



ALTERNATIVNÍ PŘÍSTUPY K RYCHLÉ DETEKCI MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACE PITNÝCH VOD

DANA VEJMEKOVÁ, JANA ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ

CÍLE TÉTO PŘEDNÁŠKY

- rešerše dostupných metod
- nadnesení klíčových aspektů mikrobiální kontaminace pitných vod
- DISKUSE
 - možnosti?
 - zájem o spolupráci?

MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACE

- Vyhláška č. 252/2004 Sb.

§ 3 (1): „Pitná a teplá voda nesmí obsahovat mikroorganismy, parazity a látky jakéhokoliv druhu v počtu nebo koncentraci, které by mohly ohrozit veřejné zdraví.“

stanovené limity: převážně bakteriální

DETEKCE vs. IDENTIFIKACE

- detekce = zjišťování, odhalování, objevování neznámého, skrytého
 - identifikace = zjišťování totožnosti
-
1. detekce mikrobiálního znečištění - něco se děje! →
 2. identifikace - charakteristika znečištění – patogen?

REFERENČNÍ PATOGENY (WHO Guidelines 2011)

Mohou se lišit regionálně (podnebí, charakter vodních zdrojů apod.)

Výběr – na základě výskytu a významu nemocí přenášených vodou
(omezeno dostupností dat)

- BAKTERIE
- VIRY
- PRVOCI

VIRY

- nejmenší patogeny (0,02 – 0,4 μm) → hůře odstranitelné fyzikálními procesy (filtrace)
- některé odolnější vůči dezinfekčním činidlům (adenoviry vůči UV)
- mohou ve vodě přetrvávat dlouhou dobu
- infekční dávky obvykle nízké
- omezená škála hostitelů, často druhově specifické
- potenc. ref. patogeny: rotaviry, enteroviry, noroviry

VIRY – relevantní pro monitoring

- rod *Norovirus*

u lidí způsobuje akutní virovou gastroenteritidu

- rod *Enterovirus*

Virus Coxsackie – skupina A a B, obě mohou vyvolávat např. meningitidy, myokarditidy či perikarditidy

Coxsackie A viry - nemoc rukou, nohou a úst; zkoumána souvislost se vznikem diabetu 1. typu.

- viry hepatitidy B, C, E (velmi důležité ve vývojových zemích)

VIRY – METODY STANOVENÍ

- složitější než u ostatních MO – obtížné zakoncentrování (100 l i více!)
- rutinní kultivační stanovení: enteroviry (→ nejvíce zkoumány)
- PCR (RT-PCR), qPCR

PRVOCI

- mnohem větší než viry i bakterie (0,01 – 1 mm) → snazší detekce mikroskopem x
- cysty giardií (8 – 15 μm), oocysty kryptosporidií (3 – 8 μm)
- (oo)cysty jsou vysoce odolné vůči vlivům prostředí

PRVOCI – METODY STANOVENÍ

- PCR, qPCR
- detekce cyst, oocyst
- stanovení potenc. indikátoru přítomnosti kryptosporidií a giardií - *Clostridium perfringens* (Metodické doporučení SZÚ 2005):

Přítomnost jeho spor může svědčit o nedostacích v úpravě vody, o ovlivnění podzemní vody vodou povrchovou apod.

Nepřítomnost *C. perfringens* neznamená, že by nemohly být přítomny (oo)cisty parazitů.

PRVOCI – relevantní pro monitoring

- rod *Cryptosporidium*

- rod *Giardia*

→ střevní onemocnění kryptosporidióza/giardiáza (lambliáza)

infekční dávka je velmi nízká: 1 – 10 oocyst kryptosporidií,

< 10 cyst giardií (Metodické doporučení SZÚ 2005)

Srovnání technicko-ekonomických aspektů současných dezinfekčních technologií (Gray 2008)

| | Chlorace/ Dechlorace | UV | Ozonizace | Mikrofiltrace | Ultrafiltrace |
|---|-------------------------|-----|-----------|---------------|---------------|
| Odstranění bakterií | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ |
| Odstranění virů | + | + | ++ | + | +++ |
| Odstranění prvoků (<i>Cryptosporidium</i>) | - | - | ++ | +++ | +++ |
| Zbytková toxicita/vznik vedlejších produktů | +++ | - | + | - | - |
| Provozní náklady | + | + | ++ | +++ | +++ |
| Investiční náklady | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| Bezpečnost | + | +++ | ++ | +++ | +++ |

Vysvětlivky: - žádné, + nízké, ++ střední, +++ vysoké

MOŽNOSTI DETEKCE

- kulturační techniky
- alternativní metody
 - ATP
 - H₂S strip test
 - PCR (qPCR)
 - průtoková cytometrie
 - FISH, mikročipy

KULTIVAČNÍ TECHNIKY

- výsledky cca za 2 – 3 dny
- v případě havárie to je pozdě!
- ne všechny patogeny lze kultivovat

→ žádoucí mít k dispozici rychlejší metody detekce mikrobiální kontaminace

→ MOŽNOSTI?

ČASOVÁ NÁROČNOST VYBRANÝCH ALTERNATIVNÍCH METOD

| Metoda | Přibližná časová náročnost |
|----------------------------------|----------------------------|
| ATP | Minuty |
| Průtoková cytometrie | Hodiny |
| Mikročipy | Hodiny |
| qPCR | 1 den |
| FISH | 1 až 2 dny |
| H₂S strip test | 2 dny |

Měření úrovně ATP

- adenosintrifosfát (ATP) – součástí všech živých buněk
→ odhad množství aktivní mikrobiální biomasy
- měření mikrobiální/celkové (mikrobiální + volná extracelulární) ATP
- speciálně upravené odběrové tyčinky se žlábkem umožňující zachycení konstantního množství vzorku
- přenosné luminometry – měření V MÍSTĚ ODBĚRU



Měření úrovně ATP – příklad z literatury



- monitoring mikrobiologické kvality pitné vody v distribučním systému Paříže
- surová voda: povrchová vs. podzemní
- počty kolonií (R2A a PCA agar)

Měření úrovně ATP – příklad z literatury

Table 1
First campaign (spring (2001)), biological and physicochemical parameters for the Orly WTW distribution system, the Ivry WTW distribution system and the Joinville WTW distribution system

| Sampling point | ATP (fg/ml) | HPC-R2A/ml | HPC-PCA/ml (22°C) | HPC-PCA/ml (37°C) | Temperature (°C) | Free chlorine (mg Cl ₂ /l) |
|-------------------------|-------------|------------|----------------------|----------------------|---------------------|--|
| <i>Orly plant (OP0)</i> | 7 | 0 | 0 | 0 | 14.2 | 0.56 |
| OP1-ST | 8 | 10 | 0 | 0 | 12.8 | 0.32 |
| OP2-SP | 2 | 10 | 0 | 0 | 12.0 | 0.33 |
| OP3-SP | 71 | 20 | 0 | 0 | 11.7 | 0.04 |
| OP4-SP | 254 | 80 | 0 | 0 | 12.0 | 0.04 |
| OP5-SP | 134 | 500 | 0 | 0 | 11.9 | <DL |
| OP6-SP | 223 | 390 | 0 | 0 | 12.1 | 0.04 |
| OP7-SP | 422 | 740 | 0 | 0 | 11.6 | <DL |
| <i>Ivry plant (IP0)</i> | 76 | 0 | 0 | 0 | 12.8 | 0.58 |
| IP1-SP | 36 | 0 | 0 | 0 | 11.4 | 0.15 |
| IP2ST | 63 | 0 | 0 | 0 | 12.2 | 0.07 |
| IP3-SP | 918 | 70 | 0 | 0 | 11.7 | <DL |
| IP4-SP | 650 | 35 | 1 | 1 | 11.8 | 0.05 |
| IP5ST | 374 | 605 | 0 | 1 | 12.1 | <DL |
| IP6-SP | 731 | 2380 | 0 | 1 | 11.8 | 0.11 |
| IP7-SP | 1060 | 200 | 0 | 0 | 11.8 | <DL |
| IP8-SP | 996 | 150 | 0 | 1 | 11.3 | <DL |
| IP9ST | 4120 | 6660 | 3 | 1 | 10.9 | <DL |
| IP10-SP | 802 | 920 | 4 | 1 | 11.8 | <DL |

- surová voda: povrchová
- vodárna **Orly**: nepatrné rozdíly v úrovni ATP a HPC-R2A (vzdálenost, doba zdržení)
- vodárna **Ivry**: snížení mikrob. kvality po zdržení v zásobním rezervoáru (IP9ST)

Měření úrovně ATP – příklad z literatury

Table 2
First campaign (spring (2001)), biological and physicochemical parameters for the Vanne aqueduct distribution system, the Vanne & Loing aqueducts distribution system and the Avre aqueduct distribution system

| Sampling point | ATP (fg/ml) | HPC-R2A/ml | HPC-PCA/ml (22°C) | HPC-PCA/ml (37°C) | Temperature (°C) | Free chlorine (mg Cl ₂ /l) |
|---------------------------------|-------------|------------|----------------------|----------------------|---------------------|--|
| <i>Vanne aqueduct (VA0)</i> | 6 | 50 | 0 | 0 | 11.9 | 0.15 |
| VA1-SP | 19 | 10 | 0 | 0 | 11.8 | <DL |
| VA2-SP | 201 | 10 | 0 | 0 | 11.7 | 0.08 |
| VA3-SP | 13 | 0 | 0 | 0 | 11.9 | 0.05 |
| VA4-SP | 12 | 80 | 0 | 0 | 11.2 | 0.06 |
| <i>Loing aqueduct (LA0)</i> | 13 | 10 | 0 | 0 | 11.8 | 0.09 |
| VA/LA1ST | 23 | 0 | 0 | 1 | 11.3 | 0.12 |
| VA/LA2-SP | 4 | 0 | 0 | 0 | 11.5 | 0.10 |
| VA/LA3-SP | 3 | 10 | 0 | 0 | 11.9 | 0.10 |
| VA/LA4-SP | 4 | 0 | 0 | 0 | 11.8 | 0.08 |
| VA/LA5-SP | 8 | 130 | 0 | 0 | 11.7 | 0.11 |
| VA/LA6-SP | 2 | 10 | 0 | 0 | 12.1 | 0.11 |
| VA/LA7-SP | 3 | 110 | 0 | 0 | 11.9 | 0.11 |
| VA/LA8-SP | 3 | 0 | 0 | 1 | 11.8 | 0.10 |
| VA/LA9-SP | 4 | 0 | 0 | 0 | 12.0 | 0.11 |
| VA/LA10-SP | 4 | 0 | 0 | 0 | 12.0 | 0.12 |

- surová voda: podzemní
- mikrobiologická stabilita distribuované vody

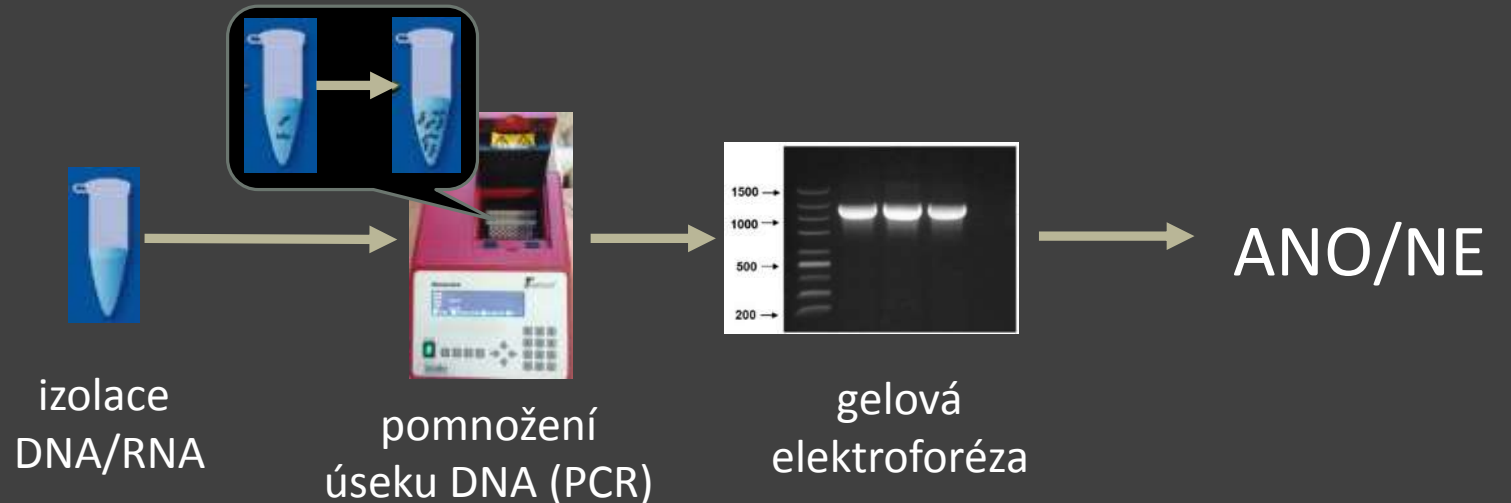
H₂S STRIP TEST



- jednoduchý screeningový test na zjištění přítomnosti fekálního znečištění vody
- detekce sulfanu produkovaného bakteriemi
např. zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, sulfátredukující bakterie (*Clostridium perfringens*)
- kultivační médium s thiosulfátem
- existují systémy bez významné nutnosti kultivace, výsledek znám po 24 h


PCR (polymerázová řetězová reakce)

- založena na pomnožení vybraného úseku DNA
- 1. krok – izolace nukleové kyseliny (DNA/RNA)
- potřeba zakoncentrování? (filtrace velkého množství vody)
- RT-PCR




PCR – příklady z literatury

- stanovení virů a prvoků napříč procesy úpravny vod
- RT- PCR, PCR



ELSEVIER

Water Research 38 (2004) 3931–3939



www.elsevier.com/locate/watres

Detection of enteric viruses, *Giardia* and *Cryptosporidium* in two different types of drinking water treatment facilities

M.A. Ali^{a,*}, A.Z. Al-Herrawy^b, S.E. El-Hawaary^a

^aEnvironmental Virology Laboratory, Department of Water Pollution Researches, National Research Centre, Dokki, Cairo 12311, Egypt
^bEnvironmental Parasitology Lab., Department of Water Pollution Researches, National Research Centre, Dokki, Cairo 12311, Egypt

Received 17 June 2003; received in revised form 16 March 2004; accepted 30 June 2004

Table 1
Primer sets for detection of some enteric viruses

| Virus | Primer | Sequence | Orientation | Length (bp) |
|-------------|----------|------------------------------|-------------|-------------|
| Enterovirus | E2 | TCCGCCCCCTGA ATG | A | 196 |
| | E1 | CACCGGATGGCCAATCCA | S | |
| Norovirus | E3 | ATTCATCATCACCATA | A | 113 |
| | NI | GAA TTC CAT CGC CCA CTG GCT | S | |
| E70 | S4 | AATTGGAGAAATAGTGAAAACCTGTGGC | A | 114 |
| | AS4 | CTGTGTTGGATGTAGCI*CCTGTCTC | S | |
| HEV | ET1.1 R1 | CAGGGCCCCCAAGTTCCTCT | A | 381 |
| | ET1.1 F1 | GCTCATTATGGAGAGAGTGTGT | S | |
| HAV | 19 | GTTTTGCTCCTCTTTATCATGCTATG | A | 232 |
| | 20 | GGAAATGTCTCAGGTACTTCTTTG | S | |

Table 2
Primer sets for detection of some enteric protozoa

| Protozoan | Primer | Sequence | Length (bp) |
|------------------------|----------|-----------------------|-------------|
| <i>Cryptosporidium</i> | AWA722F | AGTGCTTAAAGCAGGCAACTG | 556 |
| | AWA1235R | CGTTAACGGAATTAACCAGAC | |
| <i>Giardia</i> | MAH658F | AAGTGCCTCAACGAGCAGCT | 171 |
| | MAH789R | TTAGTGCTTTGTGACCATCGA | |

PCR – příklady z literatury

Table 6

Virological and protozoological characteristics of water samples from Meet Fares DWTP

| Sampling sites | No. of samples | <i>Enteric viruses</i> | | | <i>Giardia</i> | | <i>Cryptosporidium</i> | |
|---------------------|----------------|------------------------|------------|-------------|----------------|---------|------------------------|---------|
| | | Counts PFU/L | RT-PCR +ve | Virus types | ME +ve | PCR +ve | ME +ve | PCR +ve |
| Intake | 4 | 75 | 4 | 3EV, INV | 2 | 2 | 2 | 3 |
| After clarification | 4 | 25 | 3 | 3EV | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Floating sludge | 4 | 43.7 | 3 | 3EV | 0 | 0 | 0 | 0 |
| After sedimentation | 4 | 8.3 | 1 | 1EV | 0 | 0 | 0 | 0 |
| After filtration | 3 | 33.3 | 2 | 2EV | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Reservoir | 4 | 0 | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 23 | 185.3 | 13 | 12EV, INV | 2 | 2 | 2 | 3 |

ME = microscopic examination; NV = Norovirus.

- porovnáváno s kultivačním stanovením (pouze enteroviry), mikroskopickou analýzou (prvoci)

qPCR

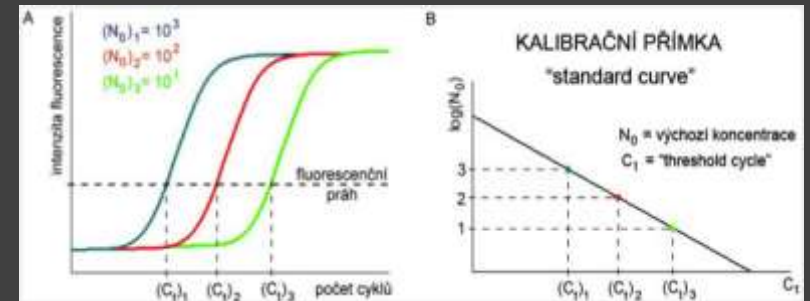
- kvantitativní PCR
- neurčuje množství buněk, ale měří počty kopií genu zájmu
- hlavní přednosti:

rychlost (odpadá detekce PCR produktu)

jednoduchost provedení

přesnost

citlivost



qPCR – příklady z literatury



Available at www.sciencedirect.com
 ScienceDirect
 journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants

Nestor Albinana-Gimenez^{a,c}, Marize P. Miagostovich^b, Byron Calgua^a, Josep M. Huguet^c, Leonard Matia^c, Rosina Girones^{b,*}

^aDepartment of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain
^bLaboratory of Comparative Virology, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
^cAigües de Barcelona, Torre Agbar, Av. Diagonal 211, 08018 Barcelona, Spain

- lidské adenoviry a polyomaviry analyzovány na třech úpravnách vody
- zjištění účinnosti odstranění těchto virů jednotlivými procesy

Table 2 – Human adenoviruses and JC polyomavirus in DWTP 1.

| Sample | Vol. (L) | HADV | | | | JCPyV | | | |
|---------------|----------|------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| | | % Positive | Mean GC/L | Std Dev. | Reduct. ^a | % Positive | Mean GC/L | Std Dev. | Reduct. ^a |
| Raw | 1 | 100 (9/9) | 1.24×10^4 | 1.60×10^4 | – | 44.4 (4/9) | 7.40×10^2 | 1.10×10^3 | – |
| Sand-filtered | 426 | 55.6 (5/9) | 7.02×10^0 | 1.56×10^1 | 3.24 | 22.2 (2/9) | 2.03×10^{-2} | 5.70×10^{-2} | 4.56 |
| Ground water | 796 | 44.4 (4/9) | 2.05×10^0 | 3.87×10^0 | – | 44.4 (4/9) | 1.43×10^0 | 3.82×10^0 | – |
| Ozonated | 508 | 44.4 (4/9) | 8.70×10^0 | 1.58×10^1 | 3.15 | 44.4 (4/9) | 8.24×10^0 | 1.57×10^1 | 1.95 |
| GAC-filtered | 655 | 11.1 (1/9) | 9.10×10^{-2} | 2.37×10^{-1} | 5.13 (>5.13) | 11.1 (1/9) | 2.35×10^{-1} | 7.05×10^{-1} | 3.51 (>4) |
| Finished | 980 | 0 (0/9) | ND | ND | >5.13 | 0 (0/9) | ND | ND | >5 |

ND: Not detected.
 a Accumulative elimination efficiency expressed in log(10). In brackets: potential efficiency without the sporadic positive sample.

Průtoková cytometrie (FCM)

- umožňuje komplexní studium určitých parametrů buněčných populací, např.: velikost, tvar, obsah nukleových kyselin, přítomnost povrchových antigenů, schopnost odrážet či rozptylovat světlo a fluorescenci apod.
- tekutý vzorek prochází přes průtokovou štěrbinu a je osvětlen laserem, částice jsou automaticky detekovány mikroskopem zaostřeným na štěrbinu
- průtokový cytometr schopen analyzovat tisíce buněk ve vzorku během sekundy
- možno kvantifikovat nejen množství mikroorganismů, ale i jejich fyziologický stav



Průtoková cytometrie – příklady z lit.



PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE - PERSPEKTIVNÍ ALTERNATIVA
V ANALÝZE MIKROBIOLOGICKÝCH UKAZATELŮ KVALITY VOD

Přemysl Mikula, Blahoslav Maršálek

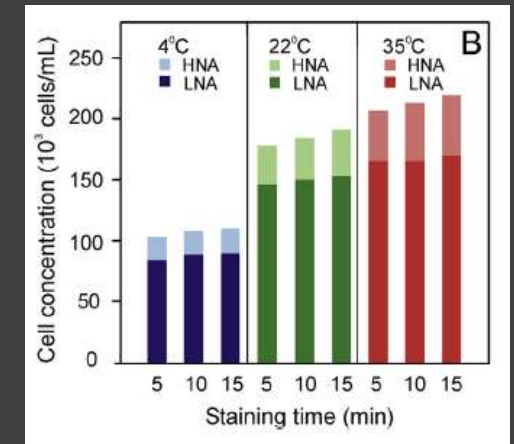
*Botanický ústav AV ČR, v. v. i., oddělení experimentální fykologie a
ekotoxikologie, Lidická 25/27, 602 00 Brno,
premysl.mikula@centrum.cz*

- seznamuje se základními principy FCM, popisuje hlavní přednosti a nedostatky ve srovnání s kultivačními technikami
- metodika pro cytometrické stanovení celkových počtů buněk v pitné vodě - začleněna do švýcarského potravinářského kompendia jako doporučená metoda pro analýzu pitné vody (2012)
- důkaz zájmu využití FCM v technologii vody i v ČR!

Průtoková cytometrie – příklady z lit.



- standardizován postup přípravy a barvení vzorků pro reprodukovatelnost výsledků



- potvrzen potenciál FCM pro monitoring a regulaci bakteriální kvality pitných vod a dále pro včasnou a citlivou on-line detekci změn během úpravy vody či v distribuční síti

VÝHODY/NEVÝHODY vybraných metod

| Metoda | Výhody | Nevýhody |
|------------------|---|--|
| Kultivace | <ul style="list-style-type: none">▪ stanovují se živé kultivovatelné bakterie▪ stanovují se indikátorové organismy v nižších koncentracích (koliformní bakterie a <i>E. coli</i>)▪ kvantitativní analýza | <ul style="list-style-type: none">▪ časová a prostorová náročnost▪ zjistí se přítomnost pouze kultivovatelných mikroorganismů▪ selektivní |
| FCM | <ul style="list-style-type: none">▪ rychlost analýzy (minuty)▪ jednoduchá příprava a vyšetření velkého počtu vzorků▪ potenciálně velmi specifická (pokud jsou k dispozici specifická fluorescenční barviva) | <ul style="list-style-type: none">▪ finanční náročnost (investiční náklady)▪ k obsluze cytometru je zapotřebí školený personál |

VÝHODY/NEVÝHODY vybraných metod

| Metoda | Výhody | Nevýhody |
|------------|--|--|
| PCR | <ul style="list-style-type: none">▪ možnost detekovat i nekultivovatelné organismy▪ rychlé provedení▪ možnost dlouhodobého uchování izolované DNA pro případné opakování analýzy | <ul style="list-style-type: none">▪ neschopnost rozlišit živé/mrtvé buňky▪ falešně negativní výsledek (genetické změny mikroorganismů, inhibitory reakce) |
| ATP | <ul style="list-style-type: none">▪ stanovují se všechny aktivní buňky (i nekultiv.)▪ kvantitativní analýza▪ rychlost analýzy (minuty)▪ jednoduché měření, možné přímo v místě odběru▪ je možné zjistit aktivitu i v malém objemu vzorku | <ul style="list-style-type: none">▪ není specifická▪ výsledky není možné převést na počty buněk▪ není citlivá jako kultivační metody založené na zjištění specifického organismu (koliformní bakterie a <i>E. coli</i>) |

ZÁVĚRY

V SOUČASNÉ DOBĚ NEEXISTUJE METODA, KTERÁ BY SPLŇOVALA PŘEDPOKLADY „IDEÁLNÍ METODY“.

KAŽDÁ METODA MÁ SVÉ VÝHODY A NEVÝHODY.

ZÁVĚRY

- **kultivační metody** jsou úspěšně uznaně a rutinně využívány v provozních a jiných laboratořích pro potřeby kontroly kvality vody
- jejich použití má své opodstatnění zejm. vzhledem k jejich snadnému provádění
- zavedení **alternativních metod** do běžné vodárenské praxe může mít význam ve smyslu každodenního monitoringu kvality vody, popř. ve smyslu kontroly kvality vody v případech, kdy existuje předpoklad či podezření kontaminace pitné vody

CÍLEM DO BUDOUCNA

- vytvoření vhodných a rychlých alternativních detekčních systémů, které by měly reálné využití ve vodárenském provozu
- zapotřebí provést nejen laboratorní testování matric a metod, ale i poloprovozní a provozní on-line testování přímo ve vodárenských organizacích

DĚKUJI ZA POZORNOST

TĚŠÍME SE NA SPOLUPRÁCI