

Výskyt patogenních mikroorganismů (*S. aureus*, *P. aeruginosa*) v koupacích vodách a jejich korelace s indikátory fekálního znečištění

seminář „Novinky v metodách mikrobiologických a biologických analýz povrchových vod ke koupání“

26.4.2012, Praha

RNDr. Jaroslav Šašek
Státní zdravotní ústav



Počty indikátorových mikroorganismů a procento výskytu patogenů (*Campylobacter*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Noroviry*) v povrchové vodě (řeky, jezera)

Hörman et al, 2004

<u>E. coli (MPN/100 ml)</u>	<u>C.p.(%)</u>	<u>F-RNA (%)</u>	<u>% pozitivních enteropatogenů</u>
<1	0	23,1	0
1-10	18,2	23,6	47,3
10-100	35,7	38,1	47,6
100-1000	58,3	54,2	33,3
> 1000	100,0	40,0	60,0

asociace stafylokokových kožních infekcí a plavání

(Charoenca, Fujioka, 1995)

Universita Bangkok + Universita Honolulu

- *stafylokokové kožní infekce & rekreace v pobřežních vodách (kanoisti)*
- *též vztah k vodní expozici (4x více proti kontrolní skupině)*

kontaminace písku a vody S. aureus a další kontaminanty

Papadakis, Mavridou et al.(1997)

- voda i písek kontaminovány S. aureus více v létě než v zimě
- významná korelace – S. aureus ve vodě & počet koupajících se

podobně platí i u kvasinek (Candida spp., Torulopsis, Trichosporum, Pichia, Cryptococcus, Pitirosporum)

Staphylococcus aureus

S. aureus se nepodařilo prokázat ve sledovaných lokalitách **v objemu 10 ml**

(vyšší objem nebylo možno s ohledem na doprovodnou mikroflóru u kontaminovanějších vod analyzovat)

Prokázán byl jen po skončené koupací sezóně (31.10.2011) na profilech:

Orlík-Radava - 10 ml (6 ktj)

Berounka-Černošice - 1 ml (22 ktj)

stanovení koagulázopozitivních stafylokoků

metodou dle ČSN EN ISO 6888-1 se stanoví:

S. aureus	(pat. pro člověka)
S. intermedius	(pat. pro člověka)
některé kmeny S. hyicus	(ne u člověka)

konfirmasiace S. aureus:

Konfirmace suspektních kolonií :

- plasmakoagulázovým testem

je dosti subjektivní (hodnocení koagulátu), proto bylo potvrzení doplněno o další alternativy

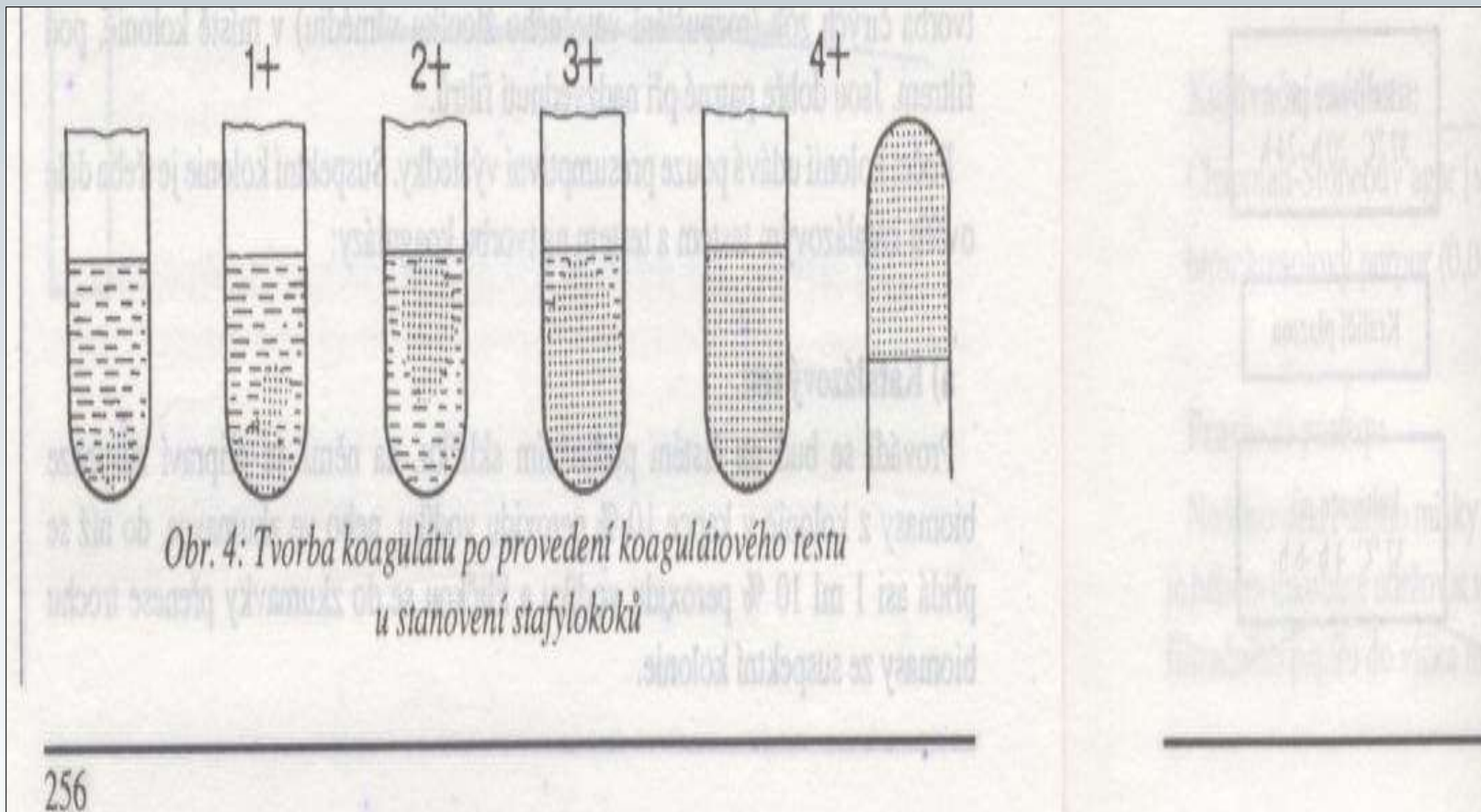
– test s hyaluronidásou

- latexovým testem (Latex Pastorex Stah+, Bio-Rad),

ty však byly negativní i v datu 31.10.

koagulázový test

Häusler, 1994



STAFYLO PK *imuna*

návod výrobce:

Hodnocení:

hodnotí se rychlost a kvalita koagulátu.

Za **pozitivní reakci** se považuje vytvoření koagulátu **do 6 hod.**,

opožděná pozitivní reakce **do 24 hod.**

test na hyaluronidázu

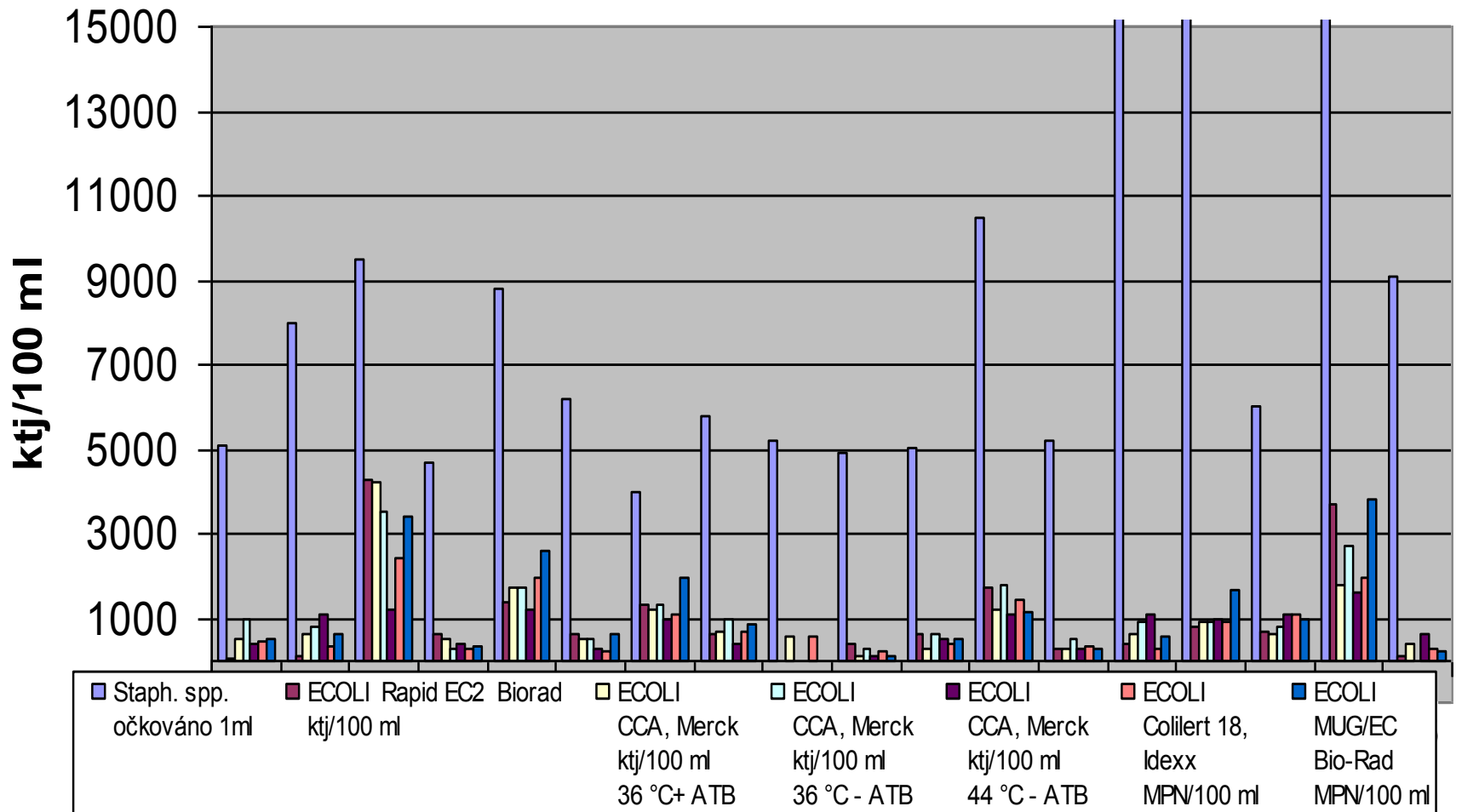
princip: pomocí testu dekapsulace mukozního kmene
Streptococcus equi subsp. zooepidemicus
se produkce hyaluronidázy prokáže pouze u *S. aureus* a
S. hyicus

Obrázek:
Průkaz hyaluronidázy u kmenů rodu *Staphylococcus*

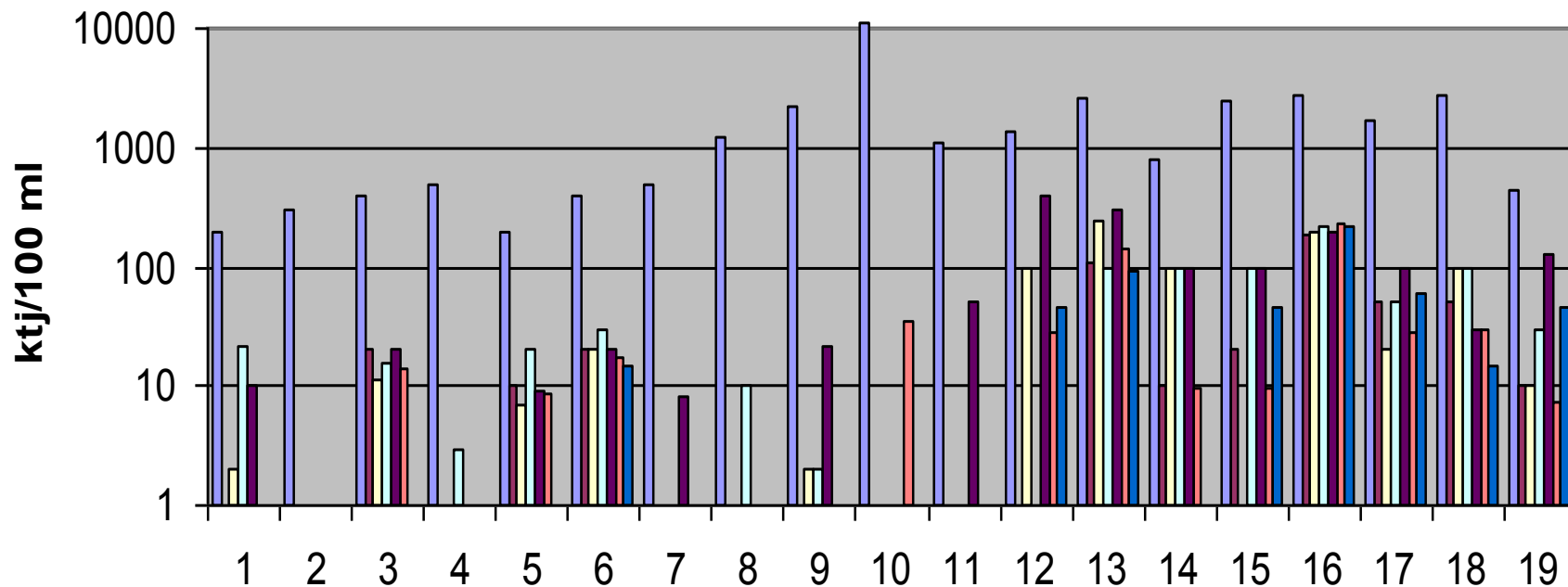
vlevo kmen *S. epidermidis*
vpravo kmen *S. aureus*



Počty Staphylococcus spp. & E. coli - řeky (různé metody)



Počty Staphylococcus spp. & E. coli - Orlík a Šeberák (různé metody)



■ Staph. spp. očkováno 1ml	■ ECOLI Rapid EC2 Biorad ktj/100 ml	■ ECOLI CCA, Merck ktj/100 ml 36 °C+ ATB	■ ECOLI CCA, Merck ktj/100 ml 36 °C - ATB	■ ECOLI CCA, Merck ktj/100 ml 44 °C - ATB	■ ECOLI Colilert 18, Idexx MPN/100 ml	■ ECOLI MUG/EC Bio-Rad MPN/100 ml
-------------------------------	--	---	--	--	--	--

Pseudomonas aeruginosa

/Cabelli a Fraser in Seyfried and Cook/

V koupalištích ve volné přírodě se *P. aeruginosa* nesleduje
jsou známy případy **infekce vnějšího zvukovodu** z koupání
v jezerech (Hořejší jezero a jiná jezera v této oblasti, Kanada)
se **zvýšenými** počty *P. aeruginosa* ve vodě i v sedimentech

(**ve vodě** \bar{x} 122 ktj/100 ml s rozpětím hodnot 2-1.600 ktj/100 ml,
v sedimentech \bar{x} 143 ktj/100g s rozpětím 2-920 ktj/100 g).

Hodnoty fekálních koliformů v sedimentu činily 1600 - >2400/100g sedimentu.

Pseudomonas aeruginosa (2)

Počty *P. aeruginosa* ve volné vodě mohou vzrůst i řádově v době vrcholu koupacích aktivit od 11 – 5 hod (*Cabelli*) což je dáno **resuspendací sedimentu**, který slouží jako reservoár agens.

podobně *Fraser* uvádí změny denzit *P. aeruginosa* v sedimentu a volné vodě v důsledku koupacích aktivit osob.

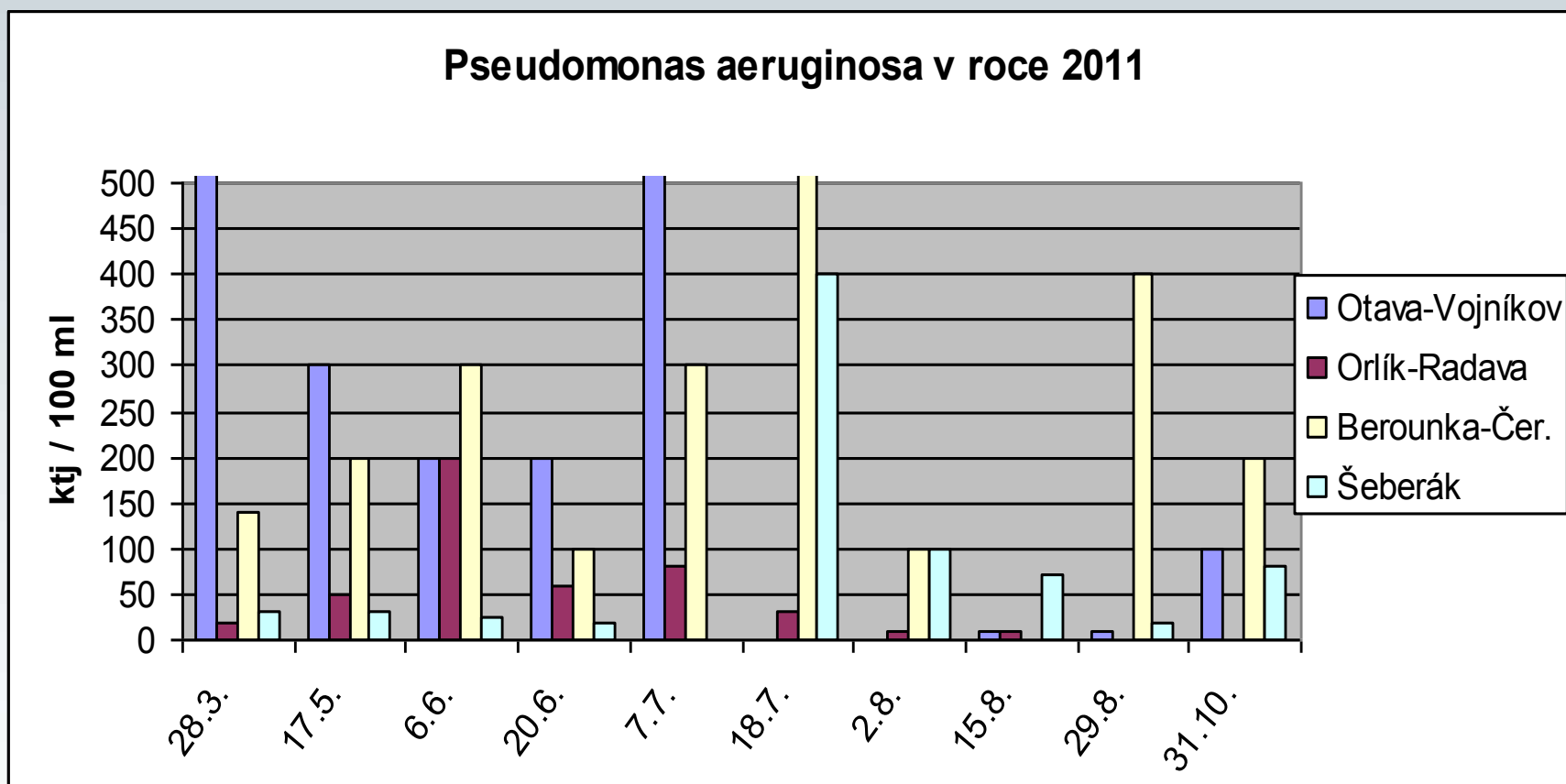
Ráno při počtu **23 osob** *P. aeruginosa* nebyla ve **vodě** ve **100 ml** prokázána, v **sedimentu** v denzitě **612 ktj/100 g**, odpoledně při počtech **135 koupajících** se počty *P. aeruginosa* ve **vodě** dosáhly **42 ktj/100 ml** a v **sedimentu** jen **12/100g**.

Pseudomonas aeruginosa

- **Pseudomonas aeruginosa** byla vyšetřována jednak dle ČSN EN ISO 16266
- v objemu max. 10 ml pro řeky (Otava-Vojníkov, Berounka-Černošice)
- v objemu 100 ml (přehrada Orlík- Radava, rybník Šeberák)
- a dále metodou Pseudalert, Idexx ve 100 ml.

Výskyt *Pseudomonas aeruginosa* na lokalitách Otava-Vojníkov, Orlík-Radava, Berounka-Černošice, rybník Šeberák.

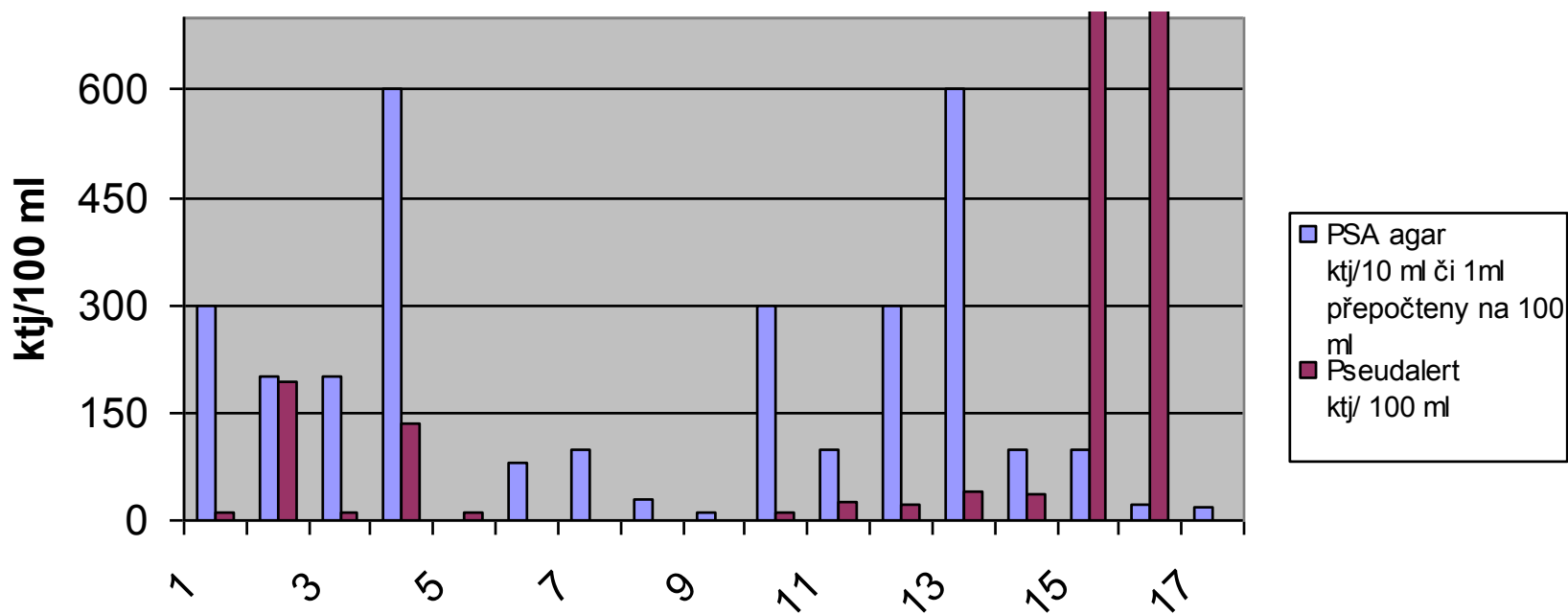
metoda ČSN EN ISO 16266 – CN agar



- Denzity na **řekách** ve sledovaných profilech jsou značné (řádově **stovky ktj/100ml**), na rybníku (Šeberák) a přehradě (Orlík- Radava) **řádově nižší**.
- Vzhledem k tomu, že metoda dle **ČSN EN ISO 16266** aplikovaná na povrchové vody je **velmi pracná** a díky **malých** vyšetřeným **objemům** (v důsledku lokalit s vysokou doprovodnou mikroflórou – řeky) i nepřesná, zkoušeli jsme metodu, která by mohla vyšetřování velice ulehčit.
- Jedná se o metodu na principu MPN s fluorescentní koncovkou – **Pseudalert, Idexx** s deklarovanou vysokou mezí detekce (1 ktj/100 ml v pitné či balené vodě).
- Jejich srovnání však zatím přineslo jen **značné difference** ve všech porovnávaných parametrech – **průměr, medián, P90** viz následující tabulka a graf.

srovnání metody na CN agaru & Pseudalert, Idexx

PSA agar (počty ktj/ml či 10 ml - přepočet na 100 ml) & **Pseudalert** (ktj/100 ml) - všechny lokality



srovnání metody na CN agaru a Pseudalert, Idexx

- I když je deklarováno výrobcem, že test Pseudalert detekuje *P. aeruginosa* již za přítomnosti **jediné** kolonie ve 100 ml vzorku vody do 24 hod. v balené vodě a vodě z bazénů a lázní, v povrchové vodě či v **relativně „čisté vodě“** v přehradě Orlík toto **neplatí**.
- V řadě dat bylo zjištěno, že **Pseudalert detekuje 0 ktj ve 100 ml** vyšetřené vody, **zatímco CN agar vykazuje záchyty již v 1 ml (Orlík, Šeberák),**
- jindy vede k neadekvátním hodnotám, v případě Pseudalertu i řádově podhodnocené (většinou řeky).
- Výjimečně dává Pseudalert falešně pozitivní hodnoty (Šeberák) $>2.419,2 / 100$ ml zatímco CN agar jen 23-100/100 ml, což zatím není objasněno???

Příklady největších diferencí mezi metodami Pseudalert, Idexx a CN médiem dle ISO 16266

Datum:	Lokalita:	Pseudalert, Idexx ktj/100 ml	CN agar ISO 16266	CN agar přepočít na 100 ml
6.6	Otava-Vojníkov	10,9	5/ml	500
6.6.	Berounka-Černošice	38,9	9/ml	900
6.6.	Rybník Šeberák	>2.419,2	2,3/10 ml; 1/ml	23 - 100
20.6.	Orlík- Radava	0	6/ 10 ml 2/ml;	60; 200
20.6.	Rybník Šeberov	0	2/10 ml	20
7.7.	Orlík-Radava	1,0	8/10 ml	80
18.7.	Orlík-Radava	0	6/10 ml ; 1/ml	60; 100
18.7.	Rybník Šeberák	3,1	8/ml	800
18.7.	Berounka-Černošice	39,9	6/ml	600
2.8.	Orlík- Radava	0	1/10 ml	10

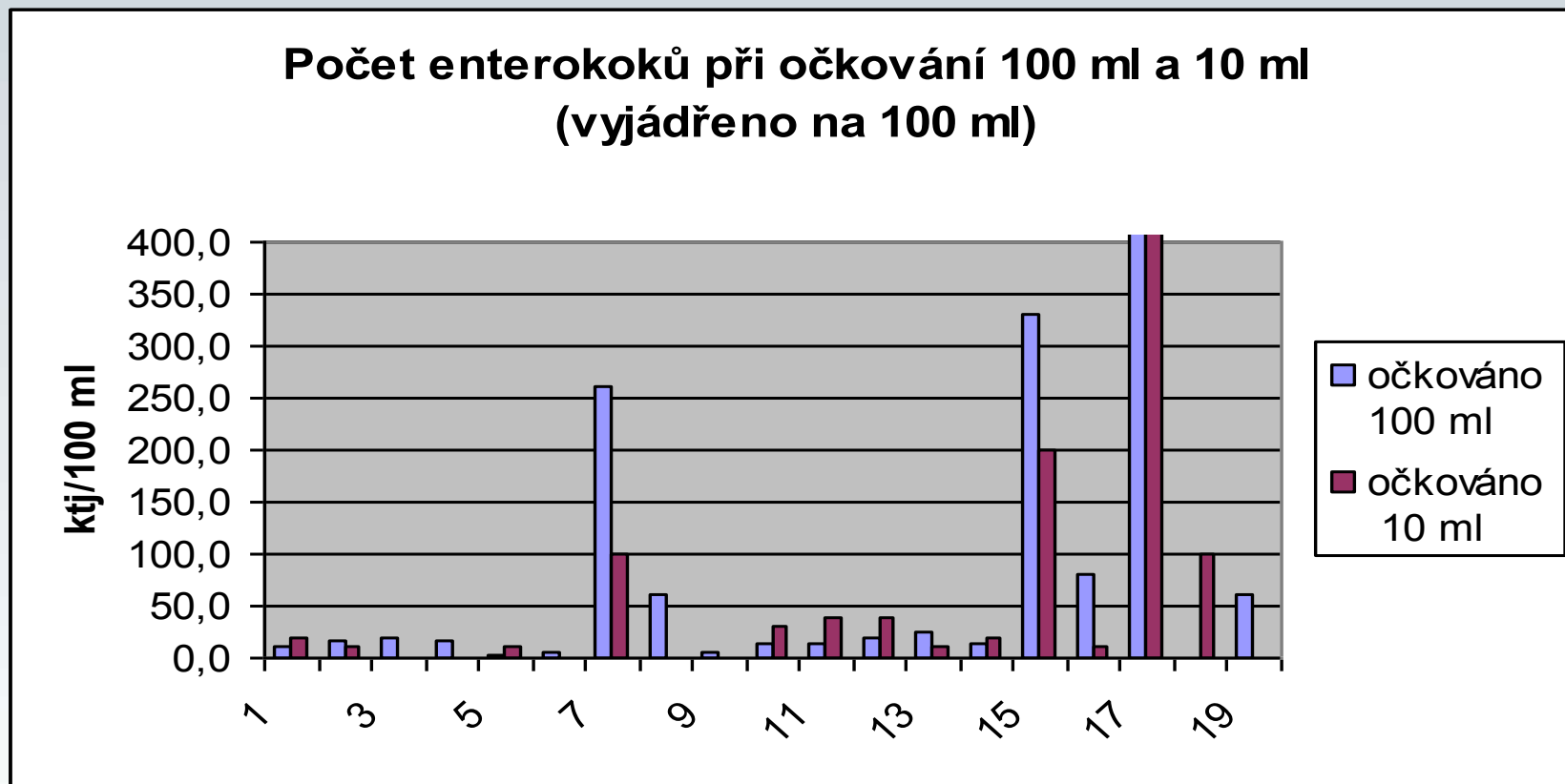
Výsledky z roku 2011 – fekální indikátory

- byly zjištěny **rozdíly** konečných výsledků při očkovaní **menších objemů** vzorků vody (1ml & 10 ml) a následném přepočtu na vyšší objem (obvykle 100 ml) – **u silněji znečištěných vod!**
 - *důvod (více prostoru pro cílové mikroorg., méně doprovodné mikroflóry na jedn. prostoru, méně inhibice)*
- **rozdíly** při očkovaní **větších objemů** (100 ml) proti menšímu (10 ml) – **u čistších vod!**
 - *důvod (u čistých vod nižší vyšetřený objem nepostihne řádně kvantitativní poměry)*

enterokoky - očkování 100 ml a 10 ml

přepočet na 100 ml

čistší vody – přehrada Orlik, rybník Šeberák



enterokoky - očkování 100 ml a 10 ml

přepočet na 100 ml

očkováno:	100 ml	10 ml
arit. prům.	81,74	67,93
medián	16,00	10,00
P90	274	120
ttest	0,7884737	
$t^{krit}_{0,05, n=19}$	2,101	
$t^{krit}_{0,01, n=19}$	2,878	
Pearson $r =$	0,918946901	

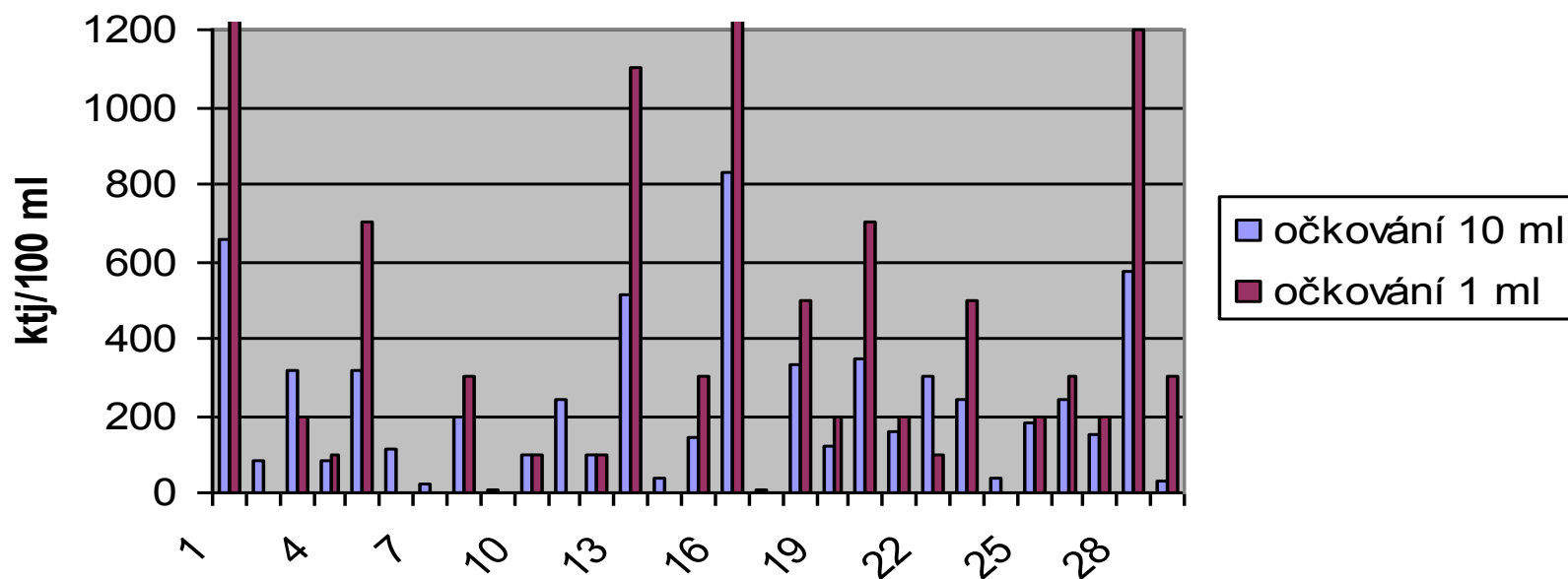
záleží na denzitě cílových mikrobů (zde objem 10 ml řádně nezachytí kvantitativní poměry)

enterokoky - očkování 10 ml a 1 ml

přepočet na 100 ml

kontaminovanější vody – řeky

**Počty enterokoků při očkování 10 ml a 1 ml
vzorku vody a přepočtu na 100 ml**



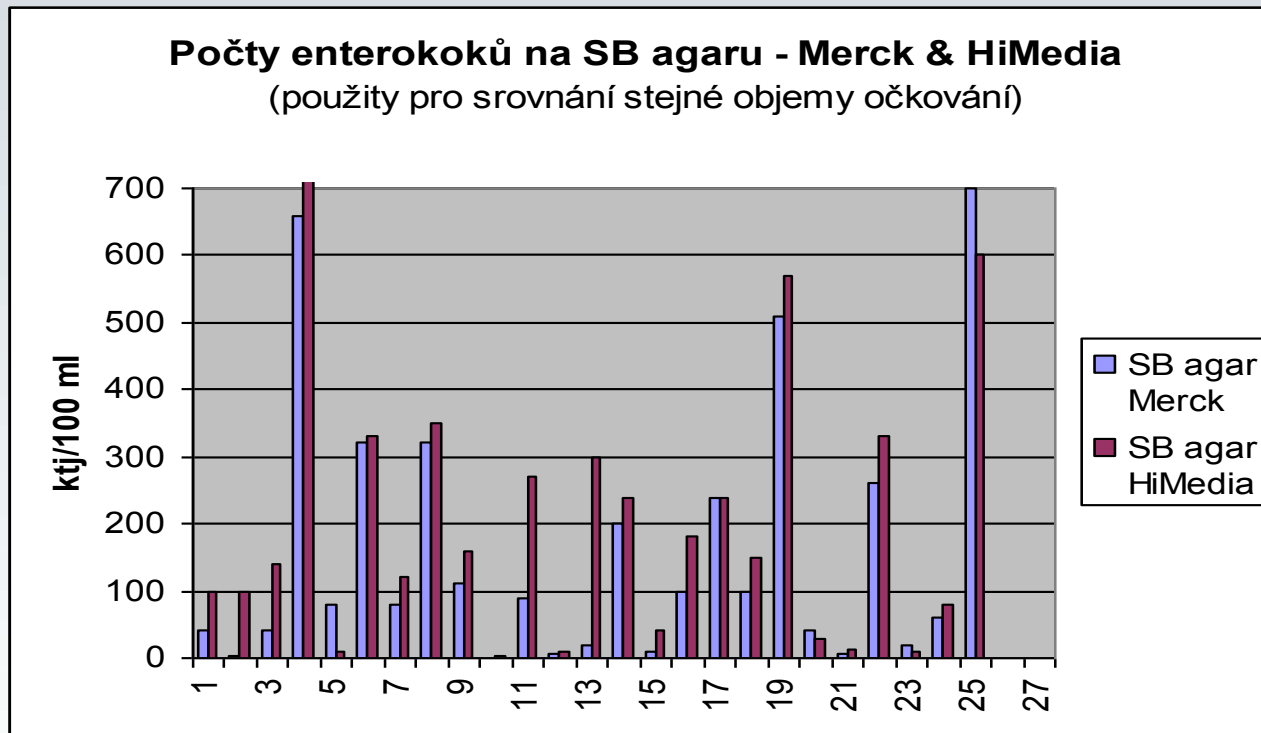
enterokoky - očkování 10 ml a 1 ml

přepočet na 100 ml

arit.prům.		223,4482759	351,7241379
medián		160	200
P90		522	1120
ttest		0,013450139	
$t^{krit}_{., 0,05}$ n =29		2,042	
$t^{krit}_{., 0,01}$ n =29		2,75	
Pearson	r =	0,920731242	

Výsledky 2011

- média od různých výrobců dávají různé výsledky (i když odpovídají receptuře dle příslušné normy)

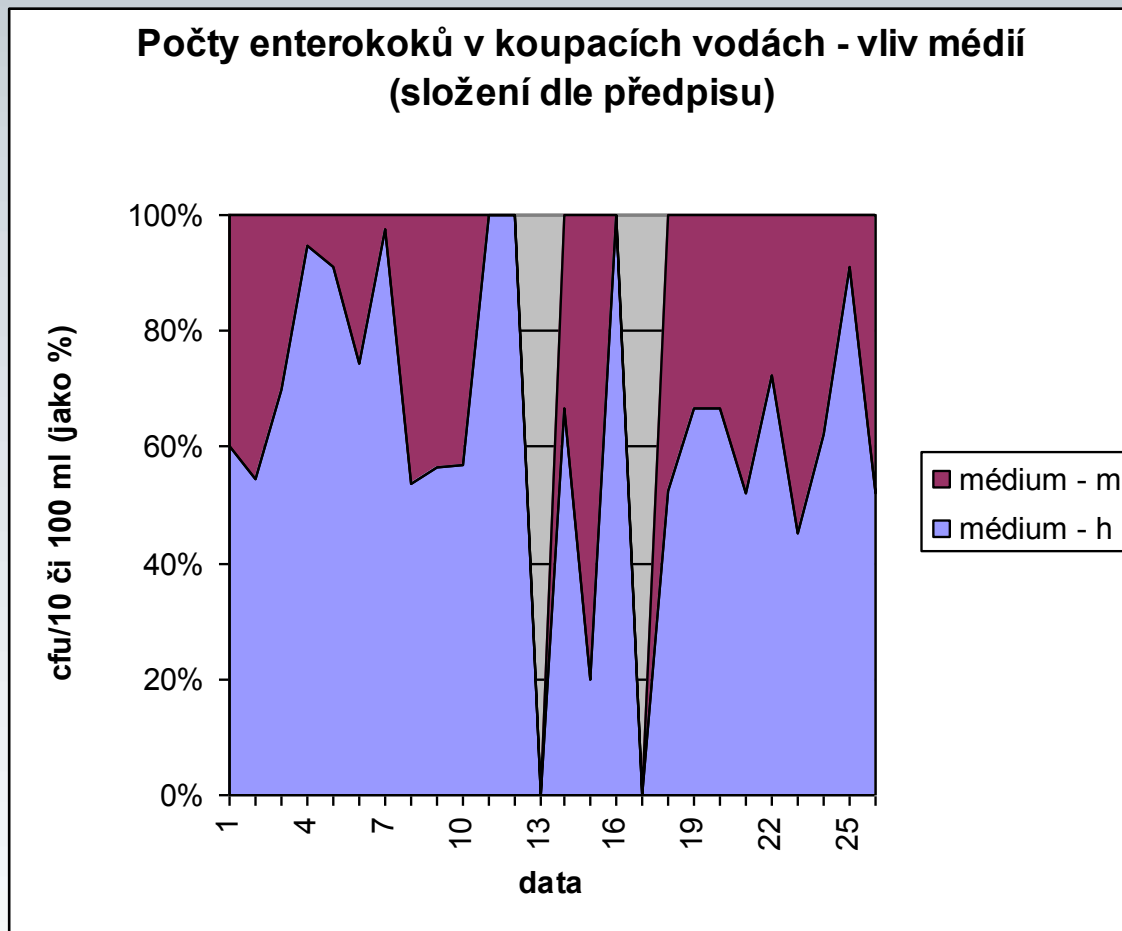


média od různých výrobců

Merck & HiMedia

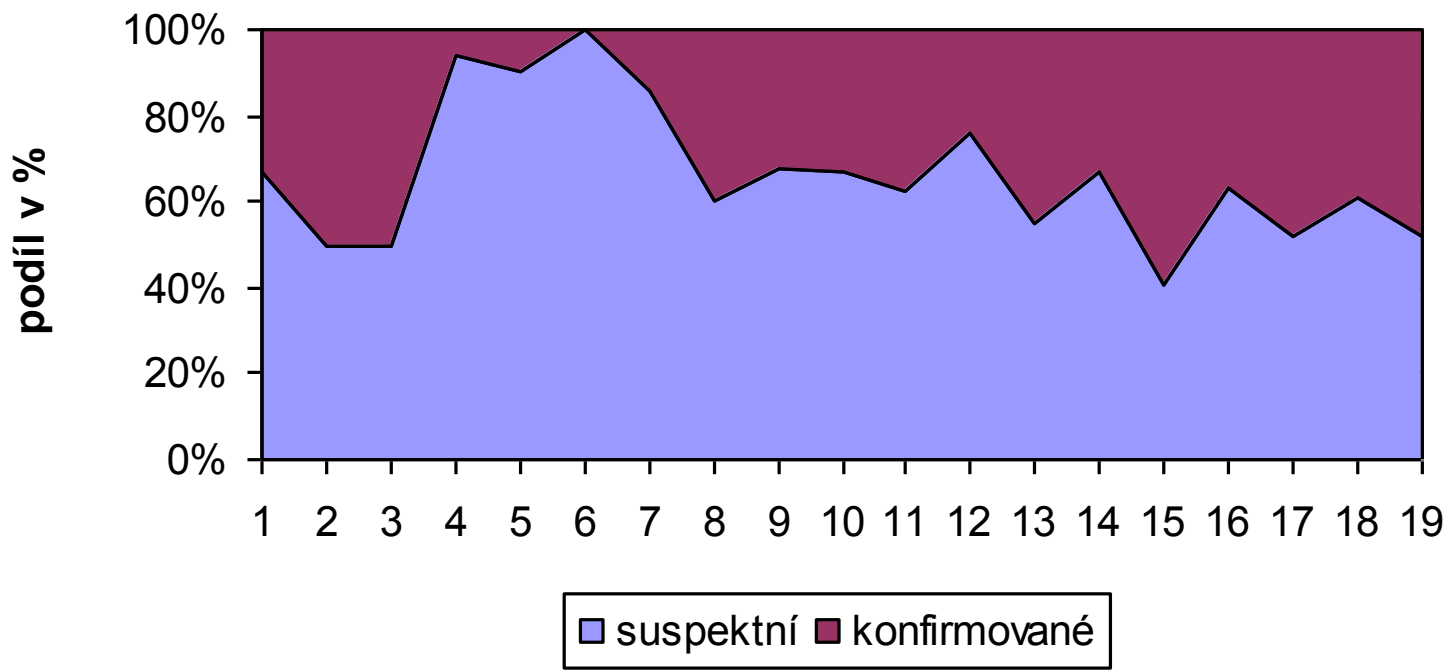
výrobce:		Merck	HiMedia
arit.prům.		148,7037037	192,77778
medián		80	140
P90		396	438
Pearson	r =	0,931215102	
ttest		0,005789828	
		0,429823433	
tkrit., 0,05	n =27	2,042	
tkrit., 0,01	n =27	2,75	

média od různých výrobců



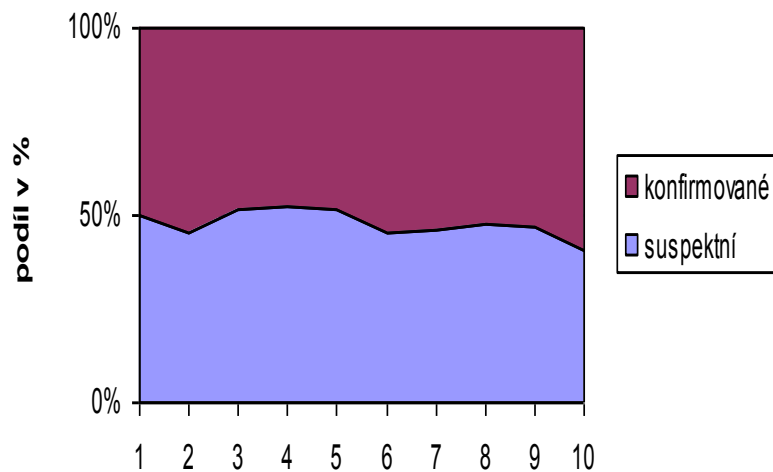
poměr suspektních a konfirmovaných kolonií

**Poměr suspektních a konfirmovaných kolonií na
médiu SB (ch)**

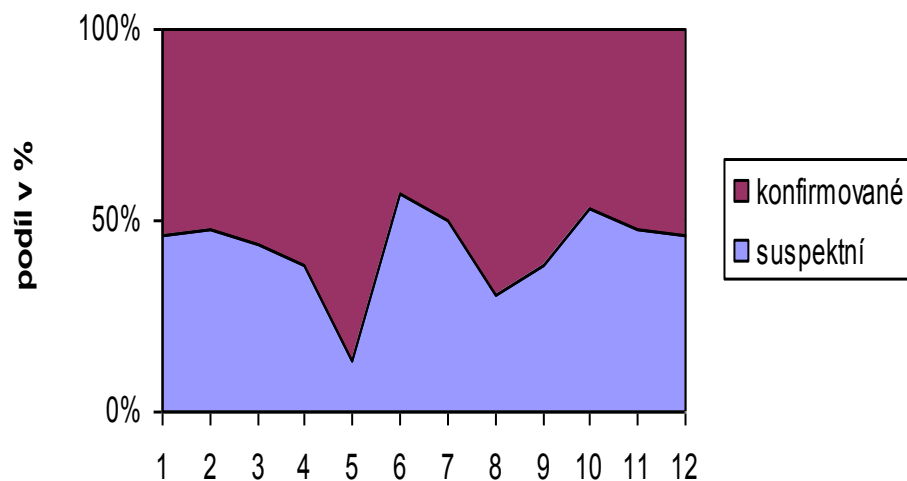


poměr suspektních a potvrzených kolonií

Poměr suspektních a potvrzených kolonií na médiu SB (CM) - lokalita Šeberák

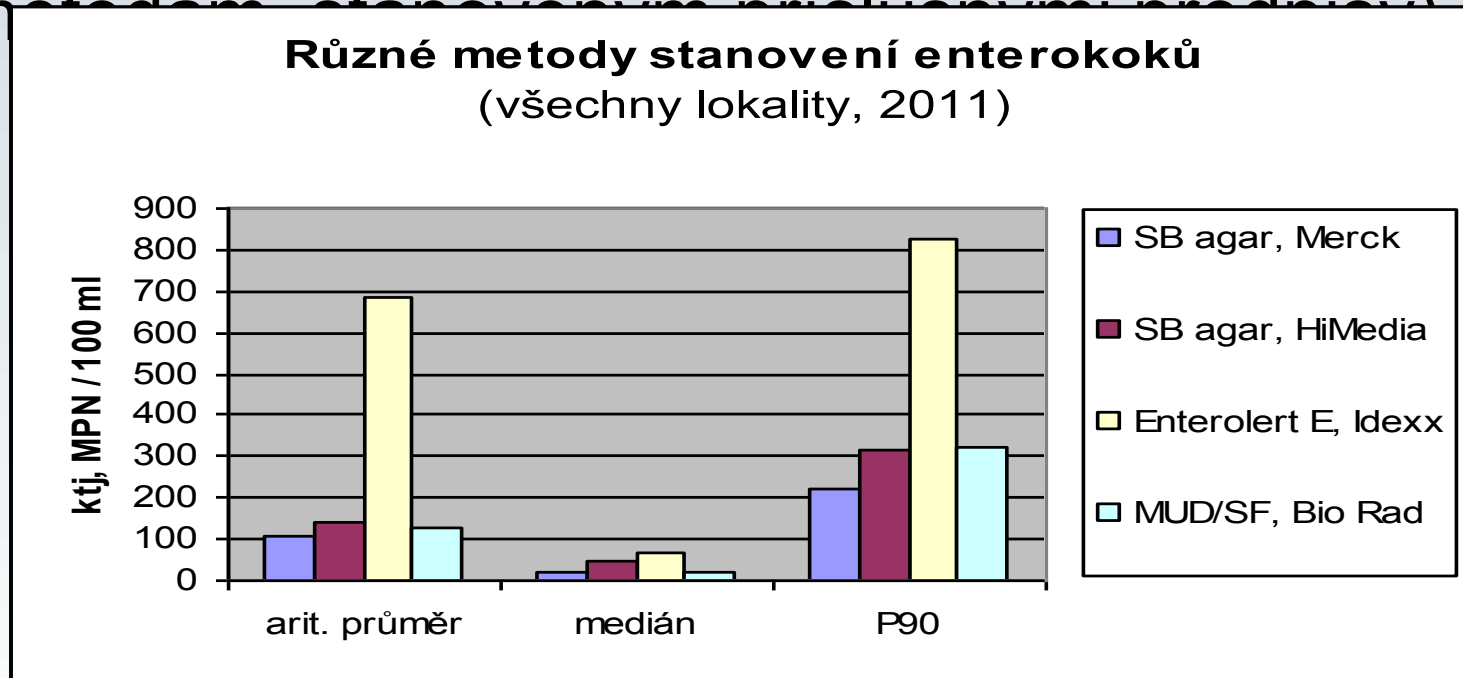


Poměr suspektních a potvrzených kolonií na médiu SB (CM) - lokalita Ovčáry



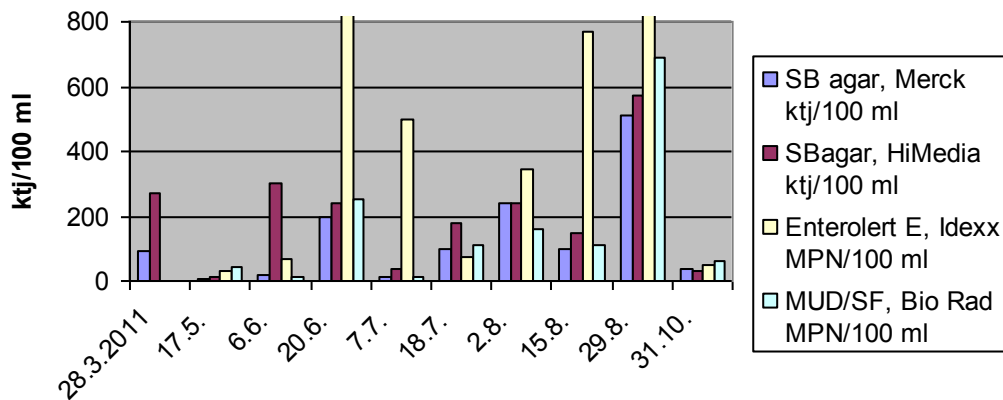
Výsledky 2011

- použití různých alternativních metod dává různé výsledky (i když tyto odpovídají referenčním metodám s přesností příslušného předpisu)



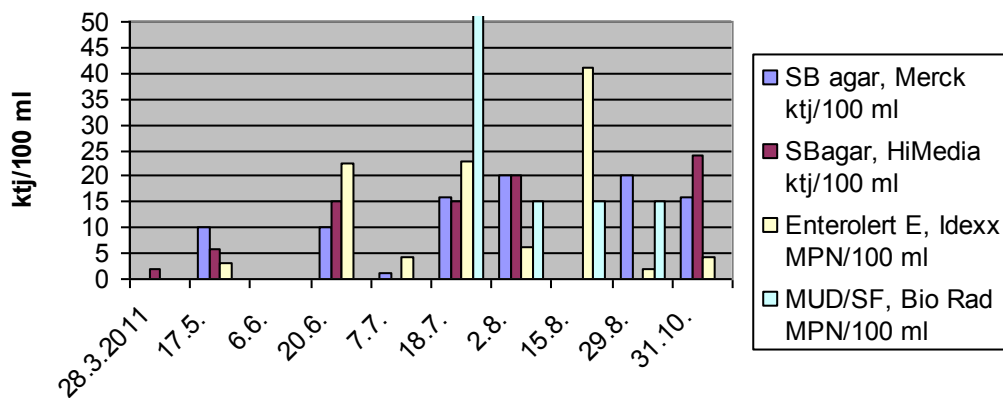
Počty enterokoků na profilu Berounka-Černošice

(srovnání různých metod)

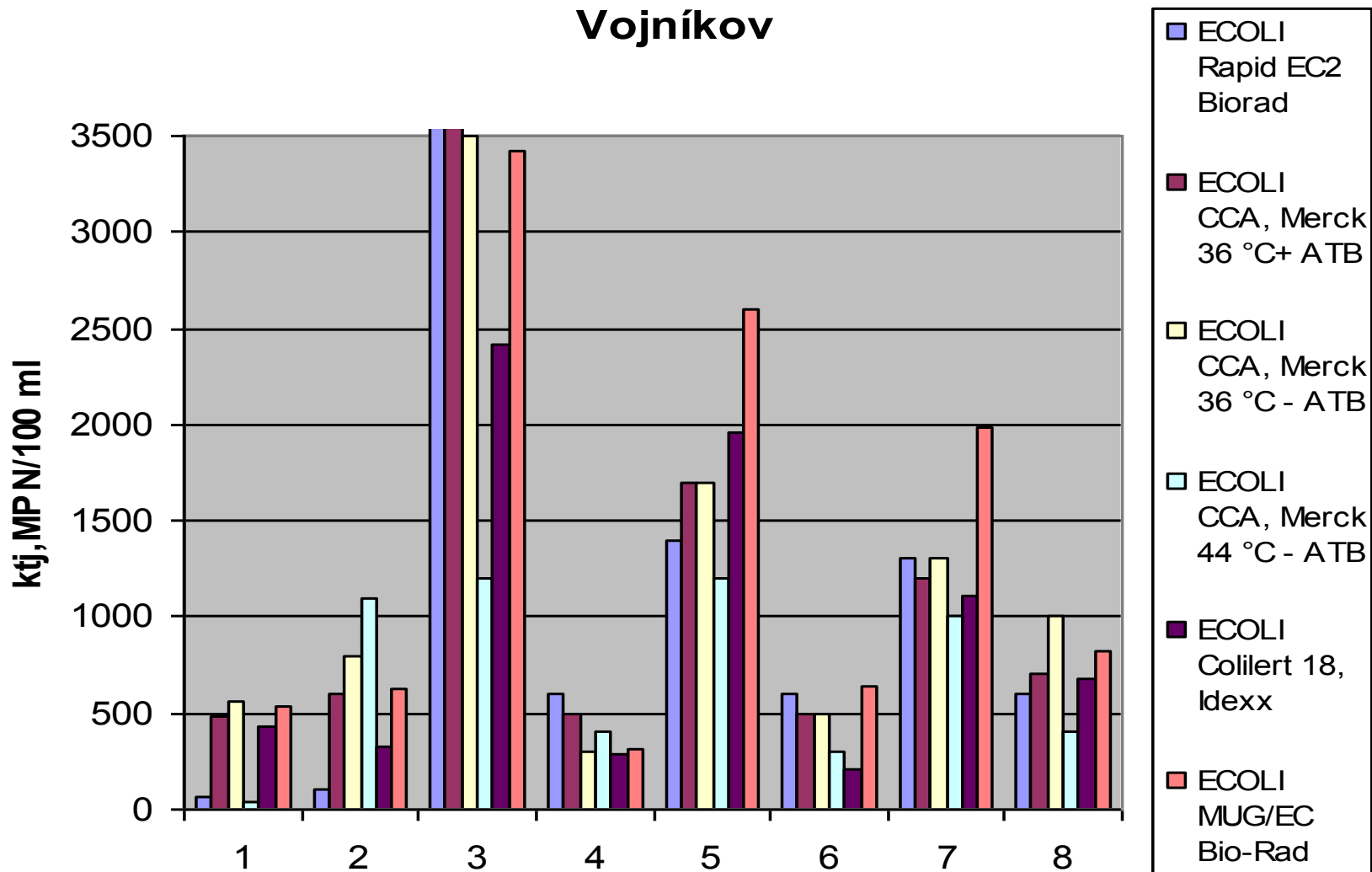


Počty enterokoků na profilu Orlík-Radava

(srovnání metod)



Srovnání metod stanovení E. coli - profil Otava Vojníkov



výpočty a srovnání metod stanovení E. coli

	ktj/100 ml				MPN/100ml	
ECOLI Rapid EC2 Biorad	ECOLI CCA, Merck 36 °C+ ATB	ECOLI CCA, Merck 36 °C - ATB	ECOLI CCA, Merck 44 °C - ATB	ECOLI Colilert 18, Idexx	ECOLI MUG/EC Bio-Rad	
arit.prům.	533,823529	490,6264706	552,664706	421,764706	433,5559	609,7059
medián	100	210	160	250	207,8	161,5
P90	1370	1200	1580	1100	1323,12	1878,6
ttest	Rapid EC2	0,844695337	0,93207377	0,55448411	0,62134	0,322246
$t^{krit}_{., 0,05}$	n =38	2,021				
$t^{krit}_{., 0,01}$	n =38	2,704				
Pearson	Rapid EC2	0,927469852	0,95924191	0,74069445	0,914291	0,930895
Pearson		CCA36+ATB	0,94905635	0,7394968	0,91854	0,894455
Pearson			CCA36-ATB	0,82768626	0,955356	0,944822
Pearson				CCA44-ATB	0,838939	0,837489
Pearson					Colilert 18	0,954401

Výsledky 2011

- difference mezi metodami
- bakt. půdami (různí výrobci)
- různá velikost očkovaného objemu a následné přepočty výsledků na jiný objem

zjištěné na základě statistických parametrů (**arit. průměr, medián, P90**)

nebyly sice statisticky významné ($\alpha = 0,05$ i $\alpha = 0,01$), ale představovaly **značné procentuální rozdíly**, což by mohlo mít význam pro posuzování a klasifikaci jakosti vody

Výsledky 2011

- V rámci projektu bylo sledováno i různé složení CCA média (uvažovaná náhrada při revizi **ISO 9308-1**):
- **nejvhodnější** se jeví varianta **CCA (36°C-ATB)** jak k médiu Rapid EC2, Bio-Rad
- k metodě Colilert 18, Idexx
- MUG/EC, Bio-Rad
- oproti variantám **CCA (36°C+ATB)** či **CCA (44°C –ATB)**

podobné závěry vykázal i předvalidační test ISO:

CCA- ATB pro pitné vody CCA + ATB pro
povrchové

Výsledky 2011

- Byly sledovány i různé potvrzovací /konfirmační testy při stanovení *S. aureus*:
 - Staphylo PK test
 - test s průkazem hyaluronidázy
 - latexový test Latex PastorexTM Staph+.

Vzhledem k minimálnímu výskytu *S. aureus* ve sledovaných koupacích vodách závěry necháme na následující sezónu

31.10.2011 - pozitivní SPK, Imuna (koagulum hodnoceno 3+ viz Häusler 95)

testy s hyaluronidázou i latexový test (Latex Pastorex) jsou negativní !!!

Výsledky 2011

stanovení *P. aeruginosa*:

CN agar dle ČSN EN ISO 16266 a

Pseudalert, Idexx (není určen pro povrchové vody)

spolu nekorespondují

ani kvantitativně ani mezí detekce

Zpracování s podporou projektu TAČR

TA 01020675