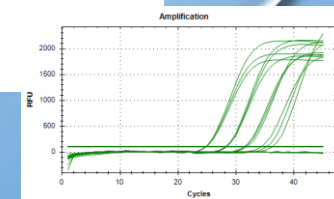
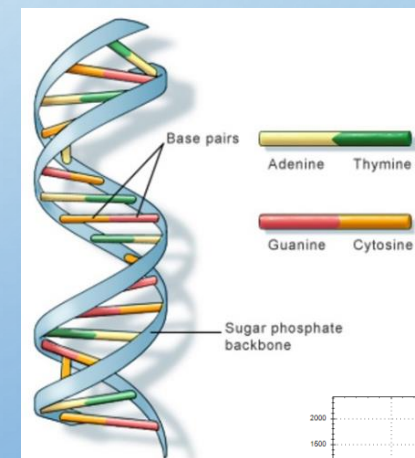


VYUŽITÍ METOD MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE V BIOLOGII KOUPACÍCH VOD

qPCR PRO DETEKCI *E. COLI* V KOUPACÍCH VODÁCH

ŠÁRKA BOBKOVÁ

STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV



KVALITA KOUPACÍ VODY

- Česká republika - vyhláška **MZ č. 238/2011 Sb** „Vyhláška o stanovení hygienických požadavků na koupaliště, sauny a hygienické limity písku v pískovištích venkovních hracích ploch“
- Z mikrobiologického hlediska se stanovují indikátory fekálního znečištění –

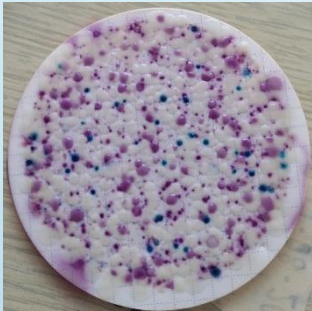
E.COLI A ENTEROKOKY



KOUPACÍ VODY – METODIKA STANOVENÍ

- Podle vyhlášky **MZ č. 238/2011 Sb - kulturačně**

E.coli



ČSN EN ISO 9308-1
(CCA medium)



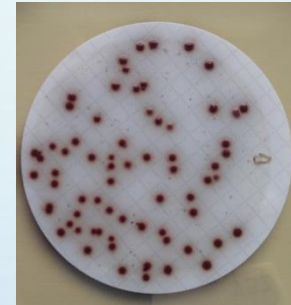
foto: dongnamlab.com

ČSN EN ISO 9308-3
(MPN, miniaturizovaná metoda)



ISO 9308-2
(MPN, Colilert)
v některých EU zemích – Finsko;
USA

enterokoky



ČSN EN ISO 7899-2
(SB medium)

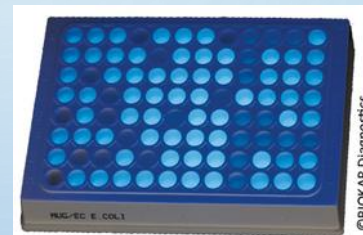


foto: noackgroup.com

ČSN EN ISO 7899-1
(MPN, miniaturizovaná metoda)



foto: Idexx US

enterolert
pouze v USA

KOUPACÍ VODY – MOLEKULÁRNÍ METODY

qPCR, RT PCR

Evropa



probíhá revize BWD

diskuse o molekulárně biologických
metodách qPCR, RT-PCR

ISO/TS 12869:2019 Water quality — Detection and quantification of Legionella spp. and/or Legionella pneumophila by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

USA



„Rapid qPCR method for quantification
of E. coli “ – draft method C, US EPA

US EPA Method 1611:

Enterococci in Water by TaqMan® Quantitative
Polymerase Chain Reaction (**qPCR**) Assay

CÍLE PRÁCE

- ZAVÉST **METODU qPCR** PRO STANOVENÍ *E.COLI* V MATRICI KOUPACÍ VODA NA NAŠE PRACOVIŠTĚ
- **OTESTOVAT METODU** NA LABORATORNĚ PŘIPRAVENÝCH VZORCÍCH *E.COLI* A VZORCÍCH KOUPACÍCH VOD
- **POROVNAT VÝSLEDKY** KULTIVAČNÍ METODY (KTJ NEBO MPN) A qPCR (GE NEBO CCE)

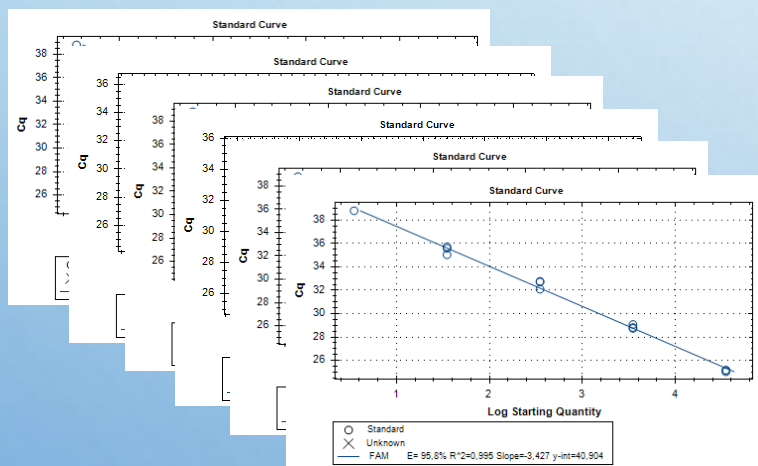
ZAVÁDĚNÍ METODY

- Vycházeli jsme z US EPA normy, odborných článků, ISO/TS 12769 (Legionela qPCR),
 - předběžných instrukcí k mezinárodní srovnávací studii (stanovení *E.coli* pomocí qPCR v koupacích vodách)
- NĚKOLIKERÉ OPAKOVÁNÍ STANDARDNÍ KŘIVKY –

standard **DNA** *E.coli* DSM 30083 (Minerva)

amplifikace části genu pro 16S rRNA

TaqMan chemie (FAM sonda)



MASTER KŘIVKA

GE/reakci	3,5	35	350	3500	35000
$\log_{10} \text{GE}$	0,54	1,54	2,54	3,54	4,54
Ct	ND	35,25	31,75	28,22	24,65

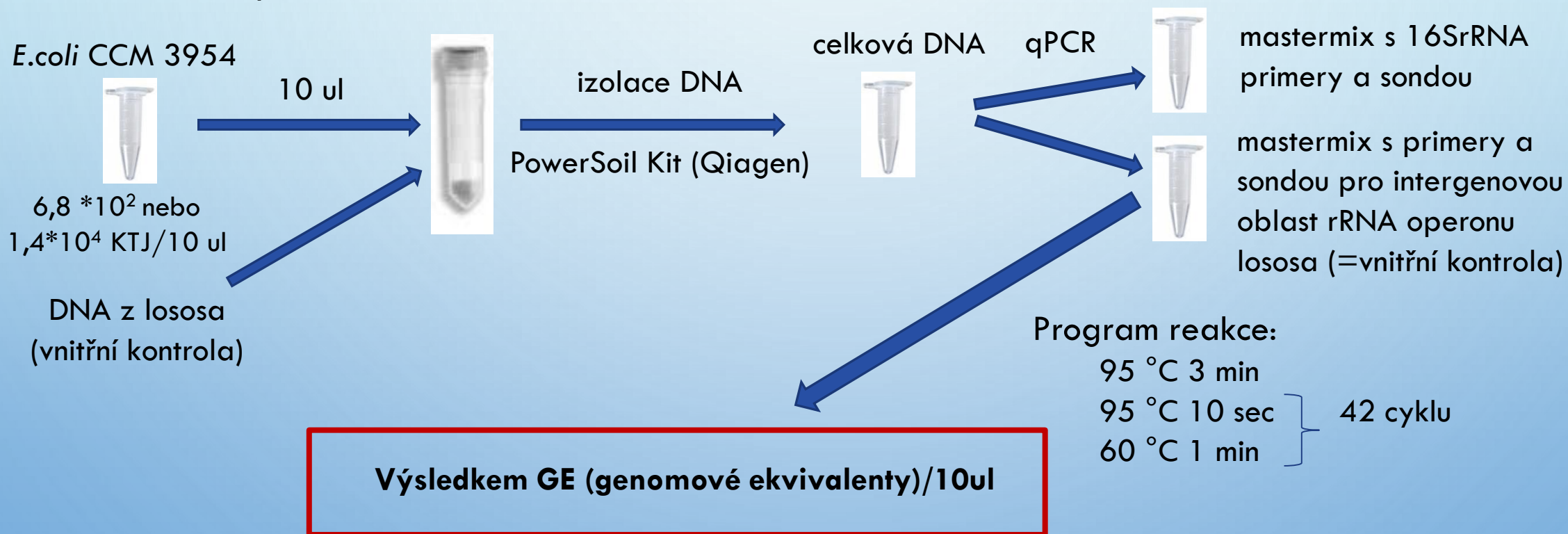
GE...genomový ekvivalent, Ct...cyklus prahu, ND...nedetekováno

AF (amplifikační faktor) = 1,94 ($\sigma = 0,023$)

y (Ct odpovídající 1 GE/vzorek) = 40,5 proto qPCR...42 cyklů

KALIBRAČNÍ VZORKY

- Podle US EPA výsledky vyjádřeny jako **calibrator cell equivalents (CCE)**
- Kalibrátory - vzorky o známé koncentraci (KTJ/objem) z nichž byla DNA izolována stejně jako u neznámých vzorků



ANALÝZA KALIBRAČNÍCH VZORKŮ

Analýza vzorků o koncentraci **680 KTJ/10 ul**

	GE/10ul	KTJ/10ul	GE/KTJ
CS1	1100	680	1,6
CS2	1000	680	1,5
CS3	3000	680	4,4

Analýza vzorků o koncentraci **14250 KTJ/10 ul**

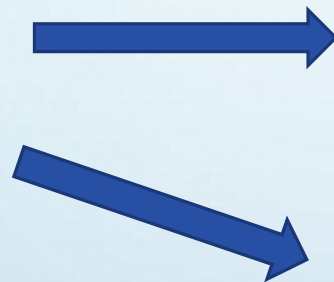
	GE/reakci	GE/10 ul	KTJ/10 ul	GE/KTJ
CS1	3000	30000	14250	2,1
CS1 10krat	310	31000	14250	2,2
CS1 100krat	41	41000	14250	2,9
CS1 1000krat	6	60000	14250	4,2
CS2	1700	17000	14250	1,2
CS2 10krat	160	16000	14250	1,1
CS3	1600	16000	14250	1,1
CS3 10krat	220	22000	14250	1,5
Blank	15	150	0	

Gen vnitřní kontroly:

Rozdíl Ct hodnot vzorků (kalibrátorů) a blanku < 3 Ct

PILOTNÍ ANALÝZY VZORKŮ KOUPACÍCH VOD

- LOKALITA MĚLICE



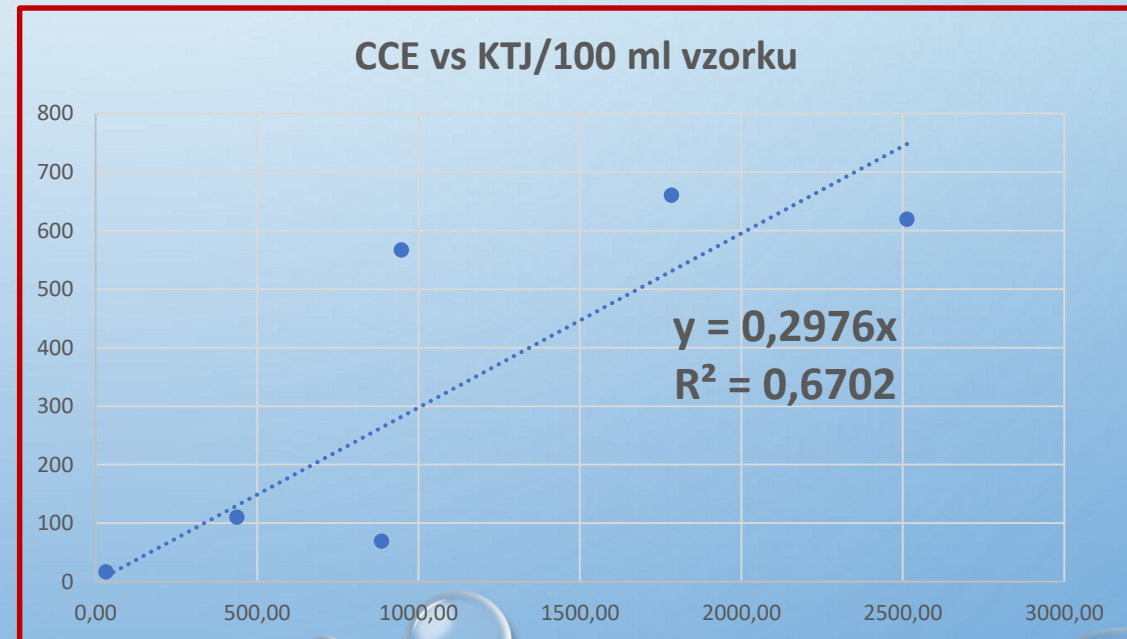
kultivační stanovení *E.coli*
(MPN/100 ml)



porovnání výsledků

izolace DNA, qPCR stanovení (CCE/100 ml)

	CCE/100 ml	MPN/100 ml	CCE/MPN
Mel2HA	885,32	69,7	12,7
Mel2HAEC	2512,46	619,7	4,1
Mel201	436,75	110,6	3,9
Mel201EC	1782,58	660,6	2,7
Mel203	31,23	16,9	1,8
Mel203EC	946,95	566,9	1,7



Gen vnitřní kontroly:

Rozdíl Ct hodnot vzorků a kalibrátoru < 3 Ct

SHRNUTÍ

- Z opakování standardní křivky byly vyhodnoceny parametry pro další stanovení (variabilita, amplifikační faktor, počet cyklů...)
- Byly připraveny a vyhodnoceny výsledky vzorků kalibrátorů – budou pak sloužit jako pozitivní kontrola při qPCR, ke které se budou vztahovat výsledky neznámých vzorků
- Pilotní stanovení vzorků koupacích vod byla zjištěna variabilita mezi poměrem CCE a MPN, ale bude třeba většího množství dat ke statistickému zpracování



DĚKUJI ZA POZORNOST

TAČR TJ04000132 Využití metod molekulární biologie k identifikaci zdrojů znečištění v koupacích vodách