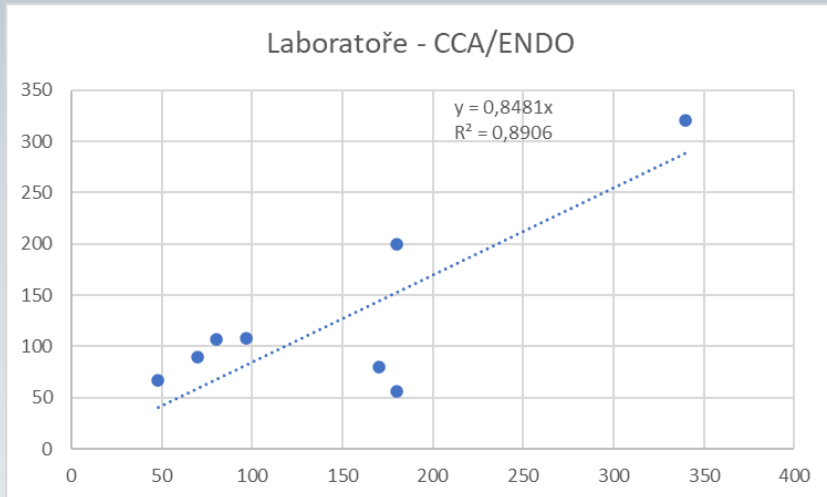
zpracovávané objemy - pro výsledky



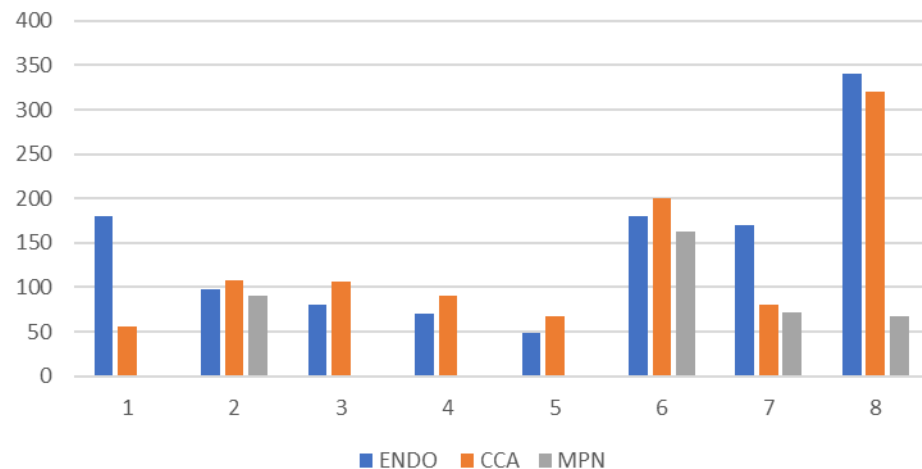
CCA firmy



Stanovení koliformních bakterií na Endo agaru. Tato metoda je určena výhradně pro stanovení koliformních bakterií v nedezinfikovaných vodách. (Aktuální využití?). Nešlo vyhodnotit - malý počet účastníků?

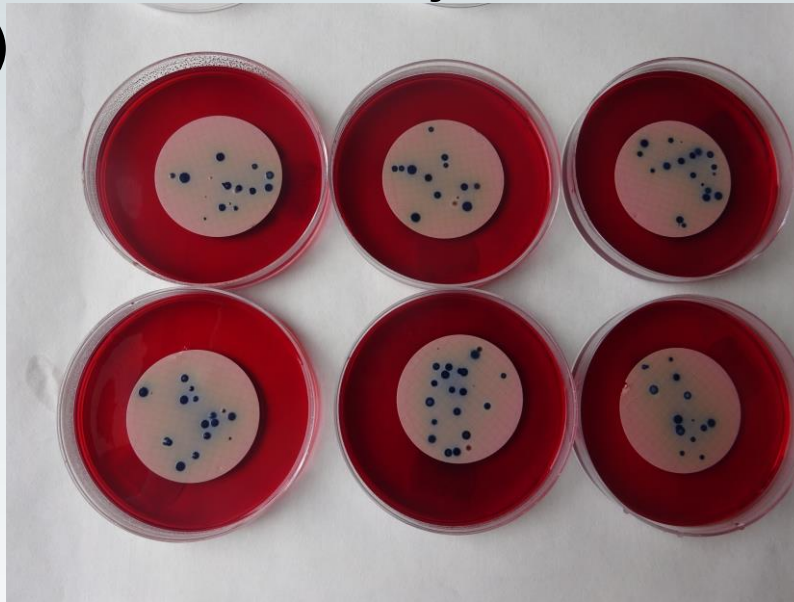


Různé metody stanovení koliformních bakterií



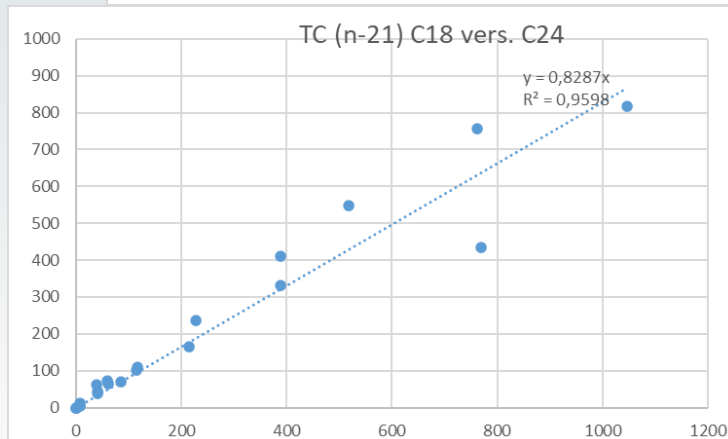
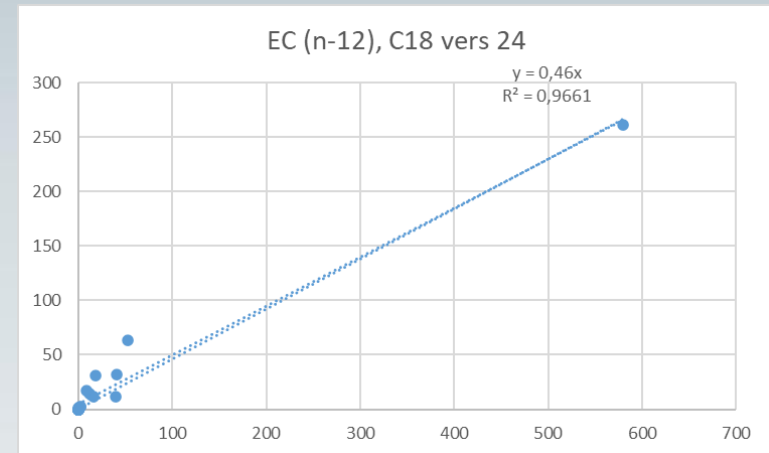
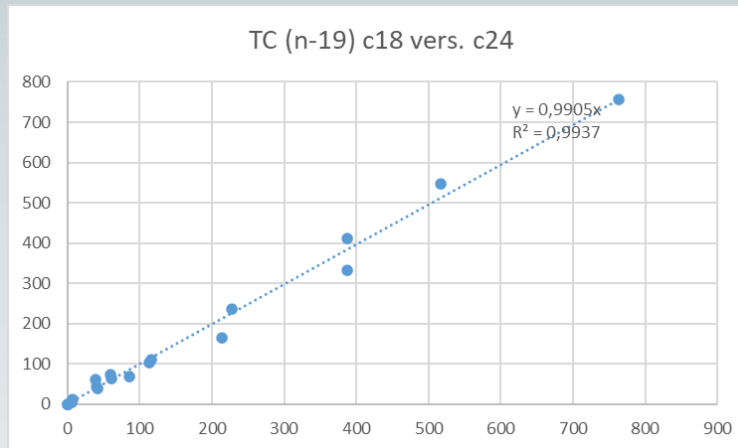
Termotolerantní koliformní bakterie a *E. coli*:

- Nebyly významné problémy – dostatečně selektivní metody
- Méně kolonií - Poissonovo rozdělení
- O těchto ukazatelích bude ještě zmínka v další části prezentace)



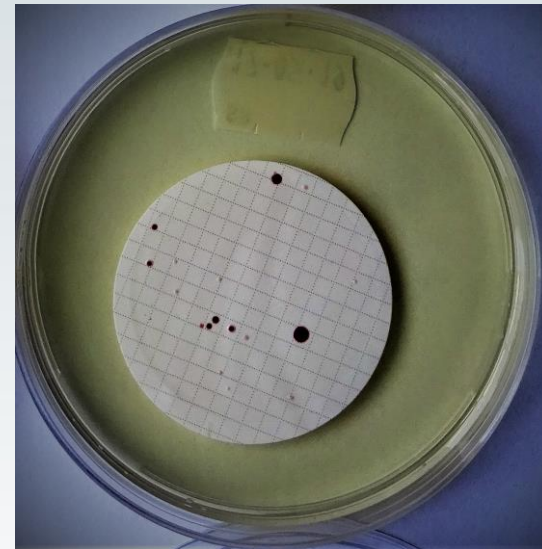
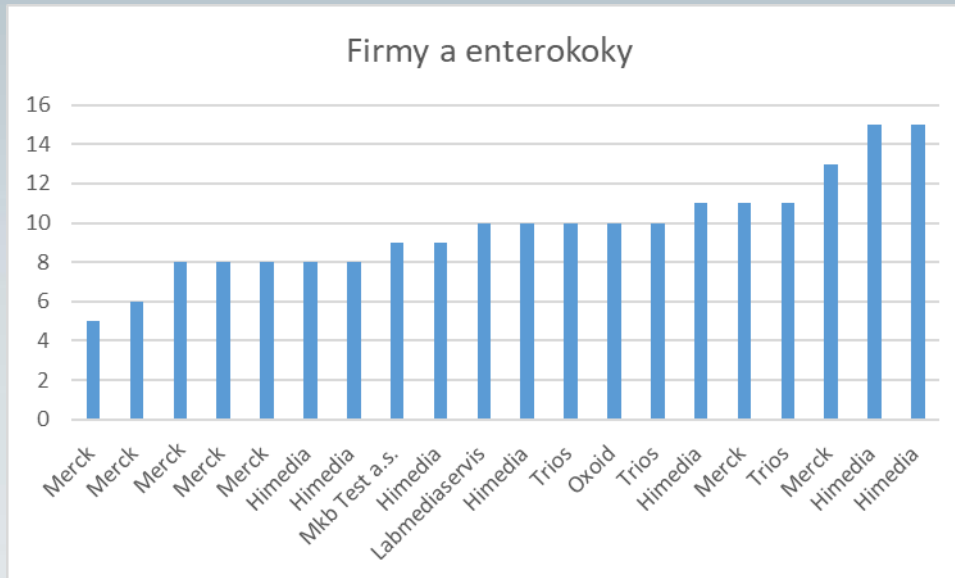
Colilert 18 vers. Colilert 24

- TC t-test 0,150742045 (v případě T-testu menšího než 0,05 lze vyloučit nulovou hypotézu - soubory tudíž nejsou shodné. A TADYJSOU)
- EC t-test 0,321752



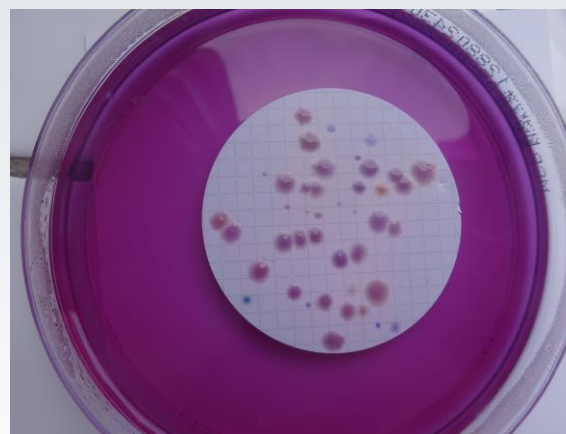
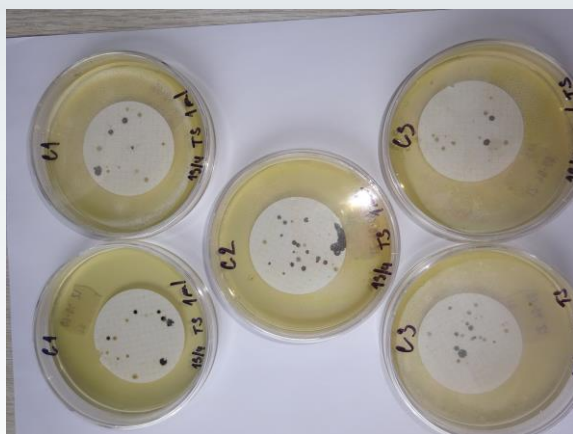
PT V3/2021	C18	C24	meze PT
Vzorek TC 1	60,5	64,4	30-101
Vzorek TC 2	85,7	69,7	
Vzorek EC 1	8,6	22,8	6,43-16,11
Vzorek EC 2	15,8	12,2	

Intestinální enterokoky



Klostridia (*C. perfringens*)

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
CP - ČSN EN ISO 14189	31,7	9-55	100 %
CP - vyhl. 252/2004 Sb.	23,4	15-32	100 %
Siřičitany redukující anaeroby (klostridia)	37,8	14-62	100 %

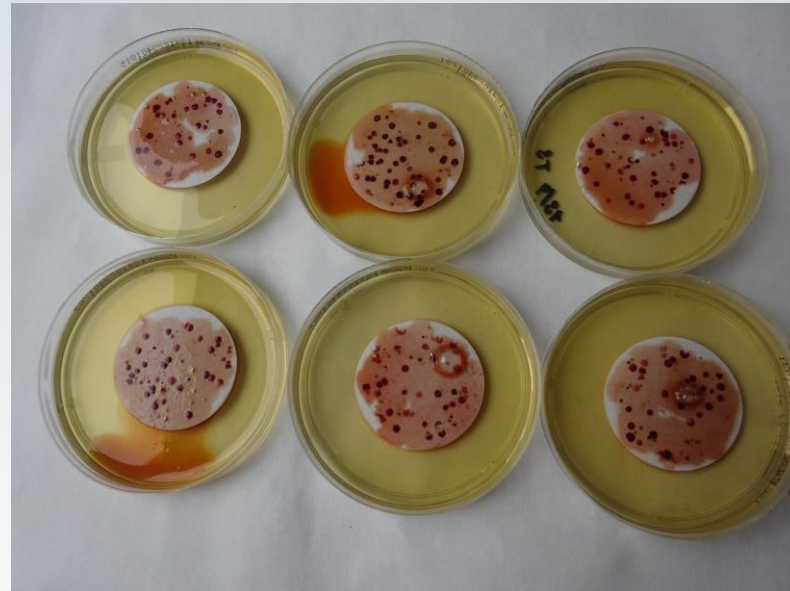
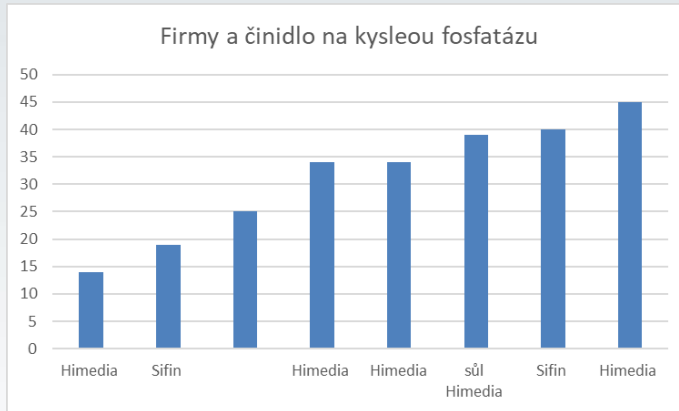


C. perfringens

- Málo účastníků na metodu dle ČSN EN ISO 14189. Po implementaci Směrnice EU na pitnou vodu do české legislativy již nebude alternativní metoda, ani „oddechový čas“. Pro nás je to sice „nová norma, ale ISO 14189 je z roku 2013!

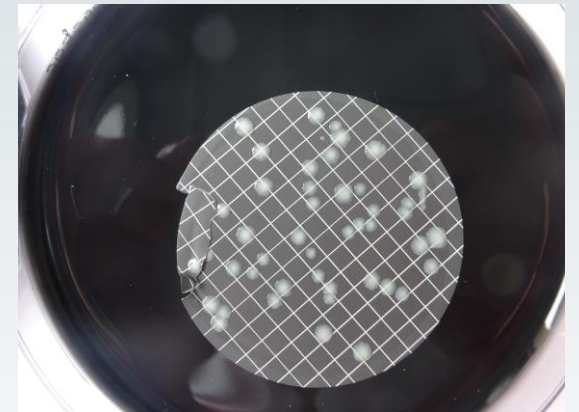
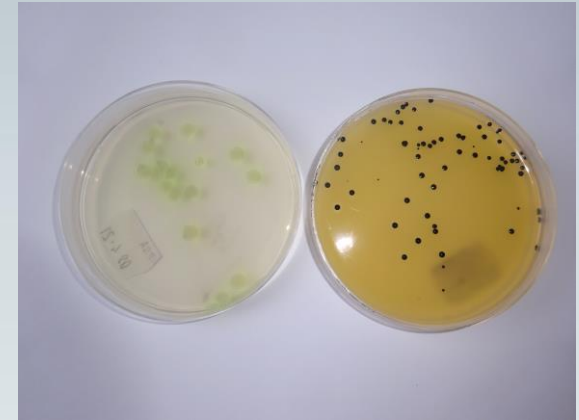
Použitá činidla

(kyselá fosfatáza)



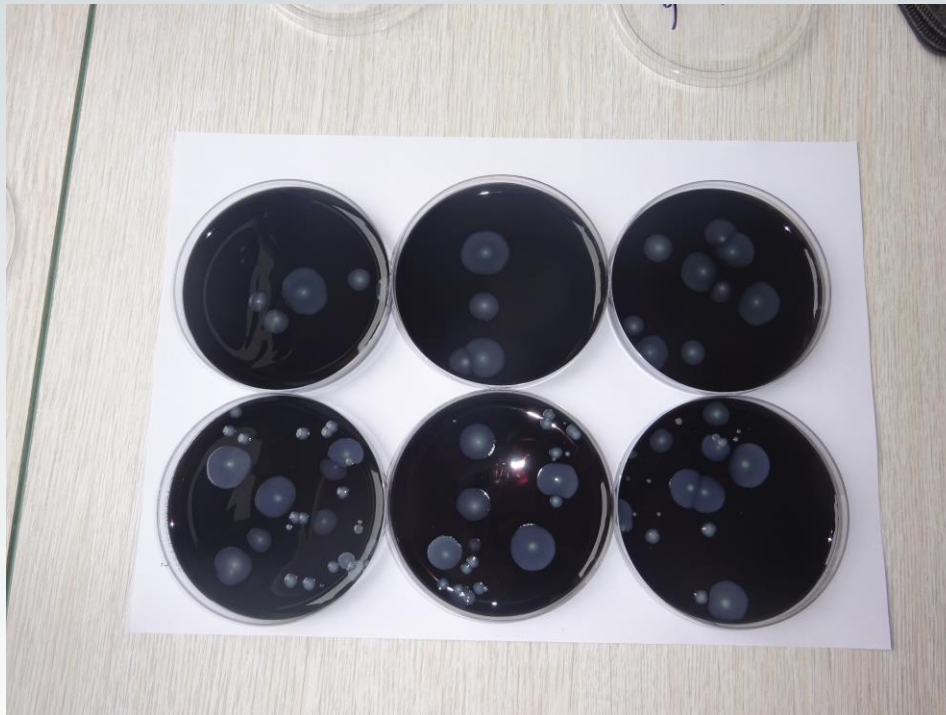
Patogenní bakterie

	Vztažná hodnota	Meze	Úspěšnost
<i>P. aeruginosa</i>	2472	420-4523	100 %
<i>S. aureus</i>	18982	3227-34737	100 %
<i>Legionella</i> spp.	64	32-97	100 %



Patogenní bakterie

- Na rozdíl od bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* nebyla při přípravě vzorků na stanovení *Legionella* spp. použita čistá kultura (environmentální kmeny) ale přirozená kontaminace teplé vody (SZÚ, budova 5, místnost 111). V posledních letech však bývá nedostatek doprovodné mikroflóry.



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.
- Celkem uvedlo údaje o nejistotách 20 účastníků tj (87 %). Naprostá většina uváděla relativní nejistotu (v %), v některých dalších případech šlo zřejmě také o relativní nejistotu, ale v protokolu chybělo uvedení „%“. Nejistotu v případě nízkých hodnot (pod mezí stanovitelnosti) bylo možné zohlednit pouze v případech kdy bylo použito hodnocení podle Poissonova rozdělení; toto však zohlednily pouze tři laboratoře. Rozmezí všech uvedených relativních nejistot bylo **5 - 61 %**; nutno konstatovat, že **nejistoty v mikrobiologii vody pod 20 % jsou nerealistické** a neodpovídají rozložení mikroorganismů (částic) ve vzorku.
- Uvedené nejistoty stanovení lze využít především při hodnocení úspěšných či neúspěšných výsledků jednotlivými účastníky.

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 **systemové a nesystemové**, identifikace **rušivých vlivů**.
- Logická správnost výsledků.

Novinky v mikrobiologii vody

- Nová směrnice EU o pitné vodě
- Revize normy EN ISO 9308 -2
- Bude norma ISO 9308-4 ?

V prosinci 2020 vyšla kompletní novela směrnice 98/83/ES o jakosti vody určené pro lidskou spotřebu jako **SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) 2020/2184 ze dne 16. prosince 2020** o jakosti vody určené k lidské spotřebě (přepracované znění; původní směrnici bylo v roce 2020 již 22 let)

- Změny se dotknou jak provozovatelů, tak pracovníků orgánů ochrany veřejného zdraví (KHS), ale i analytických laboratoří.
- Povinné zavedení přístupu založeném na posouzení a řízení rizik systémů zásobování vodou (včetně oblastí povodí, která souvisí s místem odběru jímání vody určené k lidské spotřebě)
- Posouzení rizik domovního rozvodného systému
- Povinné zavedení testování materiálů pro styk s pitnou vodou apod.
- Revize všech ukazatelů a jejich limitních hodnot na základě nových vědeckých poznatků.

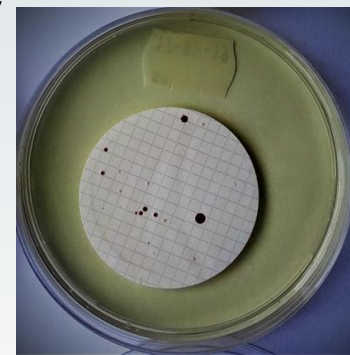
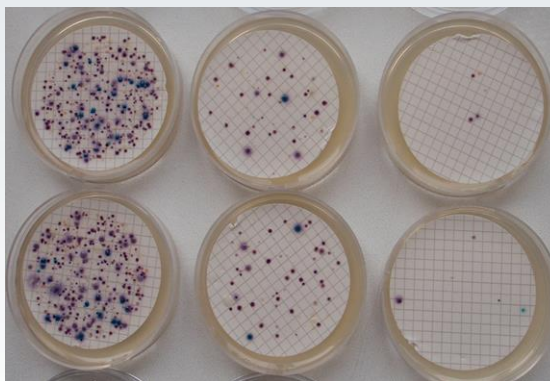
Dále pouze mikrobiologie!

Minimální požadavky na hodnoty ukazatelů, používané k posouzení jakosti vody určené k lidské spotřebě

- ***E. coli* a intestinální enterokoky se považují za „klíčové ukazatele“.**
- Četnost jejich monitorování nepodléhá možnosti snížení, a to ani na základě výsledků posouzení rizik systémů zásobování vodou.
- Jejich limitní hodnota je 0 KTJ ve 100 ml, která bude v české legislativě zavedena jako NMH (**nejvyšší mezní hodnota**), pro vodou stáčenou do lahví nebo nádob je limit 0 KTJ/250 ml.

Metody stanovení

- Pro stanovení *E. coli* jsou ve směrnici předepsané závazné metody dle ČSN EN ISO 9308-1, a ČSN EN ISO 9308-2
- Pro stanovení intestinálních enterokoků je předepsaná metoda dle ČSN EN ISO 7899-2
- Všechny tyto metody jsou v českých mikrobiologických laboratořích běžně používané.

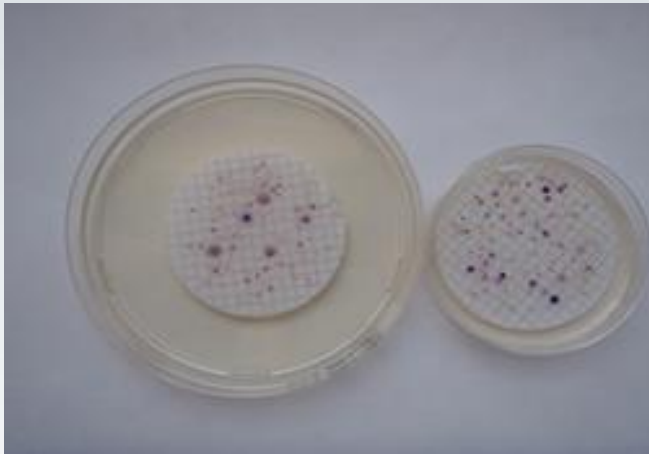


Indikátorové ukazatele

- Indikátorové ukazatele nemají přímý vliv na veřejné zdraví. Jsou však důležitým nástrojem ke zjištění, jak fungují zařízení pro výrobu a distribuci pitné vody, a jsou též důležitým prostředkem pro hodnocení jakosti vody.
- Mohou pomoci odhalit nedostatky při úpravě či distribuci vody a hrají důležitou úlohu z hlediska zvyšování a zachování důvěry spotřebitelů v její jakost.
- Z mikrobiologických ukazatelů jsou indikátorové ukazatele koliformní bakterie, počty kolonii při 22 °C a *Clostridium perfringens*.

Koliformní bakterie

- Pro stanovení koliformních bakterií jsou předepsány metody dle ČSN EN ISO 9308-1 a ČSN EN ISO 9308-2, tedy shodné jako pro stanovení *E. coli*.
- Předepsaná hodnota 0 KTJ/100 ml (pro vodu, stáčenou do lahví nebo nádob 0 KTJ/250 ml) bude zřejmě zavedena jako **mezní hodnota**.



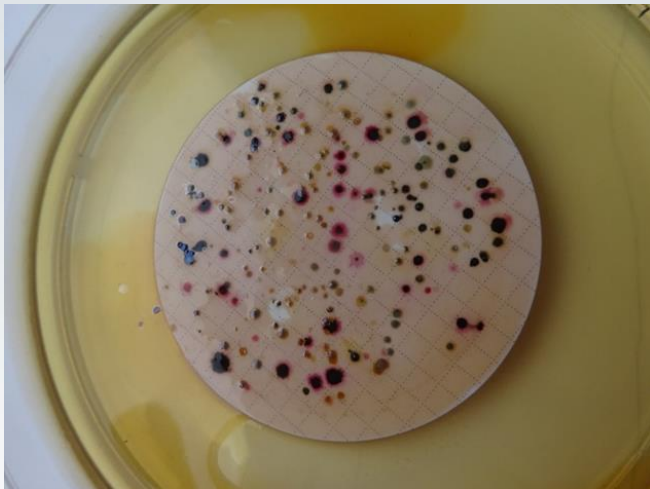
Počty kolonií při 22 °C

- Pro stanovení počtu kolonií při 22 °C je předepsaná již zavedená a běžné používaná metoda dle ČSN EN ISO 6222.
- Jejich „předepsaná limitní hodnota“ v 1 ml je stanovena jako „bez abnormálních změn“. I tento princip hodnocení se již v České republice řadu let používá.
- Ve směrnici nejsou uvedeny počty kolonií při 36 °C. To však není změna, nevyskytovaly se pro nebalenou pitnou vodu ani v původní směrnici. Přesto se očekává, že tento ukazatel se bude u nás používat i nadále.



Clostridium perfringens

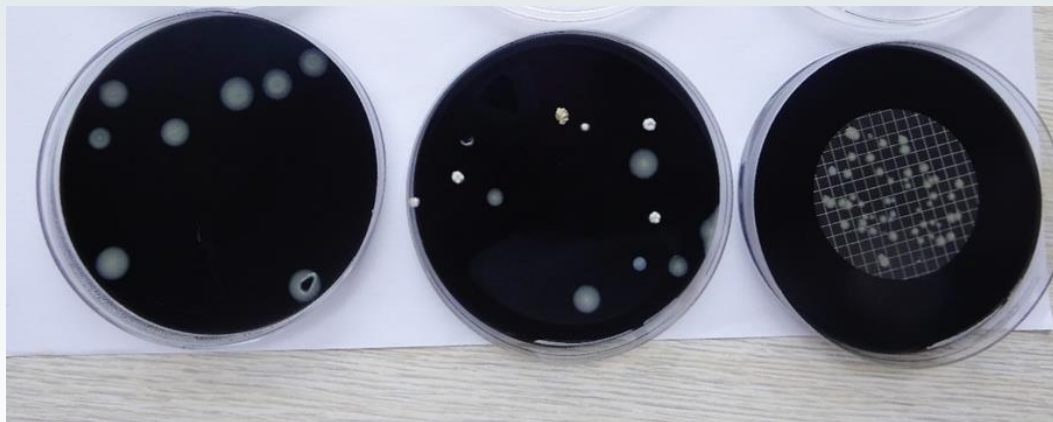
- *C. perfringens* se bude stanovovat metodou dle ČSN EN ISO 14189 (kultivace *C. perfringens* na TSC agaru a konfirmace kyselou fosfatázou)
- Pro *C. perfringens* je ve směrnici uvedena hodnota 0 KTJ/100 ml s tím, že se má stanovovat „včetně spor“. Tento termín je však zavádějící, spory se totiž stanovují 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.



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.*

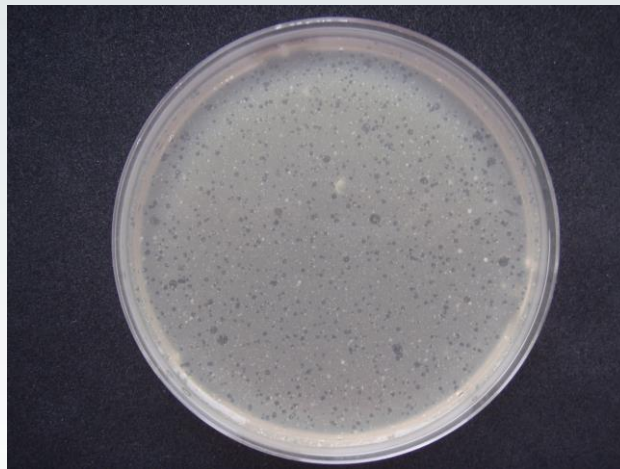
- Pro bakterie rodu *Legionella* (*Legionella* spp.) je stanovena hodnota 1 000 KTJ/litr.
- Nápravná opatření lze zvažovat i v případě, že této hodnoty ukazatele není dosaženo, například v případě prokázaných infekcí a ohnisek nálezů. V takových případech by měl být zdroj infekce potvrzen a určen jeho 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).



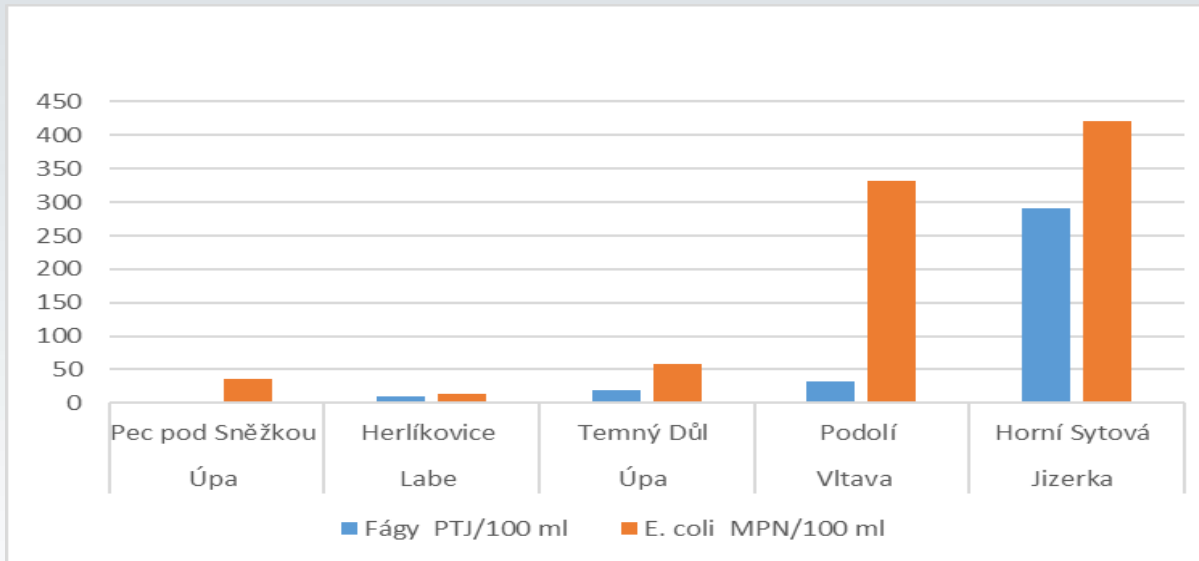
Provozní monitorovací program

- Součástí tohoto programu je také monitorování somatických kolifágů, aby se kontrolovala účinnost procesů úpravy, zaměřených na mikrobiologické rizika.
- Somatické kolifágy jsou bakteriální viry, napadající citlivé buňky *E. coli*. Stanovují se plakovou titrací, a mohou se použít metody dle ČSN EN ISO 10705-2 a ČSN ISO 10705-3.
- Tento ukazatel se má sledovat, pokud to vyplývá z posouzení rizik.
- Je-li zjištěna přítomnost somatických kolifágů v surové vodě v koncentraci větší než 50 PTJ/100 ml, mělo by se toto stanovení provést po dokončení série kroků úpravy vody, aby bylo možno určit log hodnotu odstranění prostřednictvím existujících bariér a posoudit, zda je riziko průniku patogenních virů skrze úpravu dostatečně pod kontrolou.

- Výsledky z analýz povrchové/odpadní vody (Baudišová a Fuksa, 1997, Baudišová 1998, Čapková a Baudišová 2017) ukázaly, že somatické kolifágy vykazují určitou korelaci s *E. coli*, což ale může být u surové vody samozřejmě jinak.
- Pro začátek jsme ze studia výsledků *E. coli* z databáze „surová voda“ (ČHMÚ) vytipovali naše nejohroženější zdroje. Maximální hodnoty *E. coli* vyšší než 50 KTJ/100 ml vykazovalo 15 (27 %) povrchových a 5 (0.5 %) podzemních zdrojů v České republice.
- Nejohroženější se zdají být surové vody z podhorských povrchových toků a to především v brzkém jarním období (zřejmě v souvislosti se zvýšenými průtoky v období tání sněhu).



Orientační výsledky (*E. coli* a somatické kolifágy) z pěti toků, které se v blízkosti našeho odběrového místa alespoň částečně používají jako surová voda. V době odběru nebyly v žádné z lokalit zaznamenány zvýšené průtoky. Somatické kolifágy byly stanoveny pomocí hostitelského kmene ATCC 13706, metodou od autorek Šimková, Miklošovičová 1986 (upraveno), *E. coli* byla stanovena metodou dle ČSN EN ISO 9308-2.



Stanovení somatických kolifágů vyvolalo řadu otázek

- Nejsou s tím (zejména u pitných vod) žádné velké zkušenosti ani u nás, ani v evropských zemích.
- Metoda dle EN ISO 10705-2 není dle směrnice povinná.
- Tato norma bude *možná* v nejbližší době revidována.
- Další možné metody, např. USEPA 1602 (podporuje resp. zkoumá např. Finsko).
- **Otázky:** účinnost koncentrace vzorku – validační studie (např. v Itálii zpracovávají až 1 000 ml vzorku, aby se dosáhla dostatečná účinnost.

ekvivalence metod (ISO vers. USEPA?)

další možnosti (kit Bluephage apod.)

..... Pracuje se na tom 😊

Revize normy EN ISO 9308-2

- Vypršela doba platnosti patentu firmy IDEXX na Colilert Quantitray – uvolnění
- Vložila se do toho německá firma XEBIOS Diagnostics gmbh

(u nás zastoupena firmou CONSYGEN CZ) a vyrábí COLIKat RAPID (alternativa Colilertu 18)

- Proběhla validační studie (i když to nebylo potřeba – využívají přesnou recepturu; (zatím) pouze malá plata
- Změna normy EN ISO 9308-2 - již nebude zmiňován Colilert - jinak by se nemělo nic měnit

Xebios/ Consygen CZ

www.colikat.com (xebios.de)



COLIKAT RAPID

- Suitable for presence-/absence testing and simultaneous identification and quantification of *Escherichia coli* and coliform bacteria using the COLIKAT Blister
- Easy to use without extensive training of laboratory staff in the laboratory or in the field
- Clear identification of target organisms avoids results' bias resulting from subjective interpretation
- No confirmation testing required
- Detection of 1 CFU/100ml water sample
- 18 hours test period perfectly fits into laboratory workflow and helps to avoid night and weekend work
- 12 months shelf life at room temperature
- Low percentage of false positive results increases security and avoids unnecessary cost
- Quality tested according to EN ISO 11133 and EN ISO 9308-2 in our EN ISO 17025 accredited laboratory
- Test is compliant with §15 Sec. 1a Nr. 1 of TrinkWV and European Union Directive 2015/1787 EC



PT V3/2021

	C18	Colikat	meze PT
Vzorek TC 1	60,5	69,1	30-101
Vzorek TC 2	85,7	73,2	
Vzorek TC 3	63,8	66,9	
TClaboratoř 1172	71	61	
Vzorek EC 1	8,6	12,2	6,43-16,11
Vzorek EC 2	15,8	16,9	
Vzorek EC3	11,6	10,9	
EClaboratoř 1172	10	10	

Německá studie

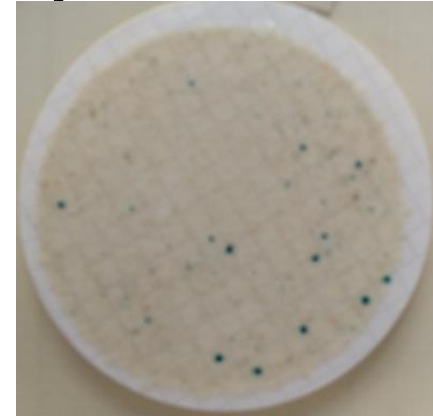
IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasser Beratungs- und
Entwicklungsgesellschaft mbH Moritzstraße 26 DE-45476 Mülheim an der Ruhr
GERMANY
www.iww-online.de

- Vzorky pitné vody, obohacené (nikoliv čistou kulturou)
- 12 laboratoří ze 3 zemí
- 670 vzorků pitné vody, 12 vzorků povrchové vody a 4 vzorky vody ke koupání

„The conclusion that both methods equivalent as regards coliform bacteria and the higher recovery of COLIKAT RAPID® for E. coli are absolutely not affected by the verification of positive cultures in the cavities by MALDI-TOF-MS. These verifications were carried out in case of deviating MPN values of COLIKAT RAPID® in comparison to the reference method for the respective sample-pairs.“

EN ISO 9308-4 ? - *E. coli* v povrchových vodách (koupací vody?)

- Problém: není vhodná metoda (oficiální) k testování *E. coli* v povrchových (koupacích) vodách
- TBX médium – chromogenní médium (pouze *E. coli*, ale i doprovodná mikroflóra – bezbarvá
- Propagují Chorvati – moře, čistá jezery Dbají více na citlivost, než na selektivitu ☹



- Naše výsledky – zatím: verifikováno 10 kmenů na MALDI –TOF (100 % potvrzeno)
- PT V 3/2021 : TBX: *E. coli* 10 ml 12 KTJ 5 ml 10 KTJ

Nabídka naší spolupráce

Zájemce o mikrobiologické metody proškolíme až bude vhodná epidemiologická situace:

- 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!**

Zajímavosti z praxe

Děkuji za pozornost
a přeji krásné léto

