



**Pražské vodovody
a kanalizace**

Zavedení stanovení bakterií a virů metodou PCR v provozní vodohospodářské laboratoři

Autor: Veronika Tomi



Obsah

 **Důvody zavedení PCR**

 **Potřebné prostory a vybavení**

 **Zásady práce v laboratoři molekulární mikrobiologie**

 **Výsledky stanovení**



Zavedení metody qPCR v laboratoři PVK

Důvodem byla potřeba **rychlejší detekce mikrobiální kontaminace vody.**

Vydání Směrnice EP a Rady (EU) 2020/2184 o jakosti vody určené k lidské spotřebě dne 16. prosince 2020 a její transpozice do legislativy ČR nejpozději do **12. 1. 2023.**

Komplexní přístup k bezpečnosti vody založený na posouzení a řízení rizik, zahrnující celý zásobovací řetězec se zvláštním zaměřením na prioritní prostory.

Hodnoty ukazatelů mají být dodrženy v místě, kde voda vytéká z kohoutků a vztahuje se také na vodu určenou pro kontakt s lidským tělem.

Ze všech vodních patogenů způsobují v EU největší zdravotní zátěž bakterie rodu **Legionella**, které jsou přenášeny systémy dodávajícími teplou vodu a dostávají se do lidského organismu inhalací.

Cílem je posouzení rizik **domovních rozvodných systémů.** Jedná se zejména o kontrolu podmínek, které růst legionel podporují.



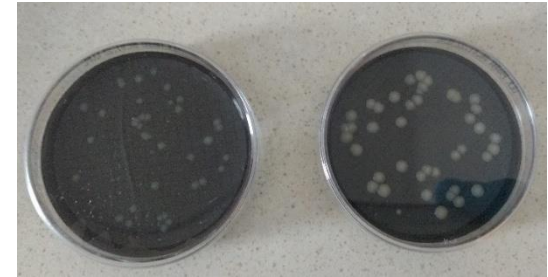


Metodika stanovení legionel

Směrnice EU stanovuje v příloze 1 (Minimální požadavky na hodnoty ukazatelů používané k posouzení jakosti vody určené k lidské spotřebě) **části D** (Ukazatele relevantní pro posouzení rizik domovních rozvodných systémů) **pro bakterie rodu *Legionella* hodnotu 1 000 KTJ/litr.**

Základní stanovení legionel se provádí metodou podle **ČSN EN ISO 11731.**

Výsledky za 10 dnů, pouze kultivovatelné mikroorganismy.

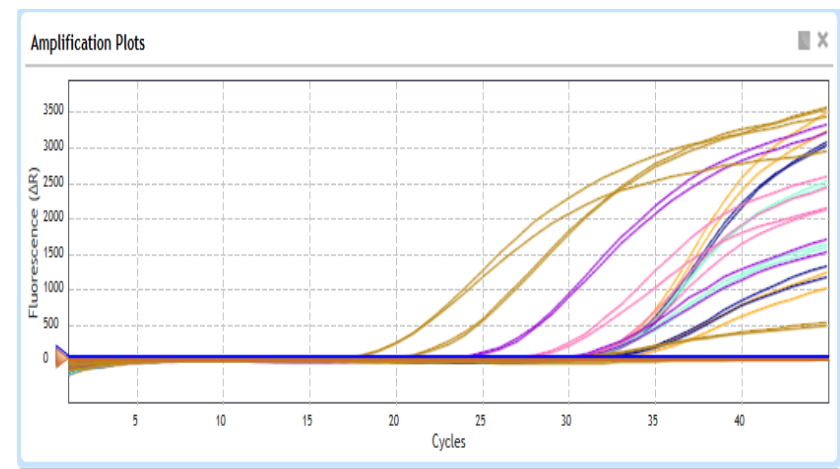


Pro účely monitorování a na doplnění kultivačních metod lze použít i jiné metody

nekultivační a molekulární metody, zejména kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci (qPCR).

Norma ISO/TS 12869, výsledky v GU/l.

Výsledky do 24 hodin, nerozlišuje živé × mrtvé mikroorganismy.





Potřebné prostory

PCR laboratoř má mít ideálně 3 oddělené místnosti pro

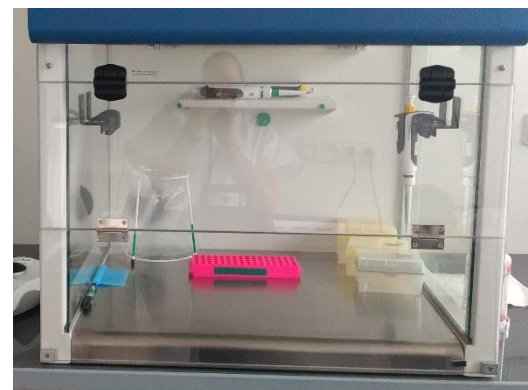
- přípravu vzorku



- přípravu master mixu



- pro amplifikaci a analýzu NA



Zajistit jednosměrný průchod laboratoří
a vlastní set označených pomůcek
pro jednotlivá stanoviště.



Schéma laboratoře





Pohled do laboratoře





Potřebné vybavení

- Real-Time termocykler
- Laminární/biohazard box třídy II, filtrační aparatura



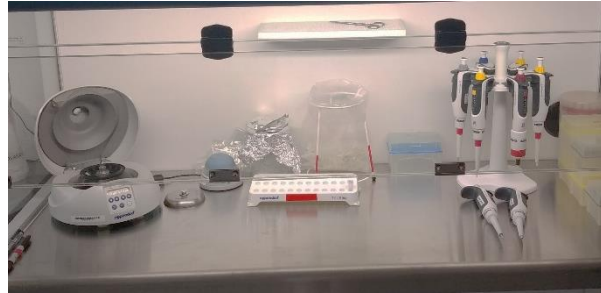
- (Chlazená) centrifuga pro izolaci NA, minicentrifuga





Potřebné vybavení

- PCR box pro přípravu mastermixu
- (Hluboko)mrazicí box, mrazničky, chladničky
- Fluorometr/UV-VIS spektrofotometr pro měření koncentrace NA
- Blokový termostat, inkubátor, vortexy, sady nastavitelných pipet,...





Zásady práce

Detekce nukleové kyseliny mikroorganismů ve vzorku vody pomocí PCR vyžaduje **dodržování zásad správné laboratorní praxe**. Jedná se zejména o

- zamezení kontaminace amplifikačním produktem
- zamezení kontaminace PCR izolovanou DNA/RNA
- efektivitu práce (ergonomii).

Před započítím práce i po jejím skončení se použije desinfekce, začíná se mastermixem, až poté se přidává vzorek, větší objemy se dělí do alikvót, reagensie a pomůcky mají pevně dané místo – nepřenáší se, použití jednorázového spotřebního materiálu – sterilní bez obsahu DNáz, RNáz a inhibitorů PCR (ihned po použití se likviduje), pravidelná kontrola pipet a údržba přístrojů.



Kontrola kvality

Je třeba zavést systém reakčních kontrol:

Kvantitativní standard slouží ke generování kalibrační křivky a umožňuje kvantitativní stanovení DNA/RNA ve vzorku.

Interní standard je součástí každé jednotlivé reakce a kontroluje rizika falešné negativity v důsledku inhibice reakce. Přidává se do amplifikační reakce.

Pozitivní izolační kontrola se přidává do sterilní vody před izolací a testuje celý detekční proces.

Negativní izolační kontrola kontroluje rizika falešné positivity v důsledku kontaminace procesu izolace NA a také v amplifikační reakci. Do procesu izolace DNA/RNA je namísto vzorku vložena sterilní voda; výsledek amplifikace musí být negativní.

Pozitivní kontrola je uměle připravený vzorek, který ověřuje správný průběh amplifikace. Přidává se do každé sady vzorků a musí generovat pozitivní signál o očekávané intenzitě.

Negativní kontrola kontroluje rizika falešné positivity v důsledku kontaminace PCR, reakční směsi, při přidávání vzorků. Sterilní voda bez přítomnosti NA se přidává do amplifikační reakce a provádí se minimálně 1× na analyzovanou sadu vzorků, musí být negativní.



Výsledky stanovení

Přehled tabulek s výsledky

1. Vzorky vod ke koupání – společná vzorkovnice
2. Vzorky vod ke koupání – vlastní vzorkovnice
3. Vzorky teplých vod – společná vzorkovnice
4. Vzorky teplých vod – vlastní vzorkovnice
5. Vzorky vod ke koupání a teplých vod – společná i vlastní vzorkovnice



Tabulka 1

Vzorky vod ke koupání – společná vzorkovnice

číslo vzorku	Datum odběru	Místo odběru	<i>Legionella</i> spp. kultivace (max. 10 KTJ/100ml)	<i>Legionella</i> spp. qPCR (GU/100 ml)	<i>Legionella pneumophila</i> qPCR (GU/100 ml)	Filtrovaný objem (ml)	Teplota (°C)	Chlor volný (mg/l)
2545	20.04.2021	Dětská léčebna, vana	0	4 400	—	332	33,7	0,06
3551	01.06.2021	plavecký bazén vstup. uprav. voda	0	< 300	< 1200	250	29,2	0,69
3553	01.06.2021	koupelový bazén vstup. uprav. voda	0	< 358	< 1430	210	35,7	0,04
3554	01.06.2021	koupelový bazén	0	< 278	0	270	36,5	0,02
3555	01.06.2021	koupelový bazén – vstup	0	4 400	1 900	330	35,4	0,32
3557	01.06.2021	bazén	0	< 215	0	350	27,0	0,21
4439	29.06.2021	plavecký bazén vstup. uprav. voda	0	4 600	0	250	28,7	0,81
4441	29.06.2021	koupelový bazén vstup. uprav. voda	0	< 150	0	250	34,7	0,68
4442	29.06.2021	koupelový bazén	0	< 150	0	250	35,3	0,55
4443	29.06.2021	koupel. baz. vstup. uprav. voda	0	3 800	0	250	34,2	0,68
Jiná voda – společná vzorkovnice								
3561	02.06.2021	slaná voda z akvária	0	1 700	0	300	24,8	
8175	24.11.2021	pitná voda, domov pro seniory	0	2 200	0	500	12,9	<0,05



Tabulka 2

Vzorky vod ke koupání – vlastní vzorkovnice

číslo vzorku	Datum odběru	Místo odběru	<i>Legionella</i> spp. kultivace (max. 10 KTJ/100ml)	<i>Legionella</i> spp. qPCR (GU/100 ml)	<i>Legionella pneumophila</i> qPCR (GU/100 ml)	Filtrovaný objem (ml)	Teplota (°C)	Chlor volný (mg/l)
3783	08.06.2021	Škola vstupní voda	0	330	0	500	28,8	0,58
3784	08.06.2021	SŠ, ZŠ a MŠ bazén	2	< 150	0	500	27,4	0,28
4915	20.07.2021	LDN – vana	0	< 150	0	500	36,0	0,59
5073	26.07.2021	plavecký bazén vstup. uprav. voda	0	9 700	< 600	500	28,9	0,69
5075	26.07.2021	koupelový bazén vstup. uprav. voda	0	820	< 600	500	35,9	0,70
5076	26.07.2021	koupelový bazén	0	350	< 600	500	36,4	0,26
5077	26.07.2021	koupel. baz. vstup. uprav. voda	0	450	0	500	35,0	0,40
5445	11.08.2021	voda ke koupání – bazén	0	< 150	< 600	500	56,3	0,16
5446	11.08.2021	voda ke koupání – bazén	0	13 000	25 000	500	56,1	0,12



Tabulka 3

Vzorky teplých vod – společná vzorkovnice

číslo vzorku	Datum odběru	Místo odběru	<i>Legionella</i> spp. kultivace (max. 100 KTJ/100ml)	<i>Legionella</i> spp. qPCR (GU/100 ml)	<i>Legionella pneumophila</i> qPCR (GU/100 ml)	Filtrovaný objem (ml)	Teplota (min. 55°C)	Chlor volný (max. 1 mg/l)
2546	20.04.2021	Autoservis	6 800	4 600	—	388		0,02
2547	20.04.2021	sprchy muži	0	7 800	< 1020	314		
2557	21.04.2021	kuchyňka 5Ka, TV z PV	3 100	4 100	1 800	250	45,5	0,07
2558	21.04.2021	kuchyňka 5Kc, TV z PV	2 100	3 800	1 900	250	47,9	<0,05
2559	21.04.2021	kuchyňka 5Kd, TV z PV	4 500	2 100	1 500	250	40,4	<0,05
2560	21.04.2021	kuchyňka 5Ke, TV z PV	10 000	14 000	9 500	250	34,7	<0,05
2929	03.05.2021	teplá voda	0	340	< 1200	250	55,7	0,04
2930	04.05.2021	sprcha – šatna ženy	16	3 100	< 1200	250	50,0	0,04
2931	04.05.2021	jídelna	0	12 000	0	250	50,6	0,08
2932	04.05.2021	sprcha ženy	0	4 400	0	250	61,7	0,14
3195	18.05.2021	SVJ, TV z PV	820	13 000	1300	300	53,0	<0,05
3196	18.05.2021	SVJ, TV z PV	14	9 400	0	300	58,9	<0,05
4445	30.06.2021	teplá voda	0	12 000	0	250		0,03
8200	23.11.2021	TV, lom	1	66 000	0	250		0,23
8202	24.11.2021	teplá voda	0	< 300	0	250	53,2	0,34
8203	24.11.2021	teplá voda	1	460	0	250	50,0	0,14
8258	29.11.2021	šatna, TV účely os. hygieny z DS	1 800	20 000	5 900	500	37,5	<0,05
8260	29.11.2021	dámská šatna, TV z PV – studna	0	4 700	0	500	57,9	<0,05
8261	29.11.2021	WC, TV z PV – DS	0	1 600	0	500	73,5	0,08



Tabulka 4

Vzorky teplých vod – vlastní vzorkovnice

číslo vzorku	Datum odběru	Místo odběru	<i>Legionella</i> spp. kultivace (max. 100 KTJ/100ml)	<i>Legionella</i> spp. qPCR (GU/100 ml)	<i>Legionella pneumophila</i> qPCR (GU/100 ml)	Filtrovaný objem (ml)	Teplota (min. 55°C)	Chlor volný (max. 1 mg/l)
3782	08.06.2021	teplá voda	8 000	450	< 600	500	56,2	0,01
3800	09.06.2021	kuchyňka 1Ka, TV z PV	0	inhibice železo		500	62,9	0,12
3801	09.06.2021	kuchyňka 1Kb, TV z PV	0	1 600	700	500	60,5	<0,05
3802	09.06.2021	kuchyňka 1Kc, TV z PV	180	2 400	< 600	500	58,3	<0,05
3803	09.06.2021	kuchyňka 1Kd, TV z PV	0	1 300	710	500	64,2	<0,05
3951	14.06.2021	pokoj	0	26 000	0	500	48,9	
4385	28.06.2021	teplá voda	2	1 100	790	500	56,4	
4756	13.07.2021	teplá voda	0	< 150	0	500	59,3	0,01
4758	13.07.2021	teplá voda	60 000	1 000 000	1 000 000	500	60,4	0,01
4810	15.07.2021	Výstup - kohout na výměníku	0	41 000	0	500	54,5	<0,05
4811	15.07.2021	byt, koupelna	0	44 000	0	500	49,3	<0,05
5638	17.08.2021	jídelna	0	9 800	0	500	52,0	<0,01
5639	17.08.2021	sprcha - šatna ženy	14	14 000	6 200	500	43,0	<0,01
5640	17.08.2021	sprcha ženy	0	5 700	0	500	58,1	<0,01
5641	17.08.2021	teplá voda	0	6 900	0	500	55,4	<0,01
8204	24.11.2021	teplá voda	1	< 150	0	500	53,0	0,12
8262	29.11.2021	šatna, TV z PV – studna	90	14 000	6 200	500	55,4	<0,05



Tabulka 5

Vzorky vod ke koupání a teplých vod – společná i vlastní vzorkovnice

číslo vzorku	Datum odběru	Místo odběru	<i>Legionella</i> spp. kultivace (KTJ/100ml)	<i>Legionella</i> spp. qPCR (GU/100 ml)	<i>Legionella pneumophila</i> qPCR (GU/100 ml)	Filtrovaný objem* (ml)	Teplota (°C)	Chlor volný (mg/l)	
7227	13.10.2021	LDN, teplá voda – kuchyňka		3 100	<600	500		40,8	0,09
			0	0	0	355			
7332	18.10.2021	plavecký bazén vstup. uprav. voda		41 000	<600	500		28,8	0,69
			0	66 000	0	310			
7334	18.10.2021	koupelový bazén vstup. uprav. voda		0	0	500		35,0	0,78
			0	0	0	260			
7335	18.10.2021	koupelový bazén		<150	0	500		35,6	0,48
			0	3 400	0	320			
7336	18.10.2021	koupelový bazén – vstup		4 100	0	500		33,8	0,36
			0	8 800	0	315			
7338	19.10.2021	jídelna, teplá voda		17 000	<600	500		51,7	0,02
			0	13 000	0	350			
7339	19.10.2021	sprcha – šatna ženy, teplá voda		31 000	1 700	500		43,5	0,01
			7	12 000	<880	340			
7340	19.10.2021	sprcha ženy, teplá voda		19 000	<600	500		58,2	0,03
			0	18 000	0	250			



Porovnání výsledků

- obě metody jsou vzájemně neporovnatelné
- výsledky stanovení kultivační metodou jsou podhodnocené
- metoda PCR výsledky naopak nadhodnocuje

Metoda PCR se ukázala jako velmi **citlivá, přesná, rychlá a spolehlivá**.

Průkaz přítomnosti vyššího množství, byť mrtvých bakterií legionel (a zejm. *Legionella pneumophila*) v rozvodném systému, by měl být důvodem k prověření podmínek, které podporují jejich růst v místě odběru a k zahájení nápravných opatření.

Stanovení legionel pomocí qPCR a kultivační metodou by mělo být provedeno z jedné společné vzorkovnice.

Metoda qPCR je **vhodná pro monitoring** za účelem zlepšení a rozšíření metod kontroly kvality vod.



Závěr

Stanovení legionel metodou qPCR jsme v naší laboratoři úspěšně akreditovali. V současné době budujeme laboratoř pro stanovení viru SARS-CoV-2 v odpadních vodách metodou RT-qPCR.

Dotazy?



Děkuji za pozornost

veronika.tomi@pvk.cz