



# Stanovení bakterií rodu *Ralstonia* v čištěné vodě (Aqua purificata)

**Dana Baudišová<sup>1</sup>, Ivana Kohoutová<sup>2</sup>, František Kožíšek<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Státní zdravotní ústav, Praha

<sup>2</sup>Státní ústav pro kontrolu léčiv, Praha

Předložený příspěvek demonstruje výskyt bakterií rodu *Ralstonia* v různých výrobních čištěné vody (Aqua purificata) i v případech, kdy celkové počty aerobních mikroorganismů splňují požadavky Českého lékopisu a zároveň ukazuje na možné rozdíly ve způsobech detekce aerobních organotrofních mikroorganismů (různá média, různý typ inokulace apod.). Výskyt bakterií rodu *Ralstonia* je v čištěné vodě běžný, a přestože tento typ vody nemusí být sterilní, při využití v řadě případů (věk cílové skupiny pacientů, rizikové diagnózy, podání na porušenou kůži či na sliznici) by neměl obsahovat potenciálně patogenní mikroorganismy.

**Klíčová slova:** Aqua purificata, *Ralstonia*, metody detekce, potenciální patogeny.

## Determination of bacteria of the genus *Ralstonia* in purified water (Aqua purificata)

The study focuses on the occurrence of bacteria of the genus *Ralstonia* in various apparatuses producing of purified water (Aqua purificata) even in cases where the total numbers of aerobic microorganisms meet the requirements of the Czech Pharmacopoeia and also shows possible

KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORKY: RNDr. Dana Baudišová, Ph.D., dana.baudisova@szu.cz

Státní zdravotní ústav, Praha

Šrobárova 48/49, 100 10 Praha 10

Cit. zkr: Prakt. lékáren. 2021; 17(e2): e32–e37

Článek přijat redakcí: 22. 1. 2021

Článek přijat k publikaci: 30. 4. 2021



differences in detection methods of aerobic organotrophic microorganisms (media, inoculation). The presence of *Ralstonia* is common in purified water, and although this type of water may not be sterile, it should not contain potentially pathogenic microorganisms when used in specific cases (age of patient, riskful diagnosis, application to damaged skin or mucosa).

**Key words:** Aqua purificata, *Ralstonia*, methods of detection, potential pathogens.

## Úvod

Gramnegativní nefermentující tyčinky jsou velká skupina bakterií, široce rozšířených v nejrůznějším prostředí, mnoho z nich může být i potenciálně patogenních. Díky moderním taxonomickým metodám se tyto bakterie rozčlenily do různých taxonomických skupin, některé nejsou ani fylogeneticky příbuzné. Nicméně díky jejich přesnějšímu zařazení je lze lépe identifikovat a hodnotit jejich význam např. pro zdraví člověka.

*Ralstonia picketii* je gramnegativní bakterie patřící do třídy Betaproteobacteria, řád Burkholderiales. Původně byla na základě fenotypové podobnosti zařazena do rodu *Pseudomonas* (Gamaproteobacteria), posléze do rodu *Burkholderia*. Je striktně aerobní, konečným akceptorem elektronů je výhradně kyslík. Roste v rozmezí 15–42 °C. Kmeny rodu *Ralstonia* běžně žijí v půdě a ve vodě. Jsou však oligokarbofilní a mohou využívat široké spektrum uhlíkových látek. Vody s nízkým obsahem uhlíku jsou tak pro jejich existenci vhodné prostředí. Velmi dobře mohou tvořit biofilmy. Díky těmto vlastnostem se bakterie rodu *Ralstonia* mohou pomnožit právě v systémech, jako jsou zařízení na výrobu (dále jen „výrob-níky“) a skladování čištěné vody.

Bakterie rodu *Ralstonia* bývají původcem nozokomiálních nákaz (1) a závažným zdrojem tohoto typu mikrobiální kontaminace bývají různé typy vod z farmaceutické výroby (2). Požadavky na kvalitu a způsob testo-

vání čištěné vody uvádí Český lékopis (3). V lékopisu je pro nerozplněnou vodu předepsána metoda stanovení „celkového počtu aerobních mikro-organismů“, membránovou filtrací (filtry o porozitě 0,45 µm) s následnou kultivací na agaru R2A, tj. na agaru s nízkým obsahem živin. Sandle (2) na základě svých výsledků doporučuje pro přeočkování kmenů mikroorga-nismů izolovaných z farmaceutických vod o něco více úživný R3A agar. Čištěná voda nemusí být sterilní, pro monitoring je vhodný akční limit aerobních mikroorganismů 100 KTJ/ml. Anglická studie (4), která charak-terizovala mikrobiální společenstvo ve farmaceutických vodách, uvádí, že v čištěné vodě významně převažují zástupci gramnegativních bakterií. Nejčastěji izolované kmeny patřily do rodů *Ralstonia* (30 %) a *Burkholderia* (23 %), nejčastěji izolovaný druh byl *Ralstonia picketii*.

Vzhledem ke všem výše uvedeným vlastnostem bakterií rodu *Ralstonia* byly publikovány studie o jejich možném pomnožení v 0,9% komerčním fyziologickém roztoku, a to za různých teplot (15–42 °C; a schopnost přežití v teplotách 50–60 °C) (5) a též v dialyzačních trubičkách z PVC-C (6). Bylo zjištěno (5), že se počet *R. picketii* (ve studii ještě uvedena jako *Pseudomonas picketii*) během 168 hodin zvýší až o několik řádů. Část inokula přežije i teplotu 60 °C, bakteriální buňky navíc nejsou – vzhledem ke své velikosti a tvaru – kompletně odstraněny filtry o porozitě 0,2 µm. V dialyzačních trubicích i za nízkého obsahu celkového organického uh-

líku (méně než 10 µg/l) došlo k významnému pomnožení *R. picketii*, a to v biofilmech, nikoliv ve formě planktonní – tj. volné (6). Během 48 hodin se počty *R. picketii* zvýšily z hodnoty  $\leq 10$  KTJ/ml na  $2,2 \cdot 10^5$  KTJ/ml s tím, že tyto bakterie musely využívat i přítomný PVC-C jako zdroj uhlíku.

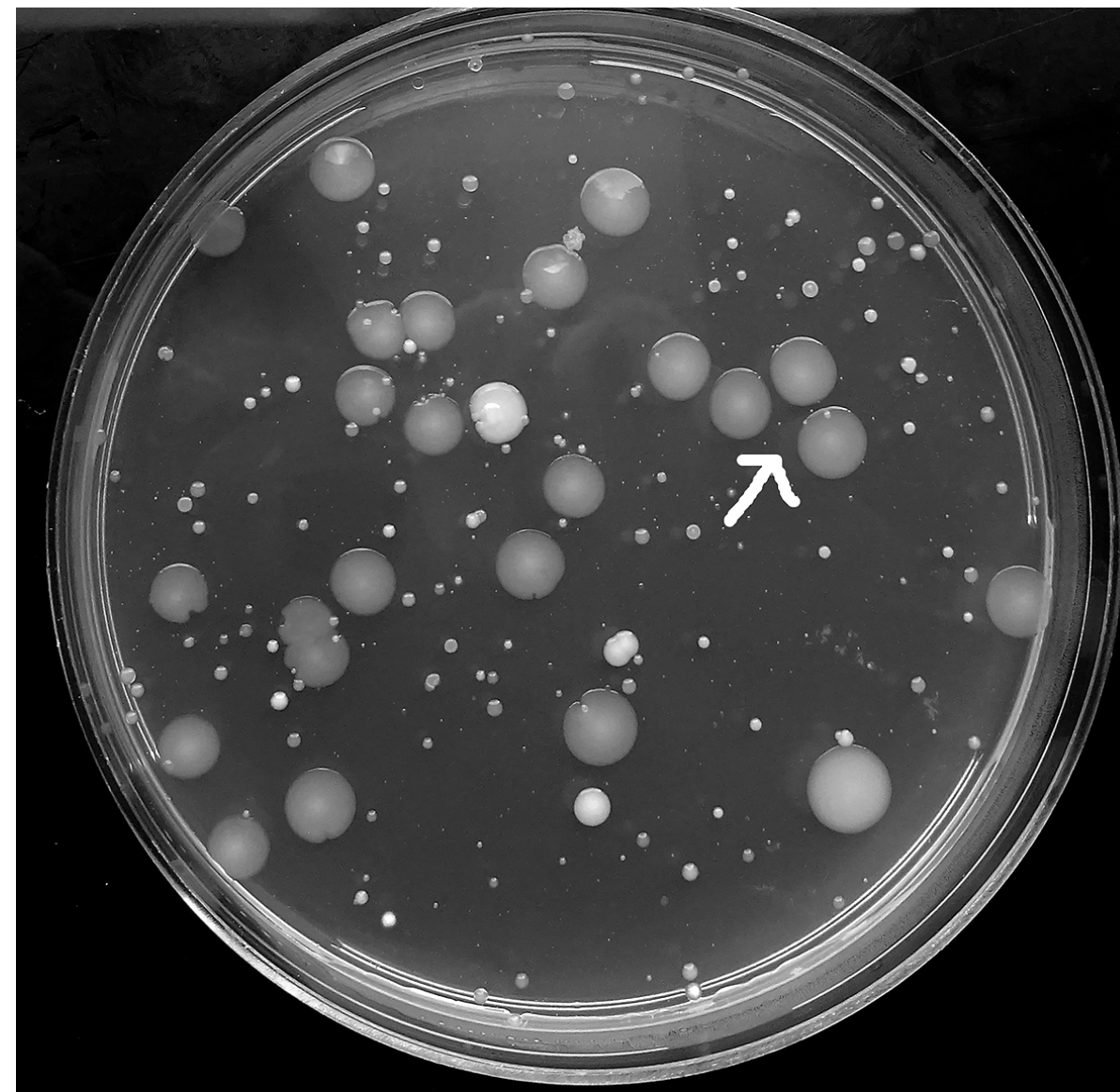
Cílem této práce bylo zjistit výskyt bakterií rodu *Ralstonia* v různých výrobních čištěné vody a ověřit, zda se zde nacházejí i v případech, kdy celkové počty aerobních mikroorganismů splňují požadavky Českého lékopisu (3). Zároveň jsme chtěli ukázat na možné rozdíly ve způsobech detekce aerobních organotrofních mikroorganismů (různá média, různý typ inokulace apod.).

### Metodika

Odběr vzorků byl prováděn z pěti různých výrobníků čištěné vody ve zdravotnických zařízeních s tím, že nejprve byl odebrán „první podíl“, tj. vzorek bez odtočení (100–300 ml, doba stagnace pokud možno 12 hodin), poté bylo provedeno odtočení 2–3 litrů a následně byl odebrán vlastní vzorek čištěné vody (100–300 ml). Vzorky byly ihned za stálého chlazení transportovány do laboratoře a analyzovány do 4 hodin po odběru. Celkem bylo analyzováno 42 vzorků.

Vzorky byly inokulovány jak přímým výsevem na povrch agarového média, tak membránovou filtrací na filtrech o porozitách 0,22 a 0,45 µm. Byla použita tři živná média o různém obsahu živin, a to R2A (Himedia) předepsaný Českým lékopisem (3), o něco více úživný tryptózový agar s kvasničným extraktem TYA (Himedia) předepsaný normou ČSN EN ISO 6222 a vysoce živný krevní agar (Columbia agar, Oxoid). Kultivace probíhala 5–6 dní při 30 °C. Následně byl spočítán celkový počet aerobních bakterií. Nejistota stanovení počtu kolonií se pohybuje okolo 35 %. Vybrané

**Obr. 1.** Růst kolonií na R2A agaru. *Ralstonie* rostou jako větší matné krémové kolonie (šipka)



kolonie byly dále identifikovány metodou MALDI – TOF (matrix assisted laser desorption/ionization) na přístroji Bruker Daltonic MALDI Biotyper. Na základě těchto výsledků byl určen vzhled (tvar, velikost, zbarvení) kolonií rodu *Ralstonia* (*R. picketii*/ *R. indiososa*). Tyto kolonie (tzv. „presump-





tivní *ralstonie*“) byly v každém vzorku spočítány, část byla vždy pomocí MALDI-TOF ověřena, a tak byl zjištěn počet ukazatele *Ralstonia spp.*

### Výsledky a diskuze

Nelze očekávat, že by čištěná voda bez další úpravy (sterilizace např. autoklávováním) byla sterilní. Celkové počty bakterií (včetně významné části, která není kultivovatelná) v pitných vodách, stanovené průtokovou cytometrií, se pohybují v řádech  $10^4$ – $10^5$ /ml. V čištěné vodě (2 vzorky z lokality 2) byly zjištěny podobné hodnoty (průměrná hodnota 65 000/ml; nepubl. výsledky). Výsledky celkového počtu aerobních bakterií a bakterií rodu *Ralstonia* v jednotlivých výrobních jsou uvedeny v tabulce 1. Je uveden aritmetický průměr a hodnota maximální. Procentuální zastoupení *ralstonií* mezi aerobními bakteriemi velmi kolísalo (prakticky od 1 do 100 %), průměrné hodnoty byly 33 % (neodtočená voda) a 36 % (odtočená voda), což je ve shodě s dalšími autory (4).

Limit aerobních bakterií, tj. 100 KTJ/ml, překročily pouze 2 vzorky (cca 10 %) odtočené čištěné vody. Hodnotu 200 KTJ/ml nepřekročil žádný odtočený vzorek. Bakterie rodu *Ralstonia* byly běžně nacházeny ve většině testovaných výrobních čištěné vody, jen jeden výrobek vykazoval pouze negativní výsledky. To mohlo být způsobeno mj. tím, že byl zřejmě nejnovější, resp. nejkratší dobu v provozu. Počty *ralstonií* se v odtočené čištěné vodě pohybovaly od 0 do 60 KTJ/ml. Významně vyšší počty aerobních bakterií, a i *ralstonií*, byly nalezeny v neodtočené čištěné vodě (tzv. 1. podíl, viz tabulka 1), což je ve shodě s výsledky analýz pitné vody (8). V koncové části výrobníku (především v tamních biofilmech) se aerobní bakterie pomnožují a mohou tak sloužit jako zásobárna kmenů potenciálně patogenních bakterií, které se pak podílejí na kolonizaci celého výrobníku.

Většina zachycených kmenů patřila mezi gramnegativní bakterie, což je ve shodě s dalšími autory (4). Kromě druhů, které byly

**Tab. 1.** Výsledky celkového počtu aerobních bakterií v jednotlivých výrobních, které jsou označeny čísly 1–5. Vzorky neodtočené vody (1. podíl) jsou označeny „1. p“ a vzorky odtočené vody i jejich výsledky jsou podbarveny šedě

|  | 1/1.p | 1  | 2/1.p | 2  | 3/1.p | 3   | 4/1.p | 4   | 5/1.p | 5  |
|--|-------|----|-------|----|-------|-----|-------|-----|-------|----|
| Počet vzorků                             | 9     | 9  | 4     | 4  | 3     | 3   | 3     | 3   | 2     | 2  |
| Celkové počty<br>Průměr (KTJ/ml)         | 156   | 16 | 82    | 25 | 182   | 1,3 | 78    | 49  | 38    | 12 |
| Max                                      | 218   | 23 | 180   | 76 | 260   | 3   | 168   | 106 | 58    | 20 |
| <i>Ralstonia spp.</i><br>Průměr (KTJ/ml) | 34    | 3  | 56    | 16 | 0     | 0   | 41    | 36  | 28    | 9  |
| Max                                      | 60    | 10 | 170   | 50 | 0     | 0   | 70    | 100 | 36    | 18 |



identifikovány jako *Ralstonia pickettii* nebo *R. insidiosa*, byly dále identifikovány gramnegativní *Methylobacterium radiotolerans*, *Sphingomonas leydi*, *Burkholderia cepacia* a *B. fungorum*, bakterie rodů *Herbaspirillum*, *Caulobacter*, *Cupriavidus* a *Moraxella*; z grampozitivních bakterií zástupci rodů *Staphylococcus* a *Pseudoarthrobacter*. Kmeny podtržených taxonů jsou aktuálně považovány za potenciální patogeny. Seznam potenciálně patogenních druhů nelze s konečnou platností vytvořit, neboť je jich velmi mnoho a seznam se v souvislosti s rozvíjejícími se metodami identifikace stále rozšiřuje.

Statistické výsledky (Studentův párový T-test, výsledky lineární regrese: korelační koeficient  $R^2$  a hodnota směrnice regresní přímky  $Y$ ) jsou uvedeny v tabulce 2. V případě výsledku T-testu menšího než 0,05 lze vyloučit nulovou hypotézu – soubory tudíž nejsou shodné (v tabulce označeno šedivým podkladem). Metoda daná Českým lékopisem (3) se může měnit jen velmi obtížně, neboť tento předpis je mezinárodní a velmi konzervativní. Při srovnávání výsledků dosažených různými metodami bylo zjištěno, že membránová filtrace zachytí pouze část bakterií oproti přímému výsevu. Norma „ČSN ISO 7704 – Jakost vod. Hodnocení použitelnosti membránových filtrů pro mikrobiologická stanovení“ předepisuje zachyt 80 % buněk membránovými filtry oproti přímému výsevu. Pracuje se však s referenčními kmeny. Přirozené společenstvo může vykazovat zachyt odlišný. Naopak výsledky zachytu na membránových filtrech o různé porozitě (0,45 a 0,22  $\mu\text{m}$ ) se nelišily. Menší porozita filtru by sice mohla teoreticky zachytit více mikroorganismů, dochází však k horšímu kontaktu s médiem, což může zhoršit růst. Statisticky významný rozdíl ve výsledcích nebyl zaznamenán ani v souborech výsledků mikroorganismů vyrostlých na referenčním médiu R2A a médiu TYA, které se používá v mikrobiologii

**Tab. 2.** Statistické výsledky pro jednotlivé metody detekce celkového počtu aerobních bakterií (hodnota T-testu, korelační koeficient  $R^2$  a směrnice regresní přímky  $Y$ ). MF = membránová filtrace; PV = přímý výsev

| Testované metody                             | T-test    | $R^2$  | Hodnota $Y$ |
|--|-----------|--------|-------------|
| Médium R2A: MF 0,45 vers. 0,23 $\mu\text{m}$ | 0,56305   | 0,9339 | 1,0147      |
| Médium R2A: MF 0,45 $\mu\text{m}$ vers. PV   | 0,0000148 | 0,9049 | 1,7199      |
| Média R2A vers. TYA; MF 0,45 $\mu\text{m}$   | 0,617335  | 0,8847 | 0,9423      |
| Média R2A vers. KA; MF 0,45 $\mu\text{m}$    | 0,00448   | 0,8668 | 0,7345      |

vody ke stanovení celkového počtu kultivovatelných mikroorganismů (dle ČSN EN ISO 6222). Odlišné (statisticky významně nižší) výsledky byly zaznamenány mezi výsledky bakterií narostlých na relativně chudém R2A médiu a na živiny vysoce bohatém krevním agaru (KA), což se u bakteriálního společenstva pocházejícího z oligotrofního prostředí čišťené vody dalo předpokládat. Výsledky T-testu byly potvrzeny lineární regresí, a to jak vysokými korelačními koeficienty ( $R^2$ ), tak směrnicí regresní přímky ( $Y$ ).

I na základě těchto výsledků revidoval SÚKL metodický pokyn týkající se doporučené doby použitelnosti léčivých přípravků připravovaných v lékárnách a požadavky na jakost čišťené vody (9).

## Závěr

Přestože výsledky analýz počtu aerobních bakterií v odtočené čišťené vodě většinou splňují požadavky Českého lékopisu (3) pro čišťenou vodu nerozplněnou, tato voda může obsahovat významné množství potenciálně patogenních bakterií (např. *Ralstonia* spp.). Membránová filtrace zachytí pouze část organotrofních bakterií, použití filtrů o menší porozitě



při zkoušce problém neřeší. Vzhledem k tomu, že je povolený limit aerobních bakterií až 100 KTJ/ml, by bylo technicky možné provádět přímý výsev vzorku vody na předsušenou agarovou plotnu. Přesto provedené srovnání metodik nevyznívá ve prospěch změny lékopisné metody.

Při použití nesterilní nerozplněné čištěné vody je však třeba zohlednit i další aspekty (věk cílové skupiny pacientů, rizikové diagnózy, způsob podání apod.). Při zohlednění výše uvedených faktorů je v některých pří-

padech žádoucí vyžadovat přísnější mikrobiologickou kvalitu přípravku, než je obecně požadována lékopisem.

*Poděkování: Vznik příspěvku byl podpořen v rámci MZ ČR – RVO (Státní zdravotní ústav – SZÚ, IČ 75010330). Paní Ing. Milaně Kuklíkové, CSc., děkujeme za technickou pomoc. Děkujeme též všem nemocničním lékárnám, které nám poskytly čištěnou vodu ke studiu.*

## LITERATURA

1. Orlíková H, Prattingerová J, Žemličková H, Melicherčíková V, Urban J, Sochorová M. Bakterémie a sepse způsobené *Ralstonia insidiosa* (*Ralstonia pickettii* – like) u dialyzovaných pacientů v české nemocnici v období leden–květen 2011. Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ, Praha) 2011; 20(8): 290–294.
2. Sandle T. Assessment of the suitability of R3A agar for the subculture of microorganisms isolated from pharmaceutical water systems. *European Journal of Parenteral et Pharmaceutical Sciences* 2014; 19(3): 1–8.
3. Český lékopis 2017 Doplněk 2020 9.4:0008. Aqua purificata.
4. Sandle T. Characterizing the Microbiota of a Pharmaceutical Water System A Metadata Study. *SOJ Microbiol. Infect. Dis* 2015; 3(2): 1–8.
5. Anderson RL, Bland LA, Favero MS, McNeil MM, Davis BJ, Mackel DC, Gravelle CR. Factors Associated with *Pseudomonas pickettii* Intrinsic Contamination of Commercial Respiratory

Therapy Solutions Marketed as Sterile. *Appl. Env. Microbiol.* Dec. 1985: p. 1343–1348.

6. Dombrowsky M, Kirschner A, Sommer R. PVC-piping promotes growth of *Ralstonia pickettii* in dialysis water treatment facilities. *Water Science et Technology* 2013; 68(4): 929–933.

7. ČSN EN ISO 6222 (75 7821): Jakost vod – Stanovení kultivovatelných mikroorganismů – Stanovení počtů kolonií očkovaním do živného agarového média.

8. Baudišová D, Pummann P, Šašek J, Dvořáková A, Kuklíková M. Jaké jsou možné dopady vzorkování pitné vody dle nové legislativy na nálezy organotrofních bakterií? In: *Vodárenská biologie* 2019, 6. a 7. února 2019, Praha. Říhová Ambrožová J., Pecinová A. (eds): 20–24. 2019.

9. LEK-5 verze 9: Doporučené doby použitelnosti léčivých přípravků připravovaných v lékárně a požadavky na jakost čištěné vody. Pokyn Státního ústavu pro kontrolu léčiv s platností od 1. 12. 2019.