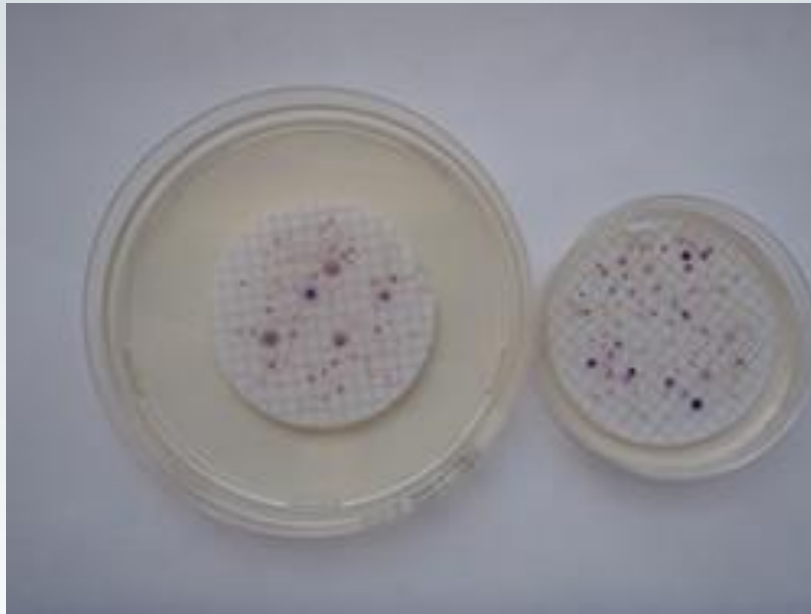


STANOVENÍ KOLIFORMNÍCH BAKTERIÍ NA CCA AGARU (IDENTIFIKACE, VÝZNAM, LIMITY)

Dana Baudišová, Petr Pumann, Vladislav Jakubů
Státní zdravotní ústav, Praha



Council Directive 98/83/EC

Koliformní bakterie: Indikátor

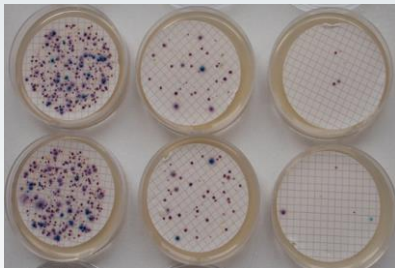
Limitní hodnota 0/100 ml

252/2004 Sb. ve znění pozdějších předpisů

Koliformní bakterie 0 KTJ/100 ml

Předepsané metody:

ČSN EN ISO 9308-1 (CCA)



nebo

ČSN EN ISO 9308-2

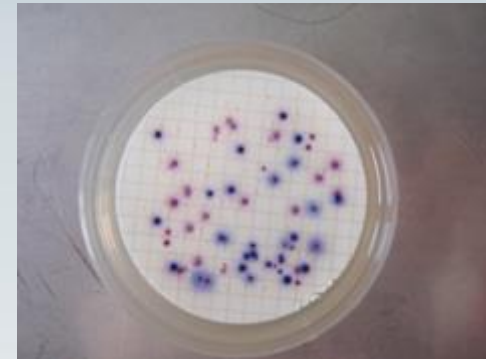
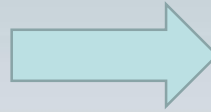


Koliformní bakterie podle ČSN EN ISO 9308-1

- **Úvod.** *Výskyt koliformních bakterií lze interpretovat obtížněji, protože některé koliformní bakterie se vyskytují v půdě a v povrchových sladkých vodách a nejsou vždy intestinálního původu. Proto nemůže být přítomnost koliformních bakterií vždy důkazem fekálního znečištění, může pouze indikovat závady při úpravě vody nebo vniknutí vody do distribučního systému.*
- **Termíny a definice** **3.1 koliformní bakterie** - členové čeledi *Enterobacteriaceae*, kteří produkují enzym β -D-galaktosidázu
- **Příloha A (informativní). Další mikrobiologické informace o koliformních bakteriích** Vedle toho, že produkují β -D-galaktosidázu, jsou koliformní bakterie gramnegativní, oxidázanegativní tyčinkovité bakterie netvořící spory, které jsou schopné růst za aerobních nebo fakultativně anaerobních podmínek za přítomnosti žlučových solí (nebo jiných povrchově aktivních látek s podobnými vlastnostmi inhibujícími růst) a které jsou **obvykle schopné fermentovat laktózu se současnou produkcí kyselin a aldehydu během 48 h**, pokud jsou kultivovány při teplotě $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Současný stav

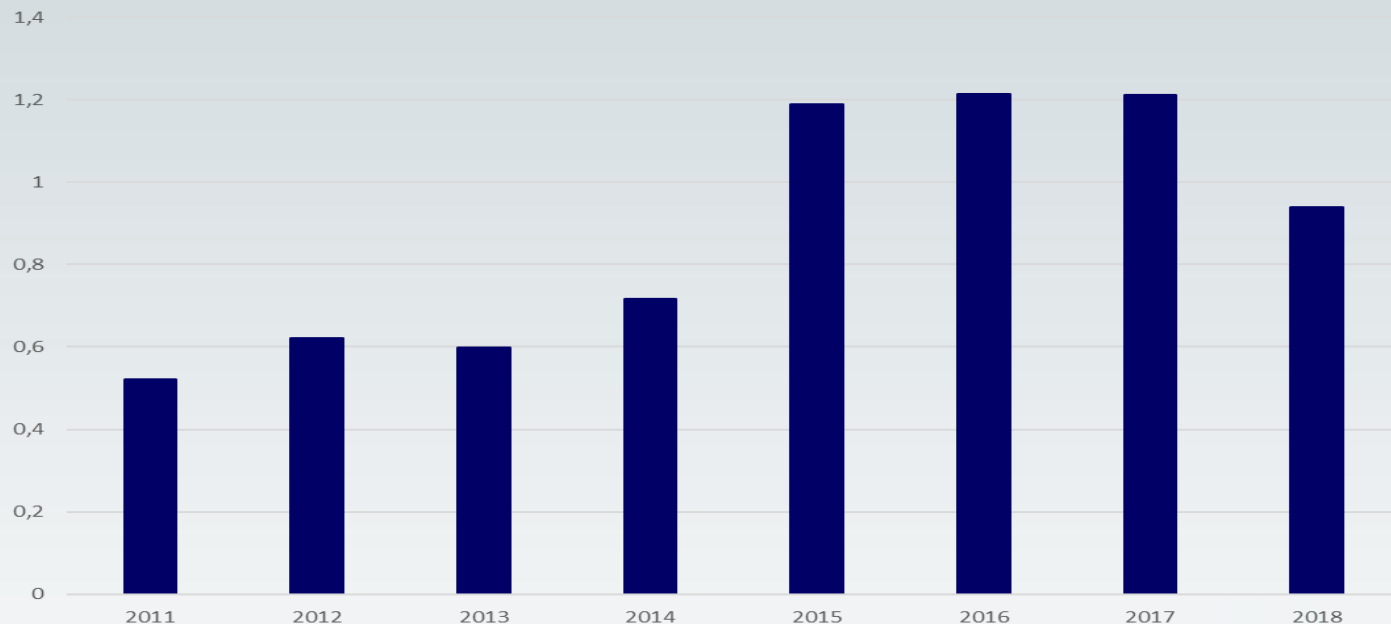
- Změnila se definice koliformních bakterií
- Fermentace laktózy β -D-galaktosidáza



nyní se tedy jako koliformní bakterie detekuje významně více druhů a kmenů

Koliformní bakterie – nejhorší výsledky z mikrobiologických ukazatelů

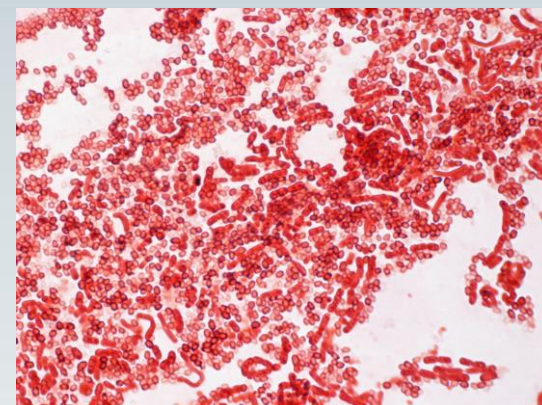
% pozitivních vzorků
(oblasti s ≥ 5000 zásobovaných obyvatel)



Identifikace bakterií – MALDI TOF

- Matrix – assisted laser desorption/ionization) na přístroji Bruker Daltonic MALDI Biotyper.
- Tato metoda je založena na identifikaci bakterií na základě jedinečného složení proteinů.
- Proteinové profily jsou srovnávány s databázemi kmenů ze světových sbírek, tudíž lze identifikovat pouze druhy, jejichž zástupci ve sbírkách jsou.
- Pracuje se s čistými (přečištěnými) 24 hodin „starými“ kulturami, různá média = různé identifikační skóre. Vhodný je např. krevní agar.
- Vlastní analýza je rychlá – trvá několik minut

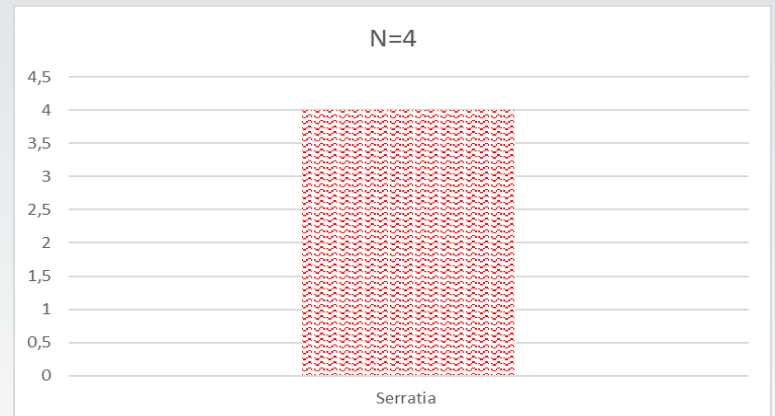
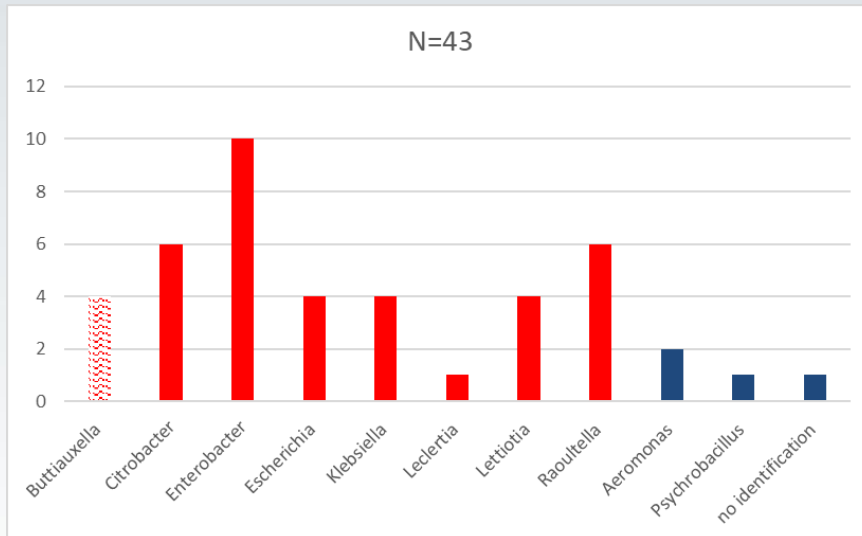
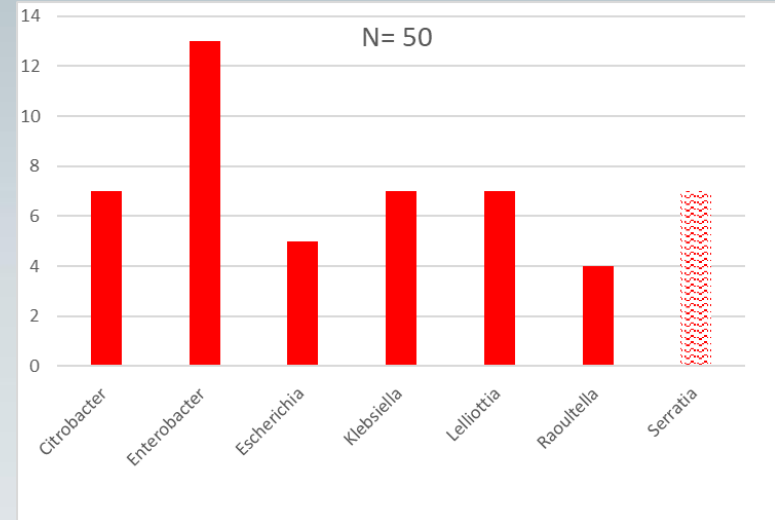
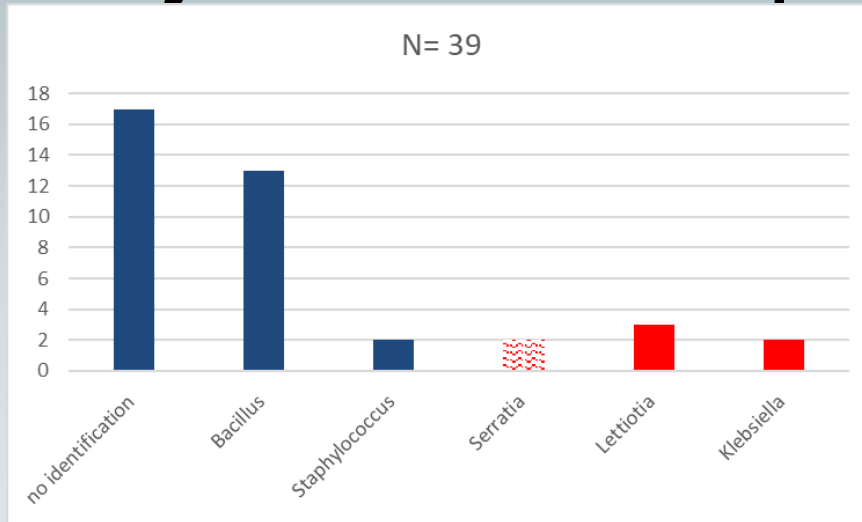
Bylo identifikováno 136 kmenů z pitných vod (ze 4 různých provozních VH laboratoří)



H6(++) (B)	6L1	Enterobacter cloacae	2.196	Enterobacter asburiae	2.179
H7(++) (B)	6L2	Enterobacter cloacae	2.243	Enterobacter asburiae	2.088
H8(++) (B)	7L	Enterobacter cloacae	2.245	Enterobacter asburiae	2.172
H9(+++) (B)	8L	Citrobacter gillenii	2.454	Citrobacter gillenii	2.442
H10(+++) (B)	L52	Raoultella planticola	2.507	Raoultella planticola	2.491
H11(+++) (B)	L53	Raoultella planticola	2.579	Raoultella planticola	2.568
H12(+++) (B)	L82	Raoultella planticola	2.511	Raoultella planticola	2.501

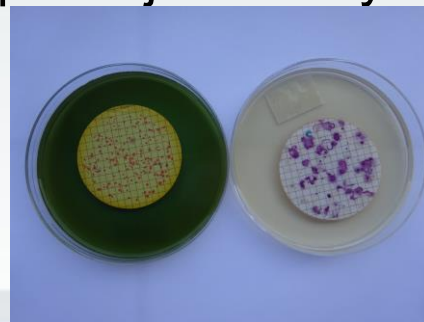
Seznam identifikovaných druhů (počet izolátů = 118)	Počet izolátů	Člen čeledi Enterobacteriaceae	Fermentace /rozklad laktózy
<i>Aeromonas caviae</i>	1	Ne	+
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	Ne	+
<i>Bacillus cereus</i>	2	Ne	-
<i>Bacillus megaterium</i>	11	Ne	+
<i>Buttiauxella agrestis</i>	2	Ano	≤ 10 %
<i>Buttiauxella gaviniae</i>	2	Ano	25 -75 %
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2	Ano	25 -75 %
<i>Citrobacter braakii</i>	1	Ano	≥ 90%
<i>Citrobacter farmeri</i>	1	Ano	≥ 90%
<i>Citrobacter freundii</i>	1	Ano	25 -75 %
<i>Citrobacteri gillenii</i>	8	Ano	25 -75 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	22	Ano	≥ 90%
<i>Enterobacter ludwigii</i>	2	Ano	+
<i>Escherichia coli</i>	3	Ano	≥ 90%
<i>Escherichia vulneris</i>	5	Ano	≤ 10 %
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	Ano	≥ 90%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	Ano	≥ 90%
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1	Ano	≥ 90%
<i>Lelliottia amnigena</i>	14	Ano	25 – 75 %
<i>Psychrobacillus psychrotolerans</i>	1	Ne	?
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	2	Ano	≥ 90%
<i>Raoultella planticola</i>	6	Ano	≥ 90%
<i>Raoultella terrigena</i>	2	Ano	≥ 90%
<i>Serratia fonticola</i>	6	Ano	≥ 90%
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	Ano	≤ 10 %
<i>Serratia proteamaculans</i>	1	Ano	≤ 10 %
<i>Serratia rubidae</i>	4	Ano	≥ 90%
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2	Ne	+

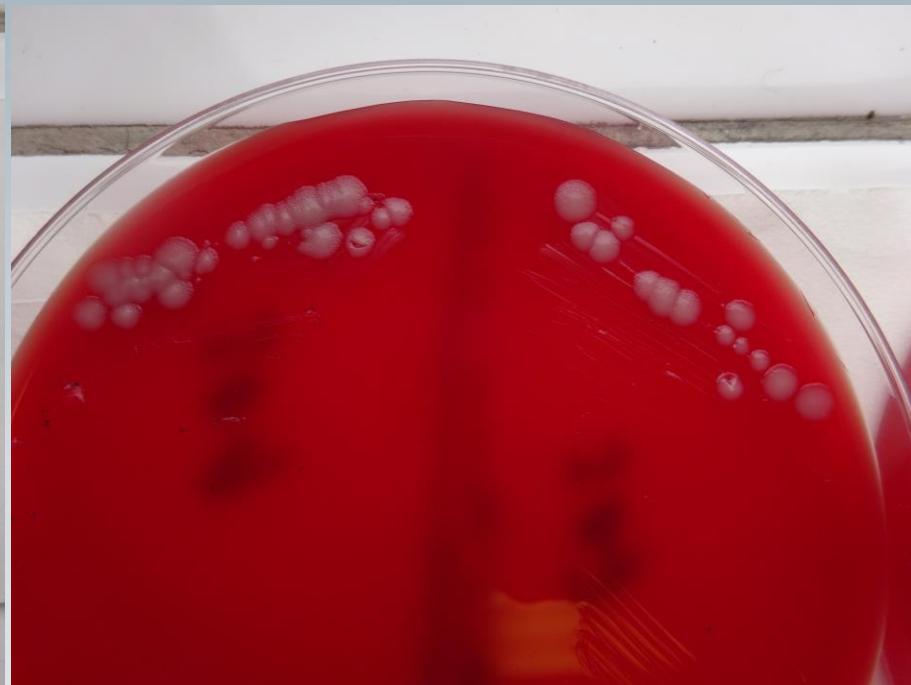
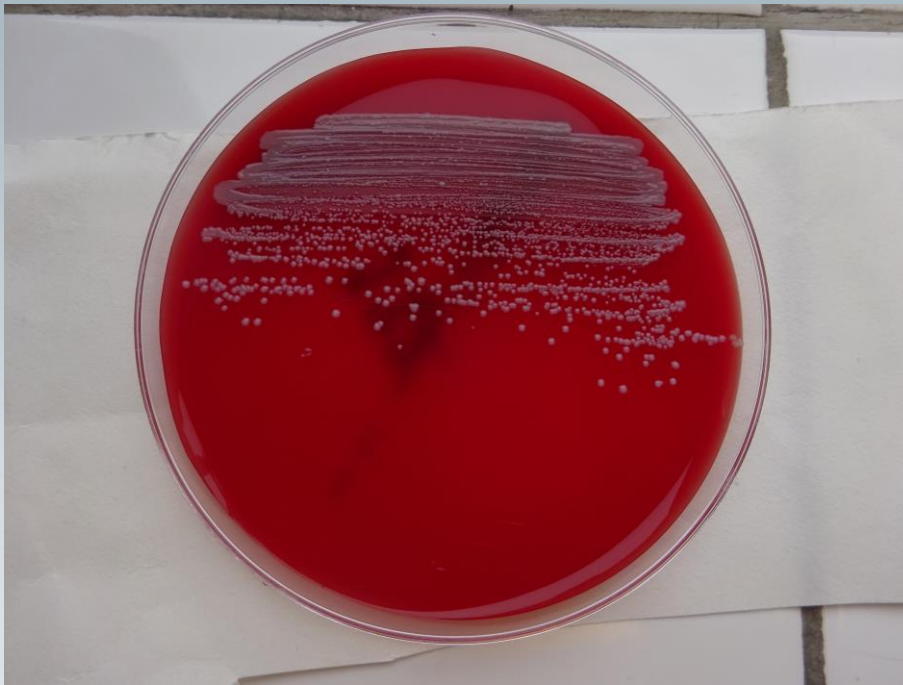
Co jsou falešně pozitivní výsledky?



Diskuse a závěry

- Ze 136 izolovaných kmenů bylo druhově určeno 118, tj. téměř 85 %.
- Převážná většina izolátů byla identifikována jako druhy, které spadají do čeledi Enterobacteriaceae.
- Pouze ojediněle byly izolovány aeromonády (*A. hydrophila*, *A. caviae*), které lze odlišit oxidázovým testem. V případě slabého výsledku, nebo velkého množství doprovodné mikroflóry (a při nepřeočkování a nepřečištění kolonií) lze s koliformními bakteriemi zaměnit.
- Za typické falešně pozitivní výsledky lze považovat záchyt druhů rodů *Bacillus* a *Staphylococcus*, které mohou na CCA médiu růst, vykazovat aktivitu β -D-galaktosidázy a mají též negativní oxidázový test. V každém případě lze jednoznačně tyto kmeny odlišit mikroskopicky (Grammovo barvení), a sporulující kmeny rodu *Bacillus* lze odlišit pomocí tvarů kolonií.





- Důvod zvýšeného záchytu zástupců rodu *Bacillus* a *Staphylococcus* zatím nebyl zjištěn, i když nějaké možnosti jsou (stav vodovodního potrubí, metodické problémy apod.).
- V každém případě lze jednoznačně tyto kmeny odlišit mikroskopicky (Grammovo barvení), a sporulující kmeny rodu *Bacillus* lze odlišit pomocí tvarů kolonií (někdy již na membránových filtrech; po přeočkování určitě).

- Přestože většina izolátů patřila do druhů čeledi Enterobacteriaceae, řada z nich nemusí mít fekální původ a ve vodním prostředí se může běžně rozmnožovat.
- Jejich výskyt (v nepřítomnosti současné detekce *E. coli*, případně bez zhoršení dalších ukazatelů, jako např. zákalu) tak neindikuje fekální znečištění, ale spíše různé technologické závady (zvýšená tvorba biofilmů, sekundární kontaminace atd.).
- **Význam koliformních bakterií při analýze rizik v systémech zásobování pitnou vodou je neoddiskutovatelný!**
- **Na druhé straně by bylo vhodné uvážit, zda mezní hodnota pro hodnocení jakosti pitné vody 0 KTJ/100 ml není příliš přísná.**

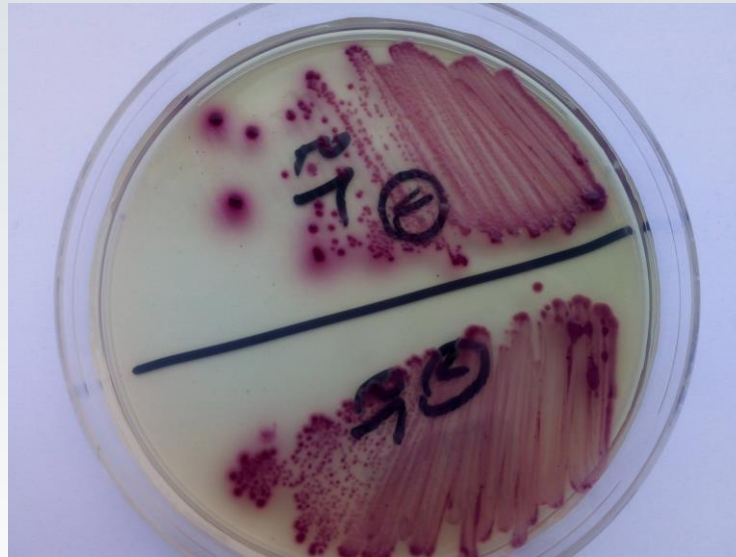
- **CCA je vysoce citlivé kultivační médium** a nelze konstatovat, že by nevyhovovalo účelům stanovení koliformních bakterií a *E. coli* ve vodách s nízkým obsahem doprovodné mikroflóry (tj. v pitných desinfikovaných vodách).
- **Každé médium má svoje specifika a každé bude v něčem dobré a v něčem slabší.**

Bylo by vhodné posunout tuto problematiku dále a to:

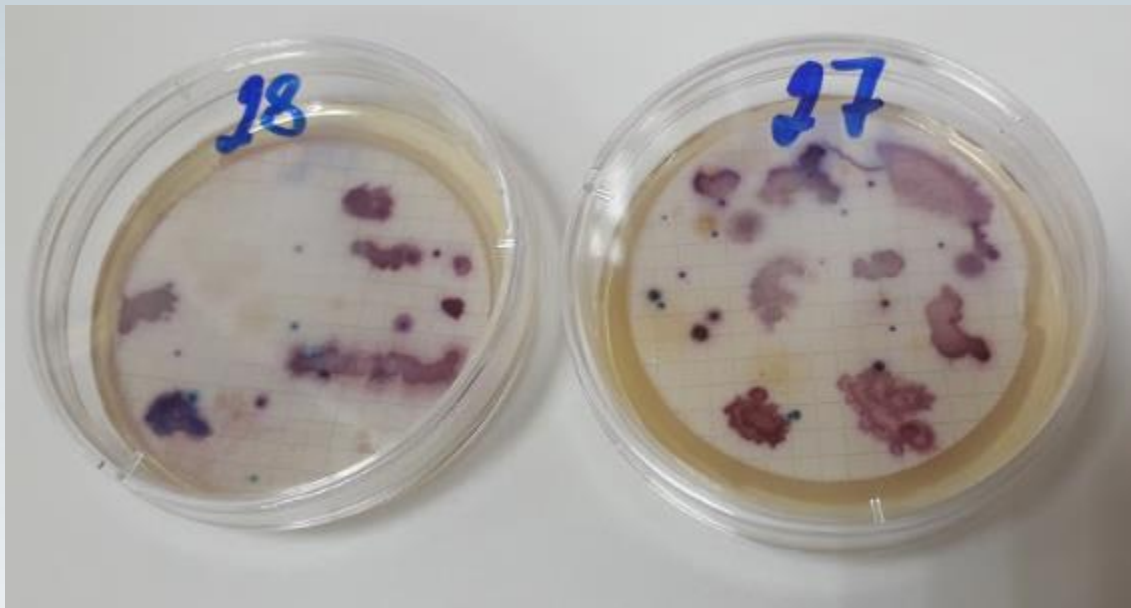
- K větší péči v konfirmaci koliformních bakterií (v případě pochybností provést přeočkování, opakovaný OXI test ověření tvaru vyrostlých kolonií, mikroskopie a případně dourčení ve specializované laboratoři)
- K možným změnám v hodnocení indikátoru koliformní bakterie (což už není laboratorní záležitost).

Původní plán, získat více než 500 izolátů z pitných vod se zatím nepodařil (jedná se o dlouhodobější záležitost, než jsme čekali), ale i tak považujeme testovaný soubor za dostatečný a všem hydroanalytickým laboratořím, které nám poskytly bakteriální izoláty ke studiu tak

**mnohokrát
děkujeme!**



Děkujeme za pozornost



Vznik příspěvku byl podpořen v rámci MZ ČR – RVO
(Státní zdravotní ústav - SZÚ, IČ 75010330)