

Pseudomonas aeruginosa v rekreačních vodách

Jaroslav Šašek

Státní zdravotní ústav, Praha 10, Šrobárova 48

seminář ke koupacím vodám, VÚV Praha, 2014

European Directive 2006/7/EC

concerning the management of bathing water quality.....

stanoví požadavky jen pro



fekální indikátory (E. coli, intestinální enterokoky)

ale ne pro patogeny

V rámci projektu se vedle indikátorů analyzovaly i některé patogeny - *P. aeruginosa*, *S. aureus*, termofilní kampylobaktery, kolifágy a jiné druhy

Národní legislativa

Pseudomonas aeruginosa:

- pravidelně sledována ve vodě umělých koupališť (vyhl.č. MZ ČR č.238/2011 Sb.)
- nesleduje se u přírodních koupališť dle části II vyhl. č. 238/2011 Sb.)
- sleduje se zatím u typu vod dle části III. vyhl. č. 238/2011 Sb. (§13 – 15) – nádrže ke koupání a stavby ke koupání vybavené systémem přírodního způsobu čištění (**limitní hodnotou 10 KTJ/ 100 ml**)
- vypouští se novelou vyhl. 238/2011 Sb. – ukazatel *P. aeruginosa* dle III. části vyhlášky vypouští

**Počty indikátorových mikroorganismů a procento výskytu patogenů
(*Campylobacter*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Noroviry*) v povrchové
vodě (řeky, jezera – Hõrman et al., 2004, Finsko)**

<u>E. coli (MPN/100 ml)</u>	<u>C.p.(%)</u>	<u>F-RNA (%)</u>	<u>% pozit. enteropat.</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

Pseudomonas aeruginosa

- Je široce rozšířen v prostředí (voda, půda, ovzduší) zdroje – splašky (v 90%), zemědělská půda, divoká a hosp. zvířata, hmyz, zemědělské plodiny, potraviny,
- Přežívání v prostředí: – ve sladkých vodách přežívá *P. aeruginosa* více než 28 dní, v podzemní vodě > 12 dní, v říční vodě > 8 dní, balené pramenité vodě > 33 dní, minerální vodě > 20 dní, destilované vodě > 7 dní.

odkazy:

Seyfried, Cook, 1984- otitis externa infections in five Ontario lakes
van Asperen et al, 1995 – otitis externa in Dutch fresh water lakes
Mena, Gerba, 2009 – risk assessment of *P. aeruginosa* in water

Onemocnění

P. aeruginosa vyvolává řadu onemocnění -

zejména oční infekce, záněty středního a vnějšího ucha, kožní onemocnění (folikulitida, dermatitidy), ale i ranné infekce, onemocnění respiračního, trávicího a urogenitálního traktu, kojenecké gastroenteritidy a meningitidy, endokaritidy, sepse a j.

V případech umělých koupališť (vířivky, hydroterapeutické a koupelové bazény) byly prokázány otitis externa, folliculitis, infekce močových cest, ranné infekce a pneumonie.

Normální mikroflóra zdravých osob kolonizuje povrch kůže, zejména v ohybech, sliznice respiračního a trávicího traktu.

P. aeruginosa se vyskytuje v této mikroflóře ve **2,6 – 25 % zdravých osob**; nosičství v gastrointestinálním traktu po hospitalizaci však roste až **k 38 %**.

Riziko onemocnění

- není znám dosud vztah mezi dávkou a odezvou po expozici (dose- response relationship); nelze tedy použít rizikovou analýzu
- všeobecně je přijímán fakt, že spíše než nějaký, konečný počet buněk je významnější pro vznik infekce doba expozice (kontaminované vodě) a predispoziční faktory hostitele
- Infekční dávka *P. aeruginosa* – orální činí 10^{8-9} [Rusin, 97]; intranasální ID50 (pro myš) je $2,7 \cdot 10^7$, bez odezvy ($1,6 \cdot 10^3$ KTJ), subletální dávka je 10^6 , takže kalkulace pro zdravé osoby na základě rozdílu mezi hmotností myši a člověka činí $> 10^7$ [Rice, 2012].

Pro vznik folliculitis u zdravých osob se udává $> 10^3 - 10^6$ KTJ [Price, Ahearn, 88],

onemocnění z koupacích vod (1)

- stovky KTJ/ 100 ml *P. aeruginosa* v přírodních koupalištích, aniž by došlo k výskytu onemocnění:

[Mena, Gerba, 2009] pro jezera v rozmezí 0-100/100ml,

[Seyfried, Cook, 84] 0 – >1000/ 100 ml, pro řeky 31 – 524/100 ml,

[Falcao, 93] 33/100 ml,

[Payment et al., 88] 268 – 536/100 ml

onemocnění z koupacích vod (2)

- k onemocnění - případy infekce vnějšího zvukovodu došlo při počtech – jednotky až stovky KTJ/100 ml
údaje z kanadských jezer [Seyfried, Cook, 84]

z koupání v jezerech (Hořejší jezero a jiná jezera v této oblasti, Kanada) s počty *P. aeruginosa* ve vodě i v sedimentech
(ve vodě \bar{c} 122 ktj/100 ml s rozpětím hodnot 2 – 1.600 ktj/100 ml)
ve spojení s dalšími faktory:

věk pod 19 let, vyšší frekvence koupání (minimálně 5 x týdně)
v případech s dřívější ušní patologií.

Je vidět i zde, že významnou roli hrají především doba expozice vodě (tedy i frekvence koupání), vedle predispozičních faktorů a dřívější patogenese jedince.

onemocnění z koupacích vod (3)

- k ušní infekci *P. aeruginosa* při expozici vodě z přírodních koupališť může dojít i při velmi nízkých počtech:

(*Van Asperen, 2011*) uvádí z holandských jezer počty (medián) 4 KTJ/ l, s rozpětím 1 – 63;

podobně uvádí (*Schets a kol. 1995*) také z holandských jezer rozpětí hodnot 2 – 37 ktj/100 ml.

Metody & monitoring

ČSN EN ISO 16266

monitoring v rámci projektu:

- přehrada Orlik (profil Radava)
- přehrada Hostivar (na kraji Prahy)
- rybník Šeberák (na kraji Prahy)
- řeka Berounka (profil Černosice), vzdutí
- řeka Sázava (profil Pikovice), tok řeky

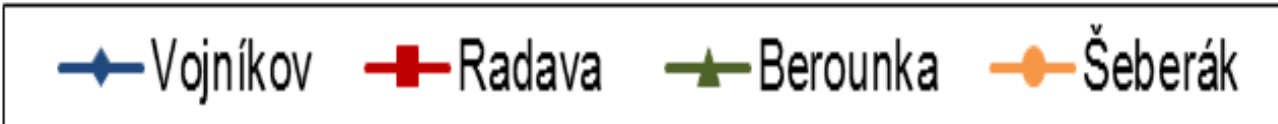
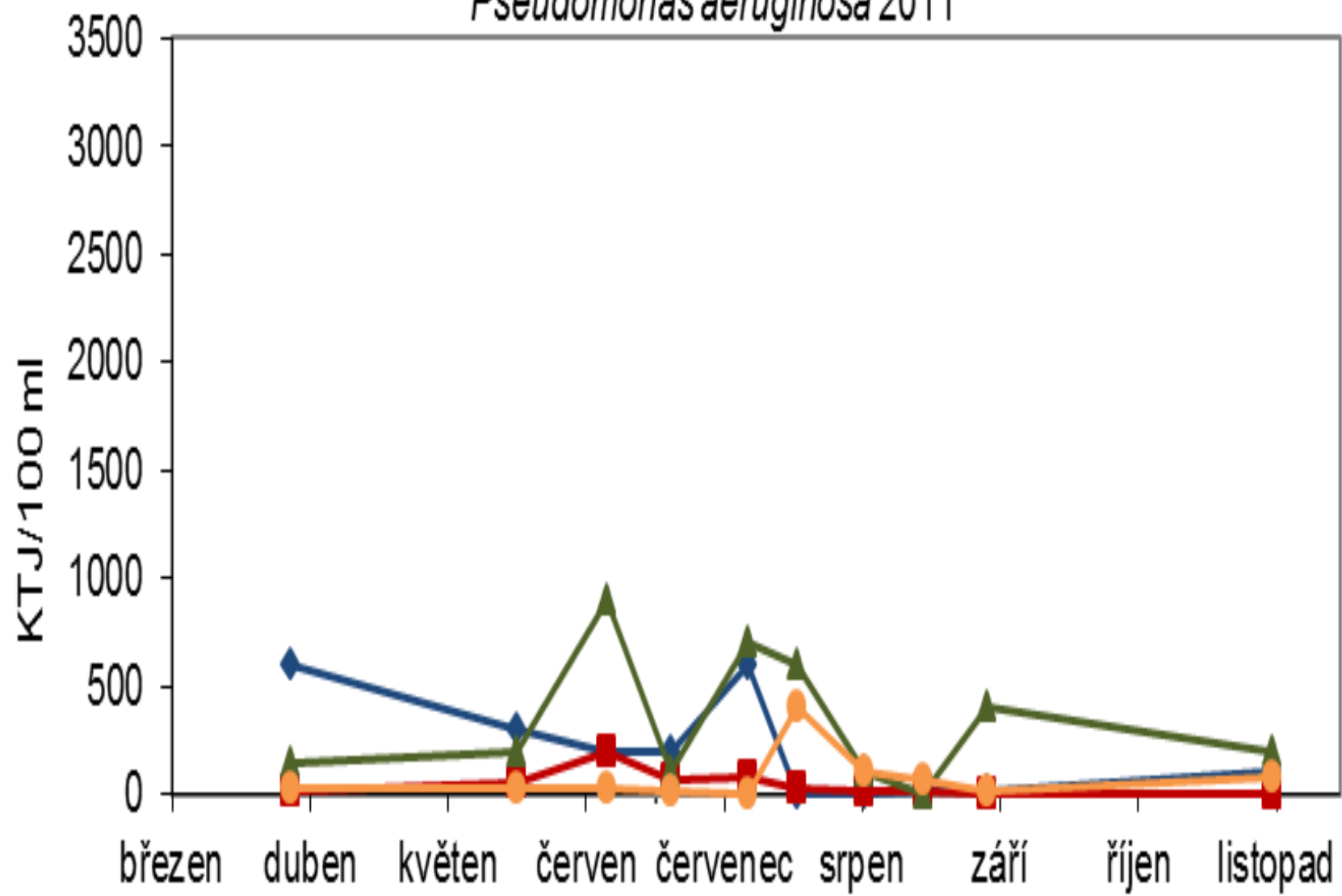
výskyt *P. aeruginosa* v přírodních koupalištích (projekt Mekovod)

počty na **řekách** ve sledovaných profilech jsou značné (řádově **stovky ktj/100ml, v maximech tisíce**)

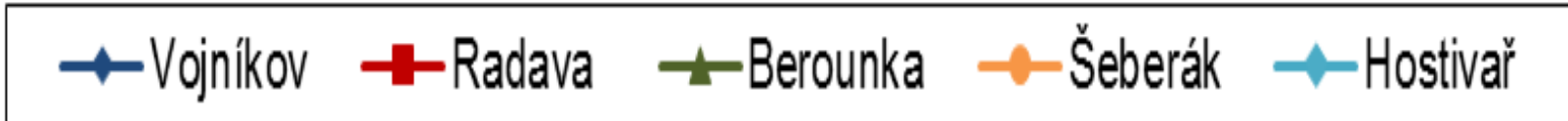
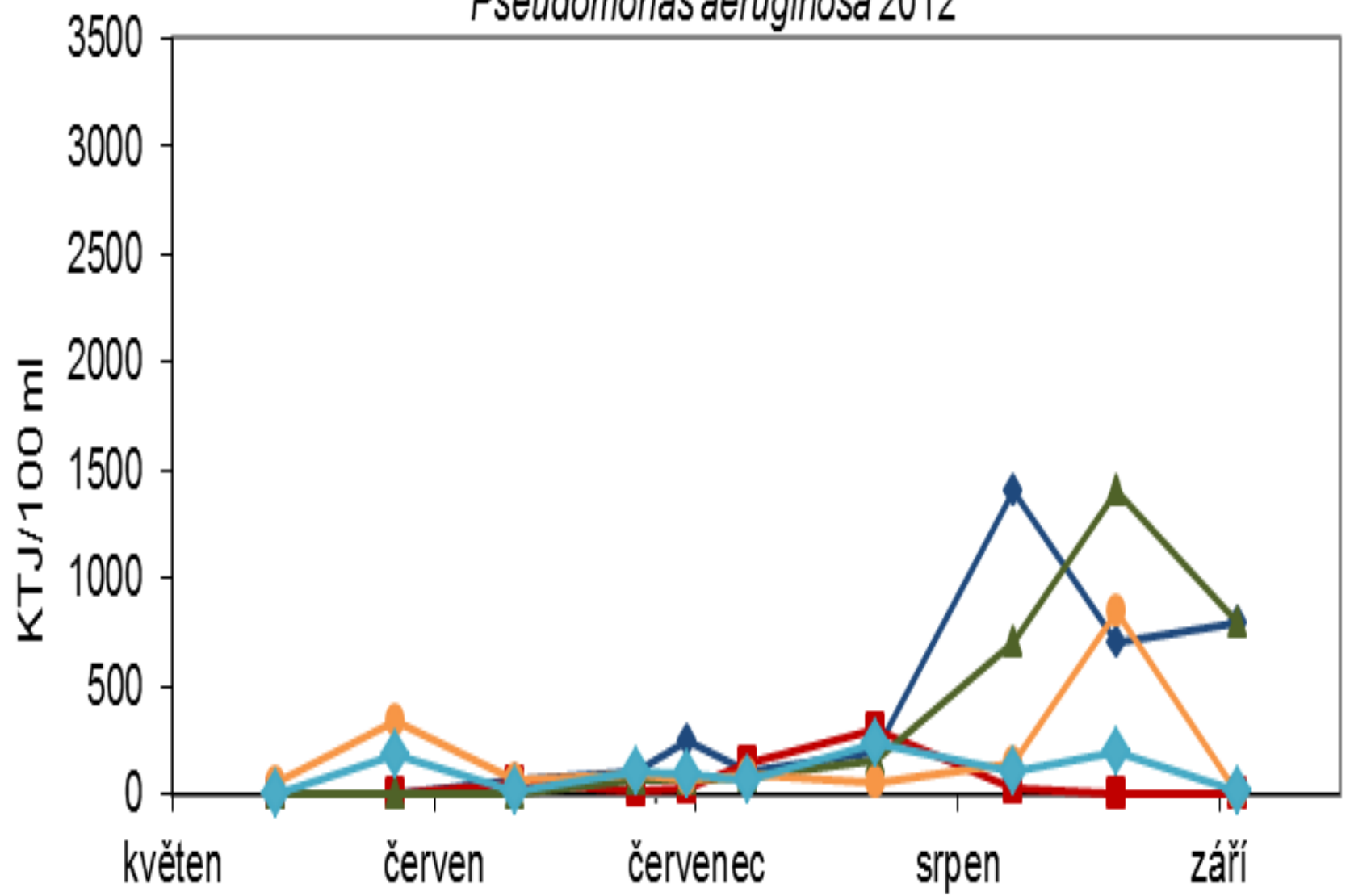
na **rybníku** (Šeberák) a **přehradách** (Orlík- Radava a Hostivař)
řádově nižší (desítky ktj/100 ml; v maximech rozvoje stovky)

Trend výskytu *P. aeruginosa* v průběhu sezóny je však v každém roce jiný (2011-2013).

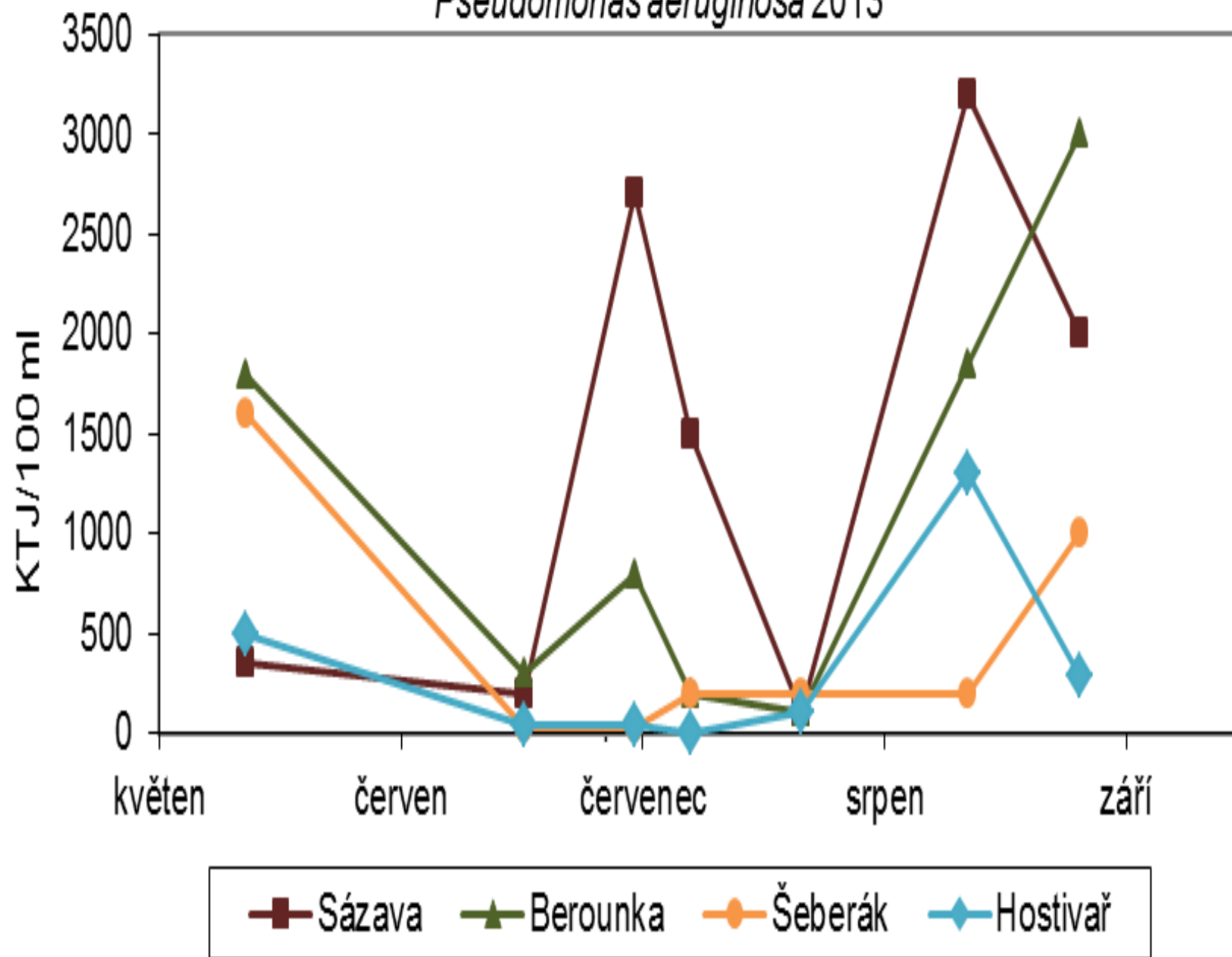
Pseudomonas aeruginosa 2011



Pseudomonas aeruginosa 2012



Pseudomonas aeruginosa 2013



Výskyt *P. aeruginosa* v přírodních bazénech

- německé údaje [Heinemeyer, Luden, 2009] ukazují, že *P. aeruginosa* se zde běžně prokazuje

Monitoring 5-ti těchto přírodních bazénů ukázal, že v 93 vzorcích vody bylo prokázáno 3226 presumptivních kolonií *P. aeruginosa* dle metody EN 12780 (totožná s EN ISO 16266).

Podstatné je, že **20 vzorků vody z 93 (23,5%)** z těchto přírodních bazénů překračuje **stanovený limit (německý) 10 KTJ/100 ml**; 72 % případů však byly falešně pozitivní výsledky

v 72% případů se nejednalo o *P. aeruginosa*, nýbrž o jiné druhy (*P. fluorescens*, *P. putida* a j.), což je ale metodický problém současných mezinárodních norem, které jsou ale určeny pro pitnou vodu či bazény.

Výskyt *P. aeruginosa* v přírodních bazénech v ČR

- v roce 2012 monitoring výskytu *P. aeruginosa* v přírodních bazénech v různých krajích v ČR ukázal potíže s dodržením limitu 10 KTJ/ 100 ml ve většině lokalit.
- paralelní monitoring na přírodních koupalištích (liberecký kraj) ukázal, že ve většině z nich je *P. aeruginosa* přítomna (na 26 lokalitách z 27) a 11 x (ve 41%) je překročen limit.

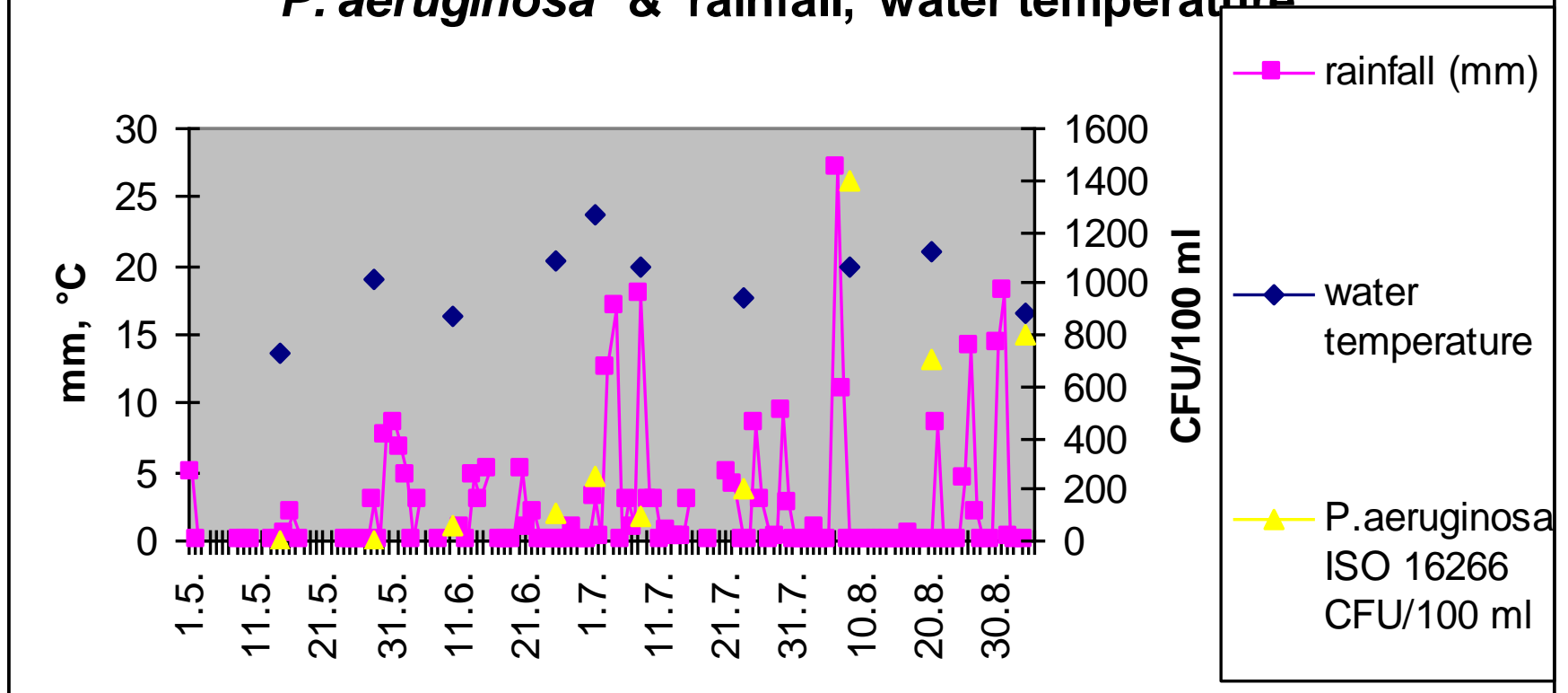
P. aeruginosa ve vztahu k extrémním srážkám a vyšší teplotě vody

předpoklad :

- *Vysoké srážky* – jako ukazatel kontaminace vody z vnějšího prostředí
- *Vysoká teplota vody/ vzduchu* – jako ukazatel kontaminace vody od koupajících se

River Otava - Vojníkov in 2012

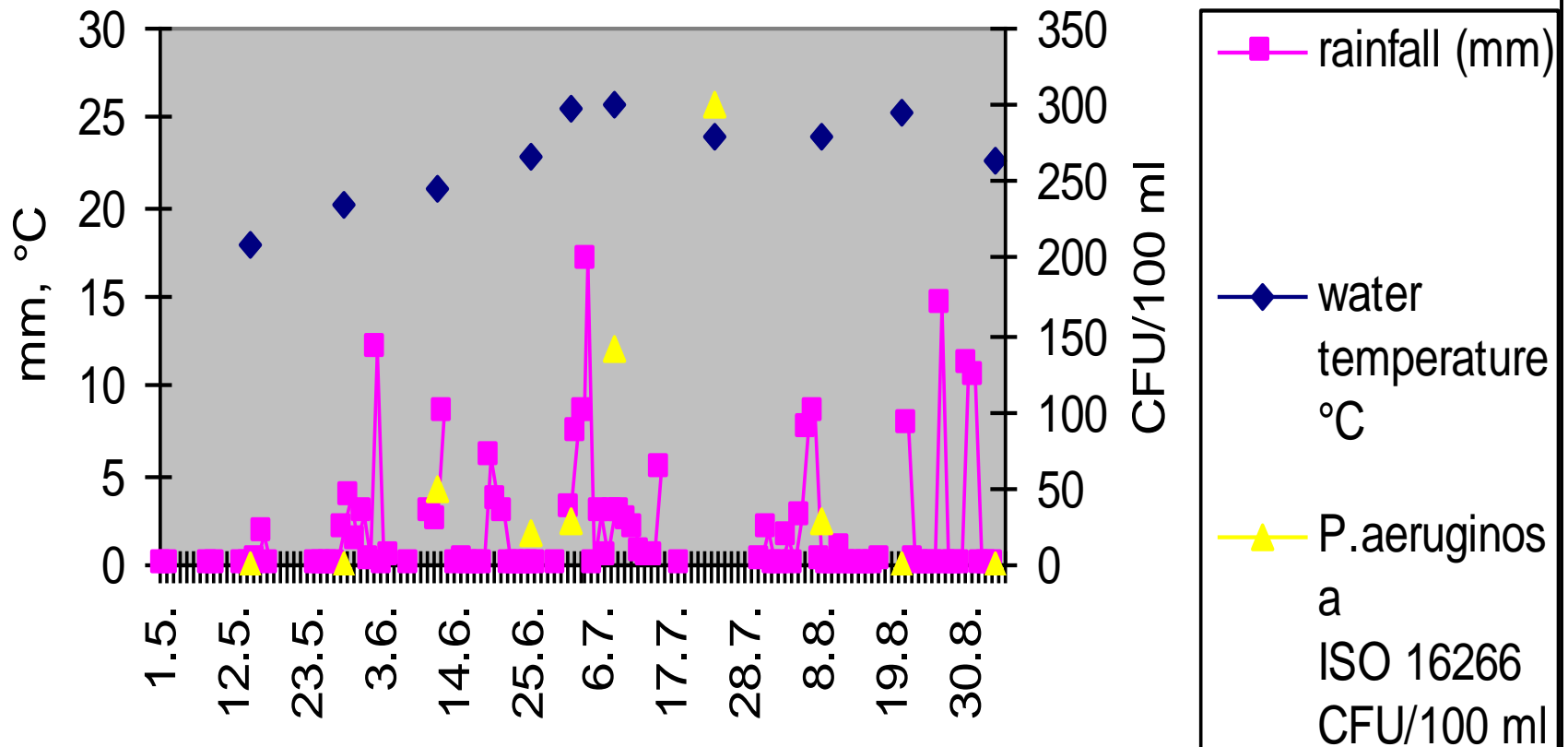
P. aeruginosa & rainfall, water temperature



Conclusion: peak numbers of *P. aeruginosa* correlate with neither water/air temperature extremes nor higher rainfall

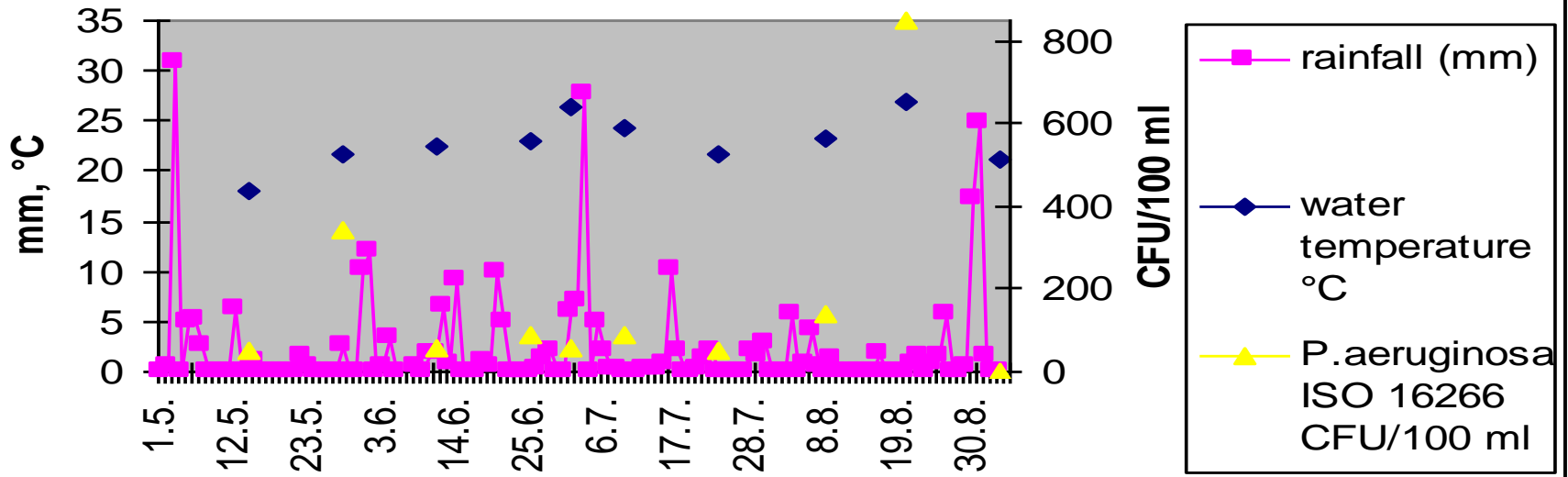
Large dam Orлік-Radava in 2012

P. aeruginosa & rainfall, water temperature



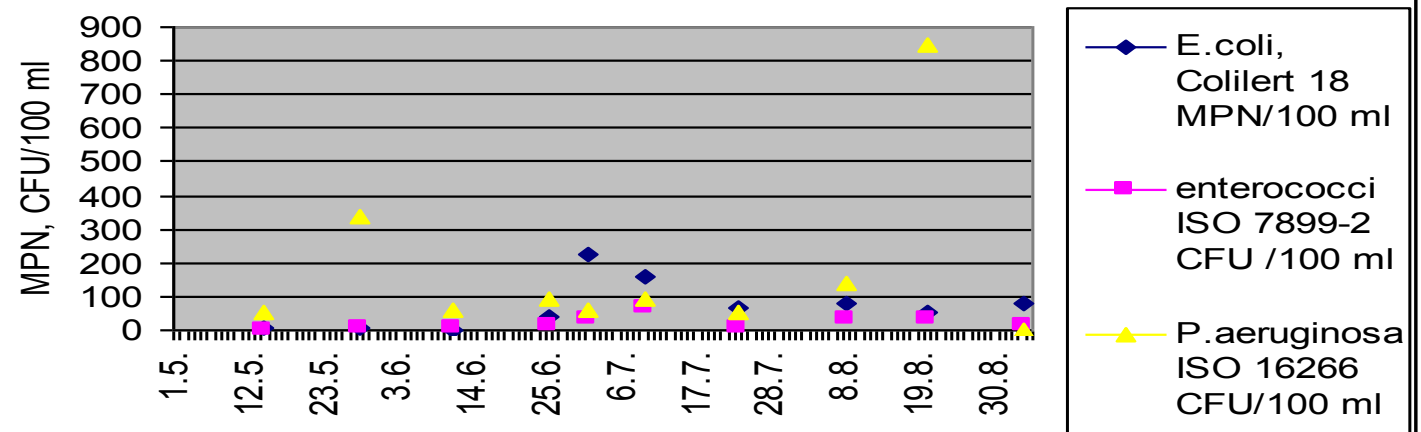
Šeberák pond in 2012

P. aeruginosa & rainfall, water temperature



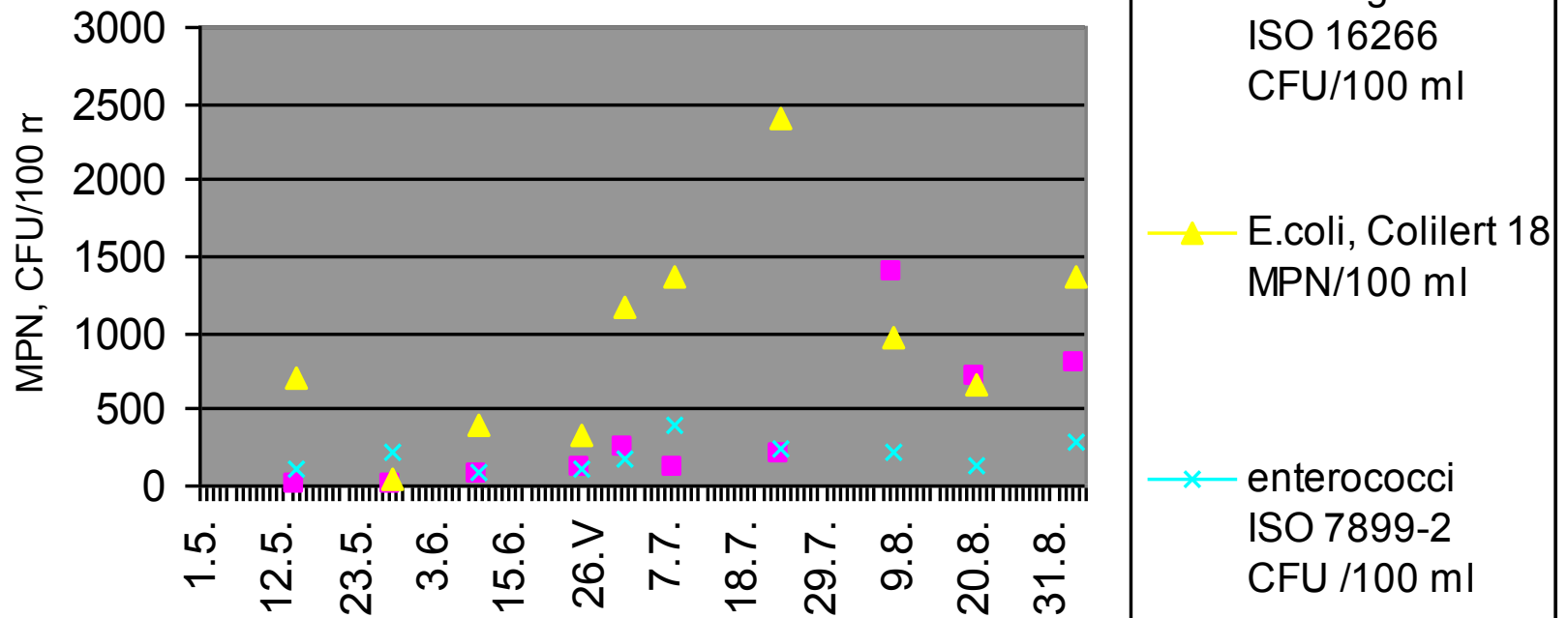
Šeberák pond in 2012

P. aeruginosa & *E. coli*, enterococci



River Otava - Vojníkov in 2012

P. aeruginosa & *E. coli*, enterococci

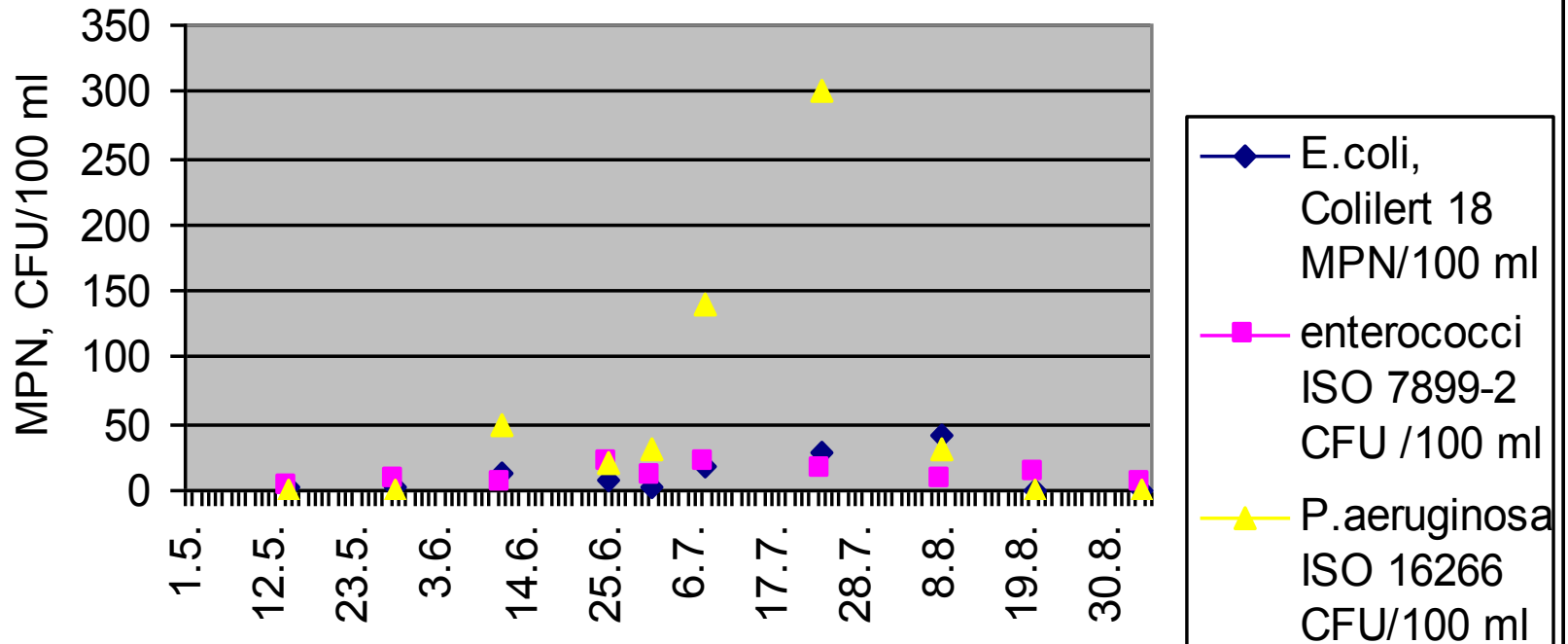


P. aeruginosa numbers ranged in hundreds of CFU / 100 ml

P. aeruginosa doesn't correlate with *E. coli* and enterococci

Large dam Orлік-Radava in 2012

P. aeruginosa & *E. coli*, enterococci



P. aeruginosa numbers ranged in tens of CFU / 100 ml

P. aeruginosa doesn't correlate with *E. coli* a enterococci

Korelace s fekálními indikátory (E.coli, intestinální enterokoky)

- **E. coli** – indikátor fekální kontaminace
původ - primárně střevo lidí, hospodářských a divokých zvířat, ptáků
- sekundárně – splašky, voda a půda fekálně kontaminovaná,
potraviny, krmiva, aj.
- **Intestinální enterokoky** – fekální indikátor
původ – ve střevě lidí, hospodářských a divokých zvířat, ptáků, hmyzu
ale i rostlin, rozkládající se rostlinné hmoty,
nefekální původ – E. casseliflavus, E. malodoratus, E. solitarius, E.
mundtii,
- **P. aeruginosa** – všeobecně v prostředí (voda, půda, ovzduší), splašky, normální
mikroflora lidí, hosp. i divoká zvířata, hlodavci, práci, hmyz, zeměděl. plodiny,
vegetace, potraviny, prach, odpady, kontaminované předměty,

Fekální druhy rodu *Enterococcus* / *Streptococcus* – výskyt ve fekáliích v %

	člověk	splašky	hovězí	vepř	drůbež	kůň	ovce	hlodavci	pes	racek
<i>E. faecalis</i>	37	52	-	6	19	3	-	-		70
<i>E. faecium</i>	44	34	25	40	69	68	25	80		10
<i>E. durans</i> + <i>hirae</i>	4	10	-	4	2	14	50	20		20
<i>E. cecorum</i> / <i>columbie</i>	-	-	+	+	+					
<i>E. avium</i>	+	+		+	+				+	
<i>E.</i> <i>gallinarum</i>					+					
<i>S. bovis</i>	12	3	71	42	2	14	17	-		-

The correlation between *P. aeruginosa* and faecal indicators
(*E. coli*, intestinal enterococci **is very poor**)

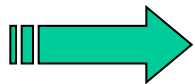
P.aeruginosa <i>ktj/100 ml -</i> <i>přepočet^x</i> <i>CN agar</i>	ENT SB, Merck <i>ktj/100 ml</i>	ECOLI Rapid EC2 Biorad		ENT SB, Merck <i>ktj/100 ml</i>	ECOLI Rapid EC2 Biorad
Pearson	0,262369	0,490453	Pearson	0,924572	

ČSN EN ISO 16266

- Metodologické problémy

Koncepce metody :

- membránová filtrace / inokulace malých objemů (1 ml)
- selektivně - diagnostická půda (CN agar)
- konfirmační testy (fluorescence + acet amidový test)



falešně pozitivní výsledky !!!!!!!

Falešně pozitivní výsledky:

P. aeruginosa kmeny, potvrzené dle ČSN EN ISO 16266
(kritéria = fluorescence + acetamidový test)

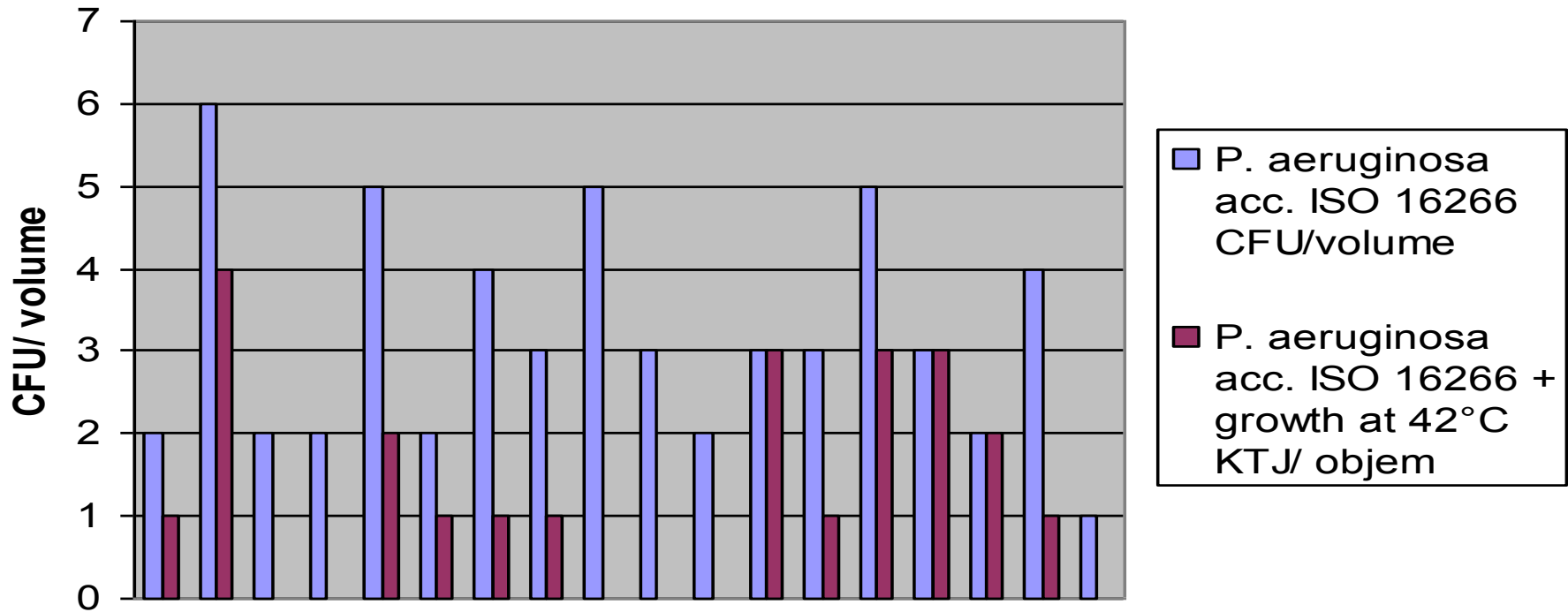
testovány navíc na růst při 42 °C, což je významná charakteristika
P. aeruginosa

růst při 42 °C vykazalo jen 40 % kmenů, tj. cca 60 % falešně
pozitivních výsledků

(jednalo se o jiné druhy než *P. aeruginosa* - *P. putida*, *P. fluorescens* a jiné nefermentující oxidase pozitivní bakterie)

němečtí autoři – *Heinemayer, Luden, 2009* zjistily u přírodních
bazénů cca 71 % falešně pozitivních výsledků (růst při 42 °C)

Numbers of *Pseudomonas aeruginosa* acc. ISO 16266 and after extended confirmation (+ growth at 42°C)- all are only non-pyocyanin colonies



osamocené modré sloupce značí, že žádné kolonie nerostly při 42 °C (růst indikují hnědé sloupce)

léto 2012 – z počtu 67 kolonií jen 29 rostlo při 42 °C, i.e. **43,3 %**

léto 2013 – z počtu 121 kolonií jen 47 growth at 42 °C, i.e. **38,8 %**

Závěry

- Vrcholy počtů *P. aeruginosa* zřídka korelují s teplotními vrcholy vody co by markery kontaminace vody od koupajících se i s vrcholy srážek co by markery kontaminace vody z prostředí
- korelace *P. aeruginosa* a fekálních indikátorů (*E. coli*, intestinální enterokoky) byla velmi nízká ($r = 0,4905$ a $0,2624$)
- počty *P. aeruginosa* (kromě jejich vrcholů) se pohybují ve stovkách KTJ/100 ml pro řeky a v desítkách KTJ/100 ml pro nádrže v létě 2011-2013
- onemocnění, prokázané z koupacích vod bylo zaznamenáno i při velmi nízkých počtech řádově jednotek až desítek KTJ/100 ml, jindy jsou to stovky KTJ/100 ml; naopak nebylo prokázano při počtech stovek i > 1000 KTJ/100 ml
- norma ČSN EN ISO 16266 není vhodná pro stanovení *P. aeruginosa* v povrchových / koupacích vodách z důvodu nedostatečné selektivity (lze tak analyzovat jen malé objemy vody (1 ml výjimečně 10 ml) kvůli početné doprovodné mikroflóře)
- konfirmované kolonie dle ČSN EN ISO 16266 vykazují vysoký počet falešně pozitivních kolonií, cca 60 – 70 % (stanovují se i jiné pseudomonády než *P. aeruginosa*, např. *P. putida*, *P. fluorescens* a jiné nefermentující oxidázo- pozitivní druhy)