

Dana Baudišová

Doporučené metody ke stanovení *E. coli* a intestinálních enterokoků v povrchových vodách ke koupání v České republice

Úvod



Technologická agentura
České republiky

V letech 2011-2013 byl řešen projekt Technologické agentury České republiky TA 01020675 s názvem

„Nové metodické přístupy pro kontrolu a hodnocení povrchových vod ke koupání“

Cílem projektu byla verifikace ukazatelů hodnocení kvality povrchových vod ke koupání, vyřešení kritických bodů metodik stanovení mikrobiologických a biologických ukazatelů a zhodnocení výskytu patogenních organismů.

Hlavní výstupy projektu

- Baudišová D., Pumann P., Šašek J.: Mikrobiologické rozbory povrchových vod ke koupání. Technické doporučení, Sweco – Hydroprojekt. 2013.
- ČSN 75 7717 Kvalita vod - Stanovení planktonních sinic (2013).
- Pumann P., Baudišová D., Kožíšek F., Šašek J., Myšáková M.: Metodický návod na vzorkování, terénní a laboratorní vyšetřování a hodnocení jakosti vody v přírodních koupalištích a povrchových vodách ke koupání. Certifikovaná metodika Ministerstva Zdravotnictví ČR. 2013.
- Pumann P., Duras J. (2013). Atlas makroskopických jevů spojených s výskytem vodních květů sinic a dalších organismů v přírodních koupacích vodách. Státní zdravotní ústav.

Mikrobiologické rozborý povrchových vod ke koupání

- Technické doporučení vzniklo na základě našeho výzkumu na celkem 7 více mikrobiálně kontaminovaných pilotních profilech a dále na základě spolupráce s hydroanalytickými laboratořemi, provádějícími analýzy koupacích vod (dotazníkové šetření, mimořádný okružní rozbor apod.)
- Technické doporučení vydal Sweco- Hydroprojekt a.s.
- Tam je i k dispozici na objednání (cena do 100 Kč)
- Prošlo důkladným připomínkovým řízením
- Kromě metodik stanovení indikátorových mikroorganismů jsou tam shrnuty metody stanovení významných patogenních mikroorganismů
- Výsledky byly použity do novely Vyhlášky č. 238/2011 Sb.



Vyhláška č. 238/2011 Sb.



V současné době je zpracován návrh novely, ten prošel připomínkovým řízením a byl předán Legislativní radě vlády České republiky. Účinnost této vyhlášky se očekává v červnu 2014.

Změny v novele vyhlášky, týkající se přímo mikrobiologických ukazatelů jsou:

- Jako referenční metoda je přidán test Colilert Quanti-Tray (IDEXX)
- Je sjednocen název ukazatele intestinální enterokoky
- Nejsou uvedena procenta povolených odchylek při testu ekvivalence referenčních metod (bude řešeno přímo v revizi normy - pro environmentální vzorky bude povolena vyšší odchylka)

Escherichia coli

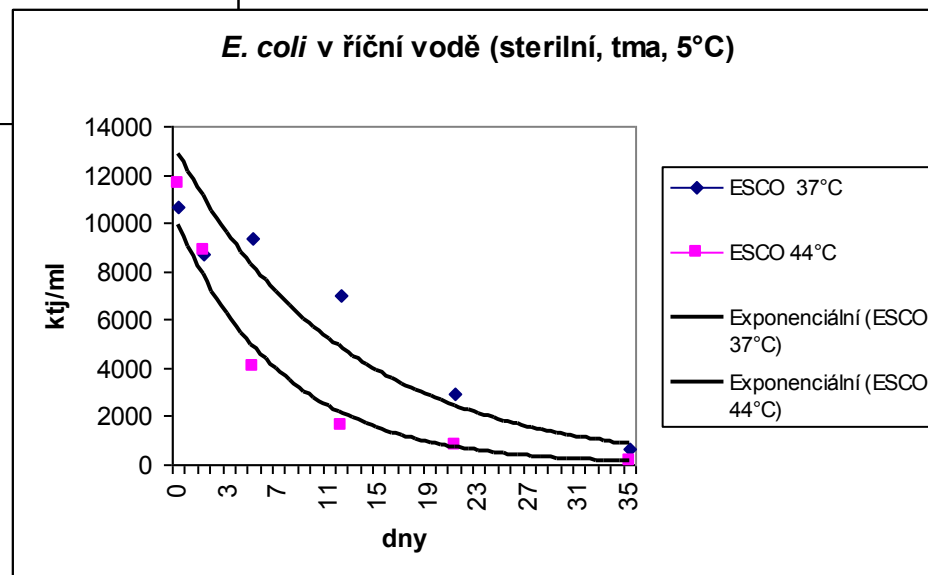
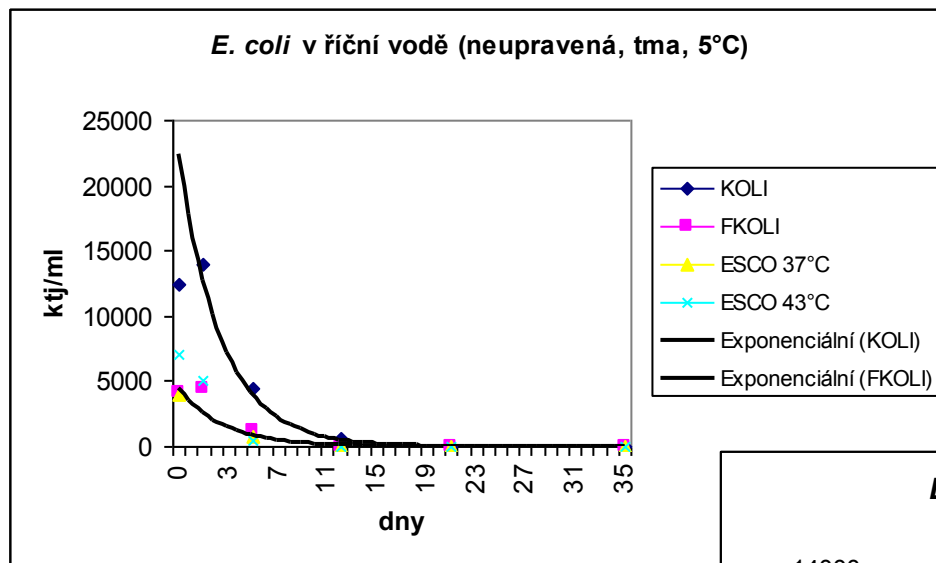
gramnegativní tyčinka o velikosti 1 μm z čeledi *Enterobacteriaceae*, fakultativně anaerobní, cytochromoxidáza negativní, fermentuje laktózu a roste při 44 °C. Z dalších významných biochemických vlastností je nejdůležitější aktivita enzymu β -D-glukuronidázy a pozitivní indol test.

E. coli žije jako komensál ve střevním traktu člověka a teplokrevných živočichů

ve vodě se nerozmnožuje, pouze hyne (alochtonní mikroorganismus, ubývá principem „samočištění“, z prvních diagnostických znaků se ztrácí termotolerance.

JE NEJVÝZNAMNĚJŠÍM INDIKÁTOREM FEKÁLNÍHO ZNEČIŠTĚNÍ

Přežívání *E. coli* v říční vodě

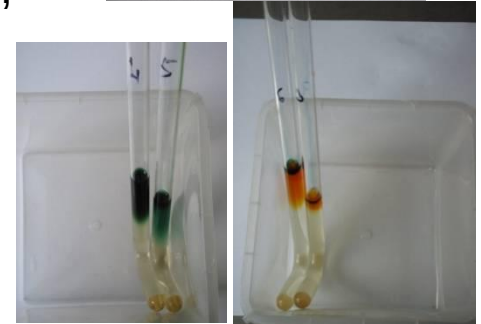
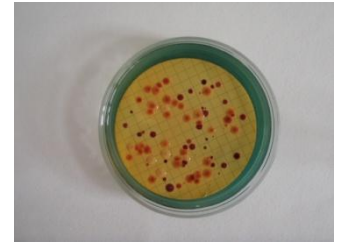


Metody stanovení *E. coli* v koupacích vodách

- **ČSN EN ISO 9308-1** – tergitolové médium, přeočkování laktóza pozitivních kolonií, OXI test, indol test, případně GLR test, **dnes v revizi**, přechod na chromogenní média
- **ISO 9308-2** (Colilert Quanti Tray), bude EN následně ČSN EN (ještě letos?) – komerční metoda
- **ČSN EN ISO 9308-3** - mikrotitrační destičky, i komerčně dodávané

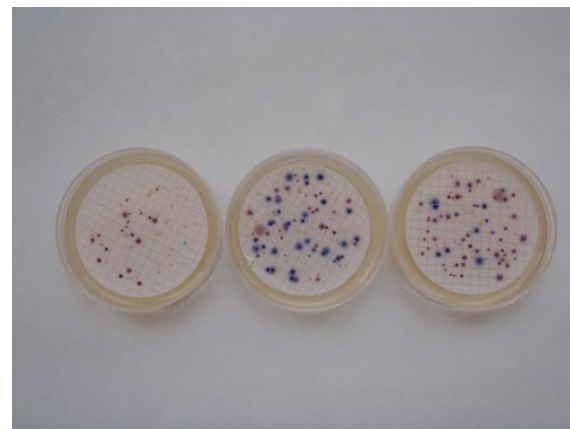
Stanovení *E. coli* dle ČSN EN ISO 9308-1

- Metoda je založena na membránové filtraci vzorků a kultivaci na selektivně diagnostickém médiu „laktózový TTC agar s tergitem“. Kmeny, které fermentují laktózu (mezi něž patří i *E. coli*), se přeočkují na neselektivní médium a dále se potvrzují indol testem při zvýšené teplotě 42 °C, popřípadě testem na β -D-glukuronidázu (nepovinné).
- Tuto metodu používá (uvedlo) 53 % laboratoří
- Problémy jsou s doprovodnou mikroflórou a s přeočkováním kolonií. Není dostatečně specifikováno použití GLR testu.
- V tuto chvíli se reviduje, použití chromogenního agaru CCM situaci s doprovodnou mikroflórou spíše zhorší (nepředpokládá se pro povrchové vody), nicméně *E. coli* je tam relativně dobře odečitatelná
- Rapid *E. coli* agar získal AFNOR validaci jako alternativní médium. Zkušenost s tímto médiem uvedly 2 laboratoře.



Chromogenní médium CCA

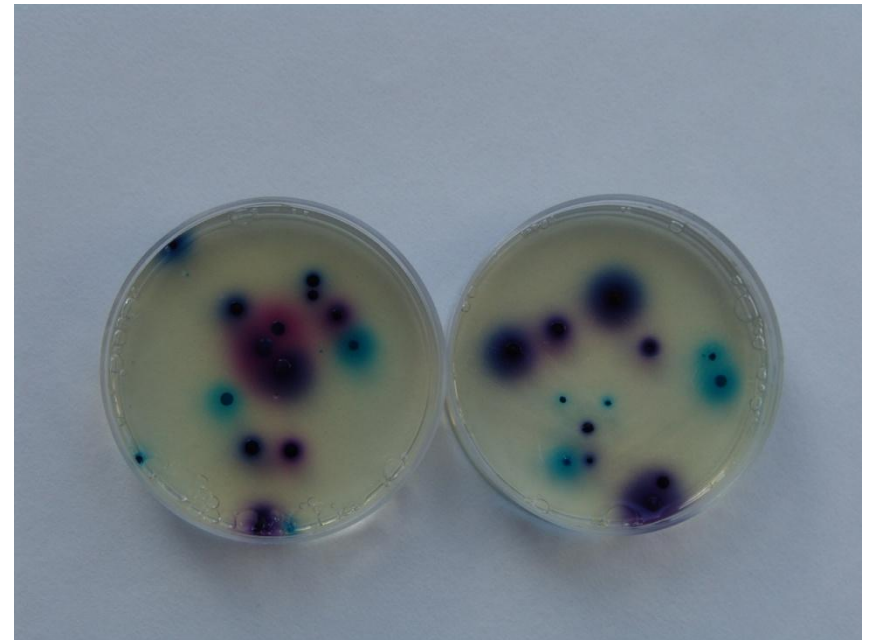
- Je založeno na přímém průkazu enzymatických aktivit β -D-galaktosidázy a β -D-glukuronidázy s využitím chromogenních substrátů a *E. coli* se odečítá ihned po kultivaci bez dalších konfirmačních testů.
- Není vhodná pro stanovení *E. coli* v povrchových vodách, protože dochází k velkému rozvoji doprovodné mikroflóry, stejně jako na laktóзовém TTC agaru s tergitolem.
- Pokud bude dokončena a vydána revize normy EN ISO 9308-1, situace se navíc zkomplikuje legislativně, neboť v předmětu návrhu normy je uvedeno, že norma není vhodná pro stanovení *E. coli* v povrchových vodách, a tím se vlastně norma EN ISO 9308-1 dostane do rozporu se směrnicí 2006/7/ES, která na ni odkazuje jako na referenční metodu.



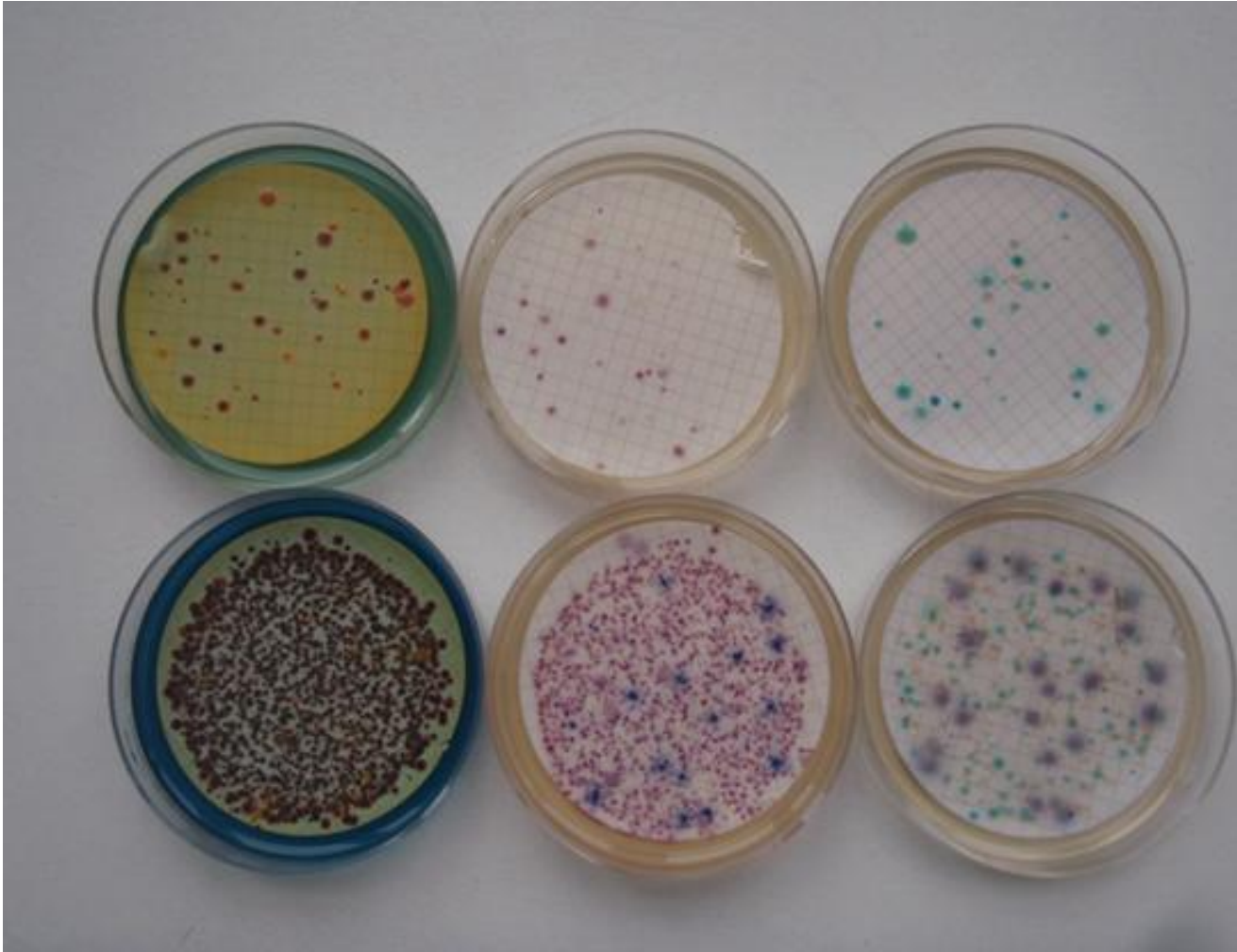
Chromogenní médium Rapid 2

E. coli

- Ke stanovení *E. coli* by bylo možno využít také médium Rapid 2 *E. coli* agar (fy. Biorad) pokud by se prokázala jako vhodná pro stanovení *E. coli* v povrchových vodách a pokud by byla prokázána ekvivalence s referenční metodou.
- Médium získalo francouzskou validaci AFNOR jako alternativu k laktózovému TTC agaru s tergitolem pro dezinfikovanou i nedezinfikovanou pitnou vodu (AFNOR, 2011)



E. coli v koupacích vodách na různých médiích

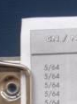


Výskyt *E. coli* mezi doprovodnou mikroflórou

	<i>E. coli</i>	Chromocult Coliformen agar	Rapid 2 <i>E. coli</i> agar	Laktózový TTC agar s Tergitolem 7
Vodní toky	cílové kolonie KTJ/100 ml aritmetický průměr	643	806	1515
	% cílové kolonie aritmetický průměr	5	12	3
	% cílové kolonie medián	3	10	3
	% vzorků s ≥ 10 % cílových kolonií	13	51	2
Rybník a VN	cílové kolonie KTJ/100 ml aritmetický průměr	84	130	389
	% cílové kolonie aritmetický průměr	1	3	4
	% cílové kolonie medián	<1%	1	1
	% vzorků s ≥ 10 % cílových kolonií	0	3	7

ČSN EN ISO 9308-3

-



4411 1/2 1/2 1/2	4411 1/2 1/2 1/2	4411 1/2 1/2 1/2	4411 1/2 1/2 1/2
5/64	6/32	77	32
5/64	7/32	93	42
5/64	3/32	108	207
5/64	4/32	124	62
5/64	4/32	140	72
5/64	4/32	155	83
5/64	4/32	171	94
5/64	5/32	94	42
5/64	1/2	109	52
5/64	7/32	125	62
5/64	3/8	141	73
5/64	4/32	156	84
5/64	5/32	172	94
5/64	4/32	188	106
7/64	0/32	110	52
7/64	1/32	126	63
7/64	3/32	142	73
7/64	3/32	158	84
7/64	4/32	175	95
7/64	5/32	191	107
7/64	4/32	207	118
8/64	0/32	127	63
8/64	1/32	143	74
8/64	3/32	159	85
8/64	3/32	175	96
8/64	4/32	191	108
8/64	5/32	207	119
8/64	4/32	223	131

- Platí norma ISO 9308-2
- Přestože se jedná o komerční metodu, stanovení *E. coli* je dostatečně citlivé i specifické
- 29 % laboratoří má s touto metodou zkušenosti.

Form 1042-E		DEEE Quantis Tray© 2020 BPH Table (mm)	
Part	Part	Part	Part
1	1	1	1
2	2	2	2
3	3	3	3
4	4	4	4
5	5	5	5
6	6	6	6
7	7	7	7
8	8	8	8
9	9	9	9
10	10	10	10
11	11	11	11
12	12	12	12
13	13	13	13
14	14	14	14
15	15	15	15
16	16	16	16
17	17	17	17
18	18	18	18
19	19	19	19
20	20	20	20
21	21	21	21
22	22	22	22
23	23	23	23
24	24	24	24
25	25	25	25
26	26	26	26
27	27	27	27
28	28	28	28
29	29	29	29
30	30	30	30
31	31	31	31
32	32	32	32
33	33	33	33
34	34	34	34
35	35	35	35
36	36	36	36
37	37	37	37
38	38	38	38
39	39	39	39
40	40	40	40
41	41	41	41
42	42	42	42
43	43	43	43
44	44	44	44
45	45	45	45
46	46	46	46
47	47	47	47
48	48	48	48
49	49	49	49
50	50	50	50
51	51	51	51
52	52	52	52
53	53	53	53
54	54	54	54
55	55	55	55
56	56	56	56
57	57	57	57
58	58	58	58
59	59	59	59
60	60	60	60
61	61	61	61
62	62	62	62
63	63	63	63
64	64	64	64
65	65	65	65
66	66	66	66
67	67	67	67
68	68	68	68
69	69	69	69
70	70	70	70
71	71	71	71
72	72	72	72
73	73	73	73
74	74	74	74
75	75	75	75
76	76	76	76
77	77	77	77
78	78	78	78
79	79	79	79
80	80	80	80
81	81	81	81
82	82	82	82
83	83	83	83
84	84	84	84
85	85	85	85
86	86	86	86
87	87	87	87
88	88	88	88
89	89	89	89
90	90	90	90
91	91	91	91
92	92	92	92
93	93	93	93
94	94	94	94
95	95	95	95
96	96	96	96
97	97	97	97
98	98	98	98
99	99	99	99
100	100	100	100



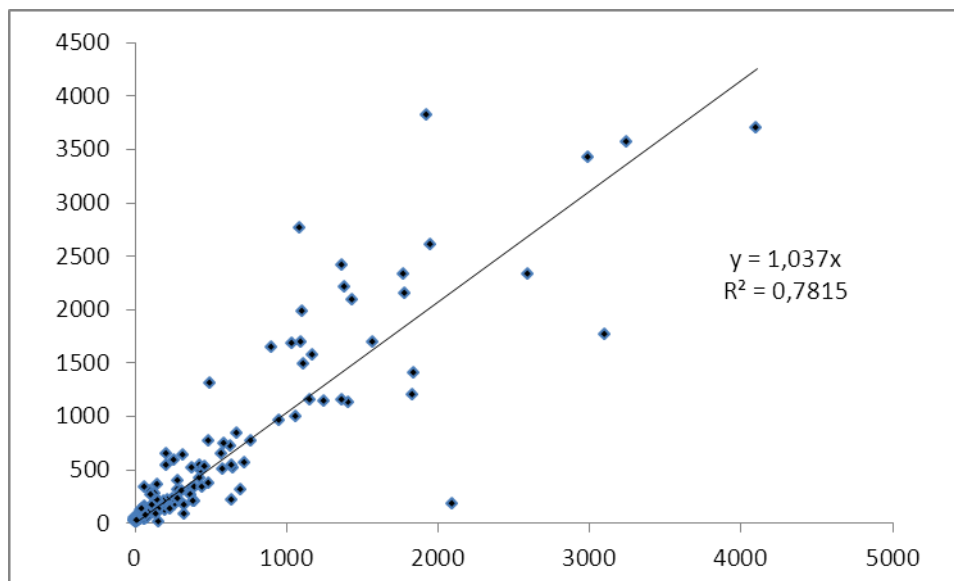
Testy ekvivalence metod MPN

Při testování vzorků koupacích vod těmito dvěma metodami (2 laboratoře) a hodnocení výsledků podle normy ČSN EN ISO 17994 byla při diferenci

2L = 20 % nalezena shoda metod:

($x_L = -14,95$, a $x_H = 6,5$; pro odchylku 20 % platí, že $-20 \% \leq x_L \leq 0$ a $0 \leq x_H \leq +20 \%$).

Pro porovnání byl použit soubor 115 paralelních analýz (byly vyřazeny hodnoty < 15 s ohledem na mez detekce u ČSN EN ISO 9308-3).



Závěr

- Metoda dle ISO 9308-2 (Colilert Quanti-Tray) byla zhodnocena jako nejvhodnější pro stanovení *E. coli* v koupacích vodách (mez detekce, specifčnost, citlivost)
- Byla prokázána její ekvivalence na úrovni 20 % s referenční metodou dle ČSN EN ISO 9308-3
- Je zařazena v novele vyhlášky jako alternativní metoda pro stanovení *E. coli* v koupacích vodách

Výsledky stanovení *E. coli* různými metodami (průměr výsledků z koupací sezóny, 2011, n=12)

	Otava-Vojnikov	Vltava-Orlik, Radava	Berounka - Cernosice	Seberak
EN ISO 9308-1 – TTC	1173	8,2	897	38
EN ISO 9308-1 CCM	779	3,9	462	22,8
Rapid 2 E. coli agar	837	4	607	17
Colilert Quanti Tray	913	7,6	734	32
EN ISO 9308-3	951,2	méně 15	797	12,9 = méně 15

Intestinální enterokoky

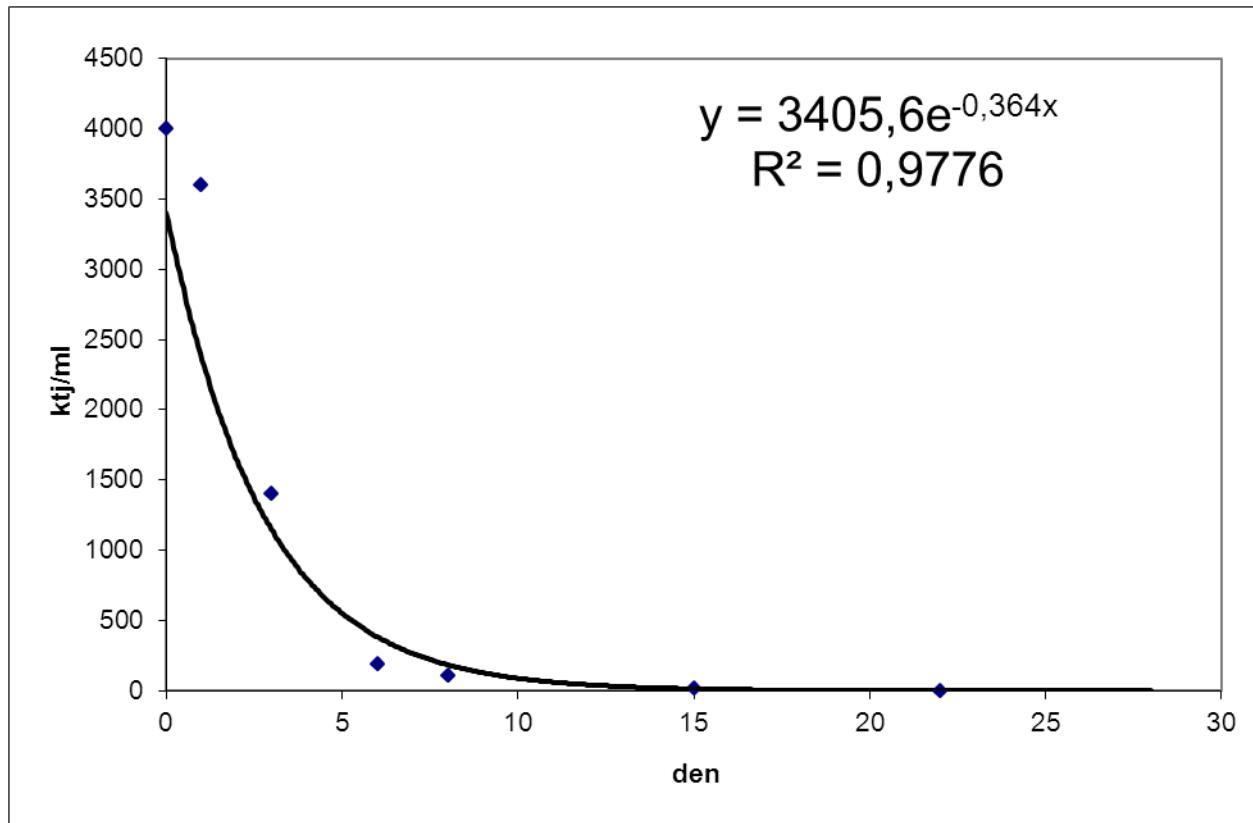
Grampozitivní koky, většinou uspořádané do řetízků, často tvořící diplokoky, s antigenovou skupinou D a negativní katalázou. Mají schopnost množit se v rozmezí teploty 10 - 45 °C, rostou i při poměrně vysokých koncentracích solí (6,5% chloridu sodného) a při hodnotě pH 9,1. Tolerují až 40 % žluči v prostředí. Podle současného taxonomického systému patří do rodů *Enterococcus* (rod zahrnuje více než 30 druhů) a *Streptococcus*.

Vyskytují se ve střevě teplokrevných živočichů a člověka, některé druhy se mnohou v přírodě i pomnožovat.

Jsou dalším indikátorem fekálního znečištění, při významně vyšším počtu intestinálních enterokoků než *E. coli* lze usuzovat na fekální znečištění živočišného původu

Přežívání enterokoků v povrchových vodách

(*E. faecalis*, Lhotský potok) - nebyly nalezeny významné rozdíly mezi druhy, ale ovlivněno oživením toků.



Metody stanovení enterokoků v koupacích vodách

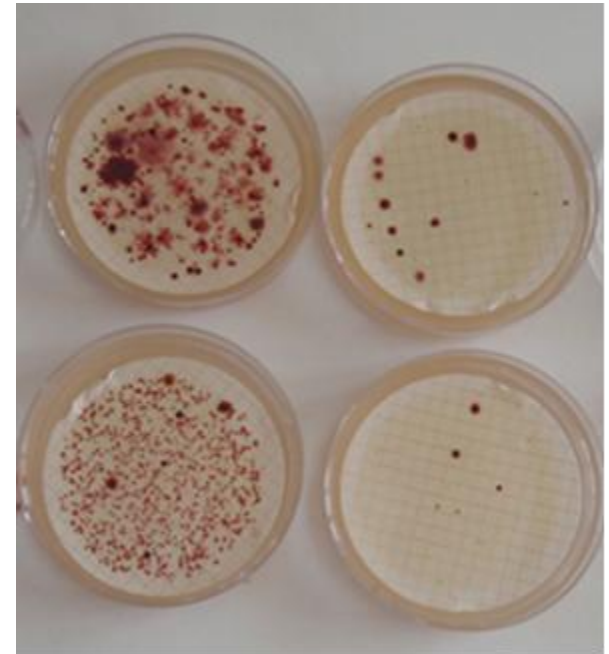
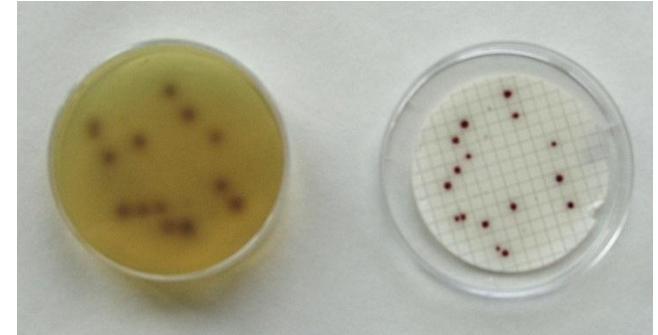
ČSN EN ISO 7899-1 = miniaturizovaná metoda na mikrotitrační destičky, aktivita beta-D-glukosidázy v prostředí nalidixové kyseliny

ČSN EN ISO 7899-2 = kultivace na Slanetz – Bartley agaru, konfirmace na žluč eskulinovém agaru

Enterolert E Quanti-Tray, alternativa Colilertu, ale není normovaná, ani doporučená

Stanovení enterokoků dle ČSN EN ISO 7899-2

- Stanovují se membránovou filtrací na selektivně diagnostickém médiu s azidem sodným a TTC (SB médium) jako presumptivní intestinální enterokoky a potvrzují se na žluč-aeskulin-azidovém agaru.
- Všichni používají, ale různá média (Himedia 38 %, Oxoid 9,5 %, Trios 14 %, Merck 28 %, Biorad 9,5 %)
- Různé výsledky na různých médiích
Slanetz- Bartley
- Absence katalázového testu v normě
- Výsledky při OR velmi dobré



Procentuální zastoupení potvrzených intestinálních enterokoků na SB médiu různé provenience a podíl kataláza pozitivních kmenů

	Počet vzorků	Konfirmované enterokoky (%)	Kataláza pozitivní kmeny maximum (%)	Kataláza pozitivní kmeny průměr (%)	% vzorků s kataláz a pozitivní mi kmeny
SB Himedia	101	60	60	4	13
SB Merck	65	72	0	0	0
SB Biorad	36	89	0	0	0
SB Trios	29	91	0	0	0

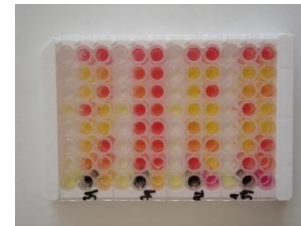
Katalázový test

Provedení katalázového testu: Kolonie přeočkované na neselektivní agar se zakapou čerstvě připraveným 10% peroxidem vodíku. Katalázová reakce se projeví šuměním, tj. tvorbou bublinek. **Kolonie, které nešumí, jsou intestinální enterokoky.**

V případě testování koupacích vod je třeba ověřovat selektivitu média, a pokud se vyskytuje vyšší počet presumptivních enterokoků, je vhodné ověřit potvrzované kolonie ještě katalázovým testem. Tento test byl součástí staršího vydání normy ČSN ISO 7899-2 pro stanovení fekálních streptokoků, platné do roku 2001. Pokud je potvrzovaných kolonií méně než 70 %, doporučuje se katalázový test provádět vždy. Vzhledem k požadavku vyhlášky č. 238/2011 Sb. na předání výsledku do tří dnů od odběru vzorků je však nutno vzorky zpracovávat v den odběru.

Druhové složení enterokoků

- Vzhledem k tomu, že se koupací vody v naprosté většině případů nenacházejí pod přímým zdrojem fekální kontaminace, odpovídá tomu i druhové složení enterokoků
- Kmeny byly testovány mikrotestem Streptotest 32 (Erba Lachema) profily více i méně fekálně kontaminované)
- Bylo zjištěno, že v koupacích vodách, a to i ve více fekálně znečištěných profilech, se mezi potvrzovanými enterokoky vyskytovalo relativně málo kmenů druhů *Enterococcus faecalis* a *E. faecium*, ale největší podíl tvořil druh *E. casseliflavus*.
- Právě první dva uvedené druhy představují indikátory fekální humánní, popřípadě i animální kontaminace, zatímco *E. casseliflavus* reprezentuje nefekální druhy z rostlinného materiálu.



ČSN EN ISO 7899-1

- Metoda MPN založena na aktivitě enzymu β -D-glukosidázy v prostředí kyseliny nalidixové; miniaturizovaná metoda na mikrotitračních destičkách (jako ČSN EN ISO 9308-3 pro *E. coli*)
- Vysoká mez detekce = 15 ktj/100 ml, sice nízká hodnota, ale nelze statisticky zpracovávat
- I přes určitou propagaci se u nás neujalo, žádná laboratoř nepoužívá.

Enterolert Quanti-tray

- Různé typy Enterolertu, Pro koupací vody je deklarován jako nejvhodnější typ Enterolert E, zatímco chromogenní Enterolert DW je určen především pro pitnou vodu
- Opět založen na aktivitě enzymu β -D-glukosidázy v selektivním prostředí
- Dosud ne zcela uspokojivé výsledky, ani není normované
- Podezřelé (falešně pozitivní??) výsledky v určitém období vegetační sezóny u stojatých vod. Tato falešná pozitivita může být způsobena určitou aktivitou β -D-glukosidázy, kterou produkují i některé řasy. Zřejmě nedochází k dostatečné inhibici aktivity řas selektivním médiem.
- Žádná laboratoř tento test dosud nepoužívá

Enterolert E Quanti-Tray



Záchyt enterokoků v jednotlivých profilech a koupacích sezonách (průměr)

	SB HiMedia	SB Merck	SB Biorad	SB Trios	ČSN EN ISO 7899-1	Enterolert E
Vojníkov 2011	548	—	201	—	268	329
Vojníkov 2012	543	424	—	290	-	243
Radava 2011	12	—	12	-	27	16
Radava 2012	24	19	—	22	-	12
Černošice 2011	205	—	154	—	230	145
Černošice 2012	198	138	—	109	-	64
Černošice 2013	346	299	-	-	398	229
Šeberák 2011	177	—	128	—	242	162
Šeberák 2012	124	42	-	27	-	40
Šeberák 2013	136	128	-	-	173	150

Testy ekvivalence médií Slanetz-Bartley

- Byla testována rovnocennost výsledků stanovení intestinálních enterokoků získaných na médiích od různých výrobců, která odpovídají receptuře uvedené v ČSN EN ISO 7899-2.
- Důležité je připomenout, že se nejedná o jinou metodu stanovení, ale o použití jiných selektivně-diagnostických médií, vyhovujících příslušné receptuře dané normy.
- Srovnání výsledků vyšetření intestinálních enterokoků podle ČSN EN ISO 7899-2 na SB médiu od fy. Merck a fy. HiMedia ukazuje jednoznačnou odlišnost na úrovni zvoleného limitu 2L 10 % i 20 %. Aby metody nebyly hodnoceny jako odlišné, bylo by třeba zvolit limit až 95 %.
- Podobně vyšla i odlišnost metod, resp. médií SB agaru od fy. Merck a fy. Trios s výsledkem „odlišné“ při limitu 2L 10 % i 20 %. Neodlišné by byly až při zvoleném limitu 2L = 30 %.

Testy ekvivalence metod MPN dle ISO 17994

Pro soubor 95 paralelních analýz Enterolertem E a metodou mikrotitračních destiček podle 7899-1 (byly vyřazeny hodnoty <15 s ohledem na mez detekce u ČSN EN ISO 7899-1 a vzorky překračující horní rozsah stanovení Enterolertu E) **nebyla při diferenci $2L = 20\%$ nalezena shoda** (ekvivalence) metod ($x_L = -15,9$, a $x_H = 26,6$; požadavek normy ČSN ISO 17994 je $-20\% \leq x_L \leq 0$ a $0 \leq x_H \leq +20\%$).

Korelační koeficient R^2 byl 0,45 a směrnice regresní přímky $y = 0,76$.

Závěr

- Pro stanovení intestinálních enterokoků jsou vhodné obě referenční metody uváděné vyhláškou č. 238/2011 Sb., tedy ČSN EN ISO 7899-1 a ČSN EN ISO 7899-2.
- U metody podle ČSN EN ISO 7899-2 však byly zaznamenány značné rozdíly při použití média podle Slanetze a Bartleyové od různých výrobců.
- Vzhledem k těmto rozdílům je vhodné věnovat pozornost selektivitě používaného média podle Slanetze a Bartleyové. Doporučuje se provádět test na katalázu, i když tento test již není součástí normy, a to zejména v případech, kdy je zaznamenán vyšší poměr presumptivních a potvrzených enterokoků.

Hodnocení výsledků mikrobiologických analýz

Při hodnocení výsledků je nutné brát v potaz následující skutečnosti :

1. Výběr vhodných metod, včetně použití všech nutných konfirmačních testů
2. Nestabilitu vzorků a nemožnost opakovat stanovení
3. Vliv srážek
4. Vzájemné vztahy jednotlivých ukazatelů
5. Nejistoty výsledků

Nejistoty výsledků

- Nejistoty výsledků kvantitativních mikrobiologických rozborů se **pohybují okolo 40 %**, platí to však pouze v případě, že na vlastním detektoru (např. Petriho miska) je spočítáno minimálně 10 cílových (konfirmovaných) kolonií při maximálním počtu 100 kolonií.
- U některých metod (viz stanovení *E. coli* dle ČSN EN ISO 9308-1) mohou být nejistoty i vyšší.
- U statistických tabulek pro miniaturizované metody dle norem ČSN EN ISO 9308-3 a 7899-1 jsou uvedeny konfidenční meze pro jednotlivé hodnoty. Například při nižších hodnotách do 60 MPN/100 ml jsou výsledky ještě velmi nepřesné, např. 45 = 14 až 141, u vyšších hodnot se situace již zlepšuje např. 453 = 304 až 674. Podobné výsledky se dají čekat u systému Quanti-Tray®, kde se pracuje s velmi podobným množstvím podvzorků.



Technologická agentura
České republiky

VÚV
TGM

[http://www.vuv.cz/index.php?id=1114&L=0
&tx_odprojectinfo\[uid\]=13&cHash=fa4e49f
278](http://www.vuv.cz/index.php?id=1114&L=0&tx_odprojectinfo[uid]=13&cHash=fa4e49f278)

Děkuji za pozornost

95 let
1919-2014

VÝZKUMNÝ ÚSTAV
VODOHOSPODÁŘSKÝ
T.G. MASARYKA

Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v.v.i.

Podbabská 2582/30, 160 00 Praha 6 | +420 220 197 111 | info@vuv.cz, www.vuv.cz,

Pobočka Brno | Mojžírovo náměstí 16, 612 00 Brno-Královo Pole | +420 541 126 311 | info_bрно@vuv.cz,

Pobočka Ostrava | Macharova 5, 702 00 Ostrava | +420 595 134 800 | info_ostrava@vuv.cz