



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ-ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ
ΥΓΙΕΙΝΗ

ΘΕΜΑ

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ENTEROLERT ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ISO 7899-2:2001 ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ.

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΜΑΡΙΑ, ΤΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ ΕΠΙΣΚΟΠΟΥ
ΑΠΟΦΟΙΤΗ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟΥ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟΥ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟΥ ΙΔΡΥΜΑΤΟΣ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ.

ΛΑΡΙΣΑ 2015



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ-ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ
ΥΓΙΕΙΝΗ

ΘΕΜΑ

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ENTEROLERT ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ISO 7899-2:2001 ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ.

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΜΑΡΙΑ, ΤΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ ΕΠΙΣΚΟΠΟΥ
ΑΠΟΦΟΙΤΗ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟΥ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟΥ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟΥ ΙΔΡΥΜΑΤΟΣ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΟΥΡΝΑΡΑΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ (Καθηγητής Π.Θ, ΕΠΒΛΕΠΩΝ)

ΧΑΤΖΗΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ ΧΡΗΣΤΟΣ (Καθηγητής Π.Θ)

ΜΠΟΖΙΑΡΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ (Επ. Καθηγητής Π.Θ)

ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ

Στους γονείς μου.

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ENTEROLERT ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ISO 7899-2:2001 ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ.

ΟΡΙΣΜΟΙ

Enterolert- DW Quanti –Tray: είναι μια νέα μέθοδος η οποία είναι βασισμένη στην μέθοδο των πολλαπλών σωλήνων και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και καταμέτρηση των εντεροκόκκων σε πόσιμο νερό.

ISO 7899-2:2001: είναι η παραδοσιακή και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος από τα εργαστήρια για την ανίχνευση και καταμέτρηση των εντεροκόκκων σε νερό ανθρώπινης κατανάλωσης.

Νερό ανθρώπινης κατανάλωσης: σύμφωνα με την οδηγία 98/83/EK, ως νερό ανθρώπινης κατανάλωσης νοείται το νερό, είτε στη φυσική του κατάσταση, είτε μετά από επεξεργασία, που προορίζεται για πόση, μαγείρεμα, παρασκευή τροφής ή άλλες οικιακές χρήσεις, ανεξάρτητα από την προέλευση του και από το αν παρέχεται από το δίκτυο διανομής, βυτίο, ή σε φιάλες, ή δοχεία, καθώς και το νερό που χρησιμοποιείται στις επιχειρήσεις παραγωγής τροφίμων για την παρασκευή, επεξεργασία, συντήρηση ή εμπορία προϊόντων ή ουσιών που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, εκτός εάν οι αρμόδιες εθνικές αρχές κρίνουν ότι η ποιότητα του νερού δεν μπορεί να επηρεάσει την υγιεινή των τροφίμων στην τελική τους μορφή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της εργασίας είναι η συγκριτική μελέτη της μεθόδου Enterolert-DW Quanti-Tray με την μέθοδο αναφοράς ISO 7899-2:2001 ως προς την αποτελεσματική ανάκτηση και καταμέτρηση των Εντεροκόκκων σε δείγματα νερού ανθρώπινης κατανάλωσης. Η πρώτη είναι βασισμένη στην μέθοδο των πολλαπλών σωλήνων και δίνει αποτελέσματα σε ένα εικοσιτετράωρο, ενώ η μέθοδος ISO δίνει αποτελέσματα εντός δύο εικοσιτετράωρων.

Υλικά και μέθοδοι Εξετάστηκαν 72 δείγματα νερού τα οποία συλλέχθηκαν από διάφορες πηγές του Δήμου Δομοκού. Τα δείγματα αρχικά αναλύθηκαν και με τις δύο μεθόδους για την παρουσία εντεροκόκκων. Στη συνέχεια εμβολιάστηκαν με λύματα γνωστής συγκέντρωσης Εντεροκόκκων, ώστε να επιτευχθούν επιθυμητά επίπεδα συγκέντρωσης εντεροκόκκων σε αυτά. Η τελική ταυτοποίηση των στελεχών της νέας μεθόδου έγινε με Maldi-Tof MS.

Αποτελέσματα Από τα 72 δείγματα τα 20 ήταν αρνητικά για παρουσία Εντεροκόκκων και με τις δύο μεθόδους. Μετά τον εμβολιασμό, διαπιστώθηκε ότι τα 61 από τα 72 (ποσοστό 85%) είχαν καλύτερη ανάκτηση με την μέθοδο Enterolert ενώ τα 11 από τα 72 είχαν καλύτερη ανάκτηση με την μέθοδο ISO (ποσοστό 15%).

Συμπεράσματα Συμπερασματικά, η Enterolert φαίνεται να είναι μια νέα πρόταση ανίχνευσης και καταμέτρησης εντεροκόκκων σε δείγματα νερού ανθρώπινης κατανάλωσης για τα εργαστήρια, λόγω της υψηλής της ανάκτησης και της ταχείας έκδοσης αποτελεσμάτων (εντός εικοσιτετράωρου).

DEFINITIONS

Enterolert - DW Quanti - Tray: It is a new method which is based on the method of multiple tubes, used for the detection and enumeration of enterococci in drinking water.

ISO 7899-2: 2001: It is the traditional and widely used method utilized by laboratories for the detection and enumeration of enterococci in drinking water.

Drinking Water : According to Directive 98/83 / EC, the term refers to all the water which is intended for human consumption either in its natural state or after some processing. This water is intended for drinking, cooking, food preparation or other domestic purposes, regardless of its origins or if it is provided by the distribution network, tanker, or in bottles and cans, as well as water used in food industry for production, processing, preservation or marketing of products or substances intended for human consumption, unless the national authorities consider that the quality of the water can not affect the hygiene of the foodstuffs in their finished form.

ABSTRACT

The purpose of this work is the comparative study of Enterolert method - DW Quanti - Tray with the reference method ISO 7899-2: 2001 on the effective recovery and enumeration of Enterococci in samples of drinking water. The first method is based on the multiple tubes and gives results in 24 hours while the ISO method gives results within 48 hours.

Materials and methods 72 water samples were tested, collected from various sources of the Municipality of Domokos. The samples were initially analyzed with the two methods in order to detect the presence of enterococci. Then they were inoculated with known concentration Enterococci wastewater so as to achieve the desired levels of concentration of enterococci in them. The final identification of the strains of the new method was Maldi - Tof MS.

Results Of the 72 samples 20 were negative for the presence of Enterococci after using both methods. After the inoculation, it was found that 61 of the 72 samples (85%) had better recovery with the Enterolert method while 11 out of 72 had better recovery after using the ISO method(15%).

Conclusions In conclusion, the Enterolert seems to be a new method of detection and enumeration of enterococci in drinking water samples for workshops, due to its high recovery and rapid results (within 24hours).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	V
ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	VIII
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ	VIII
1. ΤΟ ΝΕΡΟ	Σελ.1
2.ΔΕΙΚΤΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ	Σελ.2
3. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ	Σελ.3
4. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	Σελ.3
5. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	Σελ.4
5.1 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΙ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΕΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ	Σελ.5
6. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΠΟ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΥΣ	Σελ.6
6.1 ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	Σελ.7
6.2. ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΟ ΔΥΣΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	Σελ.9
7. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ	Σελ.9
8. ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΝΕΡΟΥ	Σελ.10
8.1 ΦΙΑΛΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	Σελ.11
8.2 ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Σελ.12
9. ΟΔΗΓΙΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΝΕΡΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ (ΧΛΩΡΙΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ)	Σελ.12
9.1 ΣΧΕΤΙΚΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ	Σελ.12
9.2 ΤΡΟΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	Σελ.12
9.3 ΟΔΗΓΙΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΝΕΡΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΑΠΟ ΓΕΩΤΡΗΣΕΙΣ. (ΜΗ ΧΛΩΡΙΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ)	Σελ.13
9.4 ΤΡΟΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΑΠΟ ΓΕΩΤΡΗΣΗ Ή ΑΠΟ ΠΗΓΗ.	Σελ.13
10. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	Σελ.14
10.1 ΥΛΙΚΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	Σελ.14
10.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΔΙΑ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ (ISO 7899-2:2001)	Σελ.14
10.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΣΩΛΗΝΩΝ (Enterolert-DW Quanti-Tray)	Σελ.16
11. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ	Σελ.17
12. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΜΕ ΤΙΣ ΔΥΟ ΜΕΘΟΔΟΥΣ	Σελ.19
13. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	Σελ.22
13.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	Σελ.23
13.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑ ISO 17994	Σελ.26
13.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	Σελ.26
13.4 ΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	Σελ.28
14. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	Σελ.30
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	Σελ.32
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	Σελ.36

ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	
Διάγραμμα I: Διάγραμμα διασποράς των κατά ζεύγη μη-λογαριθμημένων μετρήσεων σε δείγματα νερού.	Σελ.26
Διάγραμμα II: Διάγραμμα διασποράς των κατά ζεύγη λογαριθμημένων μετρήσεων σε δείγματα νερού.	Σελ.27

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ	
Πίνακας I : Βάση της αλληλουχίας 16SrRNA, ομάδες με γενετικά συγγενή είδη των Εντεροκόκκων.	Σελ.4
Πίνακας II : Σημαντικότερες δοκιμασίες για τον διαχωρισμό των διάφορων ειδών εντεροκόκκων.	Σελ.6
Πίνακας III: Είδη Εντεροκόκκου και η εντερική τους προέλευση	Σελ.8
Πίνακας IV : Συνιστώμενες και αποδεκτές τιμές για μέγιστο χρόνο αποθήκευσης δειγμάτων συμπεριλαμβανομένου του χρόνου μεταφοράς και θερμοκρασίες.	Σελ.10
Πίνακας V: Θετικά και αρνητικά controls με την μέθοδο Enterolert-DW και με την μέθοδο ISO 7899:2/2001.	Σελ.23
Πίνακας VI: Αποτελέσματα κάθε δείγματος και με τις δύο μεθόδους.	Σελ.24
Πίνακας VII: Συσχέτιση των μετρήσεων.	Σελ.27
Πίνακας VIII: Σχετική διαφορά ανάλυσης μεταξύ των δύο μεθόδων από τα αποτελέσματα των δειγμάτων σύμφωνα με το ISO 17994.	Σελ.28
Πίνακας IX: Έλεγχος κανονικότητας των δεδομένων.	Σελ.29
Πίνακας X: Στατιστικά περιγραφικά μέτρα των λογαριθμημένων μετρήσεων των δυο μεθόδων.	Σελ.29
Πίνακας XI: Σύγκριση των λογαριθμημένων μετρήσεων των δυο μεθόδων.	Σελ.29
Πίνακας XIX: Αποτελέσματα δειγμάτων και με τις δύο μεθόδους.	Σελ.36
Πίνακας XX: Confirmation ISO	Σελ.40
Πίνακας XXX: Confirmation Enterolert-DW	Σελ. 42

1. ΤΟ ΝΕΡΟ

Το νερό είναι απόλυτα συνυφασμένο με την ύπαρξη της ζωής σε όλες τις μορφές. Τόσο το υπόγειο όσο και το επιφανειακό νερό (λίμνες, ποτάμια) χρησιμοποιείται για ανθρώπινη κατανάλωση. Σε σχέση με τον άνθρωπο το 75% του σώματος, το 90% του αίματος και το 85% του εγκεφάλου αποτελούνται από το νερό. Το νερό ο άνθρωπος το προσλαμβάνει από τα υγρά, τις τροφές αλλά και από την δημιουργία ενδογενούς ύδατος από την οξείδωση του υδρογόνου μέσα στο σώμα. Η ημερήσια πρόσληψη σε νερό για τον άνθρωπο κυμαίνεται από 850-2500ml περίπου ανάλογα με τις ανάγκες του και την θερμοκρασία. (Μπούφα Π., 2005)

Το νερό που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση ή για γενική χρήση (μαγείρεμα, παρασκευή τροφής, οικιακή καθαριότητα) δεν πρέπει να περιέχει παθογόνους μικροοργανισμούς ή μικροοργανισμούς δείκτες μόλυνσης με περιττωματικές ουσίες ή συγκεντρώσεις χημικών ουσιών που μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στην υγεία του ανθρώπου.

Ο όρος ποιότητα του νερού χρησιμοποιείται για να περιγράψει φυσικά, χημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά του όσο αναφορά την καταλληλότητα του. Η εκτίμηση της ποιότητας και της καταλληλότητας του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης γίνεται με τις παρακάτω διαδικασίες.

Με την επιτόπια υγειονομική εξέταση: Η οποία γίνεται από εκπαιδευμένο άτομο στην περιοχή της υδροληψίας, ο οποίος εκτιμά τις συνθήκες περιοχής αλλά και την πιθανή ύπαρξη μόλυνσης ή ρύπανσης του νερού. (Μπούφα Π., 2005)

Οργανοληπτικές παράμετροι: Το χρώμα, η γεύση, η οσμή και η θολερότητα είναι παράμετροι που ακόμα και αν το νερό είναι ασφαλές από μικροβιολογική και χημική άποψη δεν είναι αισθητικά αποδεκτό από τον καταναλωτή. (Μπούφα Π., 2005)

Φυσική εξέταση: Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά που ελέγχονται στην φυσική εξέταση είναι η θερμοκρασία η οποία πρέπει να κυμαίνεται από 5-15 βαθμούς κελσίου. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες του κανονικού εκδιώκονται το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) και άλλα σημαντικά αέρια που δίνουν στο νερό την γεύση του. (Μπούφα Π., 2005)

Χημική εξέταση: Βάση της Νομοθεσίας μας η οποία έχει εναρμονιστεί με την Νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης υπάρχουν κάποιες χημικές παράμετροι που κατατάσσονται ως:

A. Απλές χημικές παράμετροι π.χ. Ασβέστιο

B. Ανεπιθύμητες χημικές παράμετροι π.χ. Νιτρικά, Νιτρώδη

Γ. Τοξικές χημικές παράμετροι π.χ. Βαρέα μέταλλα.

Βιολογική έρευνα: Είναι η αναζήτηση πρωτόζωων και αλγών σε νερά ποταμών τα οποία αποθηκεύονται με σκοπό να εκτιμηθεί ο βαθμός ανάπτυξης τους και να προβλεφθεί η κατάλληλη στιγμή για επέμβαση ώστε να μην δημιουργήσουν προβλήματα στο δίκτυο και ούτε να φράξουν φίλτρα π.χ. κάποιου διυλιστηρίου. (Μπούφα Π., 2005)

Μικροβιολογική εξέταση: Οι υδατογενείς επιδημίες προκαλούνται από παθογόνα μικρόβια που έχουν προέλευση την κοπρανώδη μόλυνση του νερού. Οι αναλύσεις για τον έλεγχο αυτών των παθογόνων είναι πολύ χρονοβόρες και πολυέξοδες γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε η ιδέα της ανίχνευσης μικροβίων-δεικτών που είναι ενδεικτικοί ακόμη και της ενδεχόμενης παρουσίας λυμάτων στο νερό. (Μπούφα Π., 2005)

2. ΔΕΙΚΤΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ

Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι δείκτες για τον έλεγχο της μικροβιολογικής ποιότητας του νερού είναι: Τα ολικά κολοβακτηριοειδή, η *E.coli*, οι Εντερόκοκκοι, η ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX) και σε ειδικές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται ως δείκτες το *Cl. perfringens* και η *Ps. aeruginosa*.

Τα ολικά κολοβακτηριοειδή: Όπως και τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή προέρχονται από τα κόπρανα των ανθρώπων και των ζώων αλλά και από το χώμα και τα φυτά. (Γεωργίου.Π., 2005)

Η *E. coli*: Θεωρείται ο βασικός δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης. Αποβάλλεται σε πολύ μεγάλο αριθμό από τα κόπρανα των ανθρώπων αλλά και των ζώων στο περιβάλλον και αποτελεί φυσικό ένοικο της χλωρίδας του εντέρου. Η απομόνωση της από δείγματα νερού, αποδεικνύει πρόσμιξη του νερού με περιττωματικές ουσίες, υποδηλώνοντας ότι και οποιοσδήποτε άλλος μικροοργανισμός που τυχόν βρίσκεται στο έντερο των ανθρώπων και των ζώων μπορεί να εισχωρήσει στο νερό και κατ' επέκταση και παθογόνοι μικροοργανισμοί. (Μπούφα.Π., 2005)

Οι Εντερόκοκκοι: Είναι δείκτες προτίμησης από τους περιττωματικούς στρεπτόκοκκους. Οι εντερόκοκκοι βρίσκονται στην φυσιολογική χλωρίδα του εντέρου του ανθρώπου αλλά και των θερμόαιμων ζώων. Αποβάλλεται από τα κόπρανα και διασπείρεται στο έδαφος, το νερό, τα φυτά και τις τροφές του ανθρώπου. Στα κόπρανα των ανθρώπων οι εντερόκοκκοι δεν υπερβαίνουν τους 10^9 /gr. Η παρουσία τους αποτελεί απόδειξη μόλυνσης του ύδατος με περιττωματικές ουσίες και μάλιστα παλαιότερης μόλυνσης. Ο λόγος αναζήτησης τους είναι για να εκτιμηθεί η σημασία της παρουσίας ολικών κολοβακτηριοειδών επί απουσίας *E. coli* καθώς και η παροχή συμπληρωματικών πληροφοριών για την εκτίμηση της έκτασης πιθανής κοπρανώδους μόλυνσης. (Μπούφα .Π., 2005)

Το *Cl. Perfringens*: Είναι ένα σπορογόνο βακτηρίδιο το οποίο επιζεί σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η παρουσία του σε νερό αποτελεί απόδειξη μόλυνσης και στις περιπτώσεις που δεν ανιχνευθεί η *E. Coli* εκτιμάται πως η μόλυνση είναι παλιά. (Μπούφα .Π., 2005)

Η *Ps. aeruginosa*: Είναι ευκαιριακά παθογόνος μικροοργανισμός και δεν συνιστάται η αναζήτησή του σε επίπεδο ρουτίνας. Βρίσκεται στα κόπρανα των ανθρώπων. Έχει μεγάλη σημασία για τα εμφιαλωμένα νερά, για κολυμβητικές δεξαμενές, spa και για παραγωγή φαρμάκων. (Μπούφα .Π., 2005)

3. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΩΝ

Η ονομασία Εντερόκοκκος (*Enterococcus*) δόθηκε για πρώτη φορά από τον Thiercelin στη Γαλλία το 1899, για να υποδηλώσει την εντερική προέλευση ενός νέου για την εποχή Gram θετικού (Gram +) κόκκου (Thiercelin M.E, 1899). Το 1986 ο Jay αναφέρει ότι ο Escherich υπήρξε ο πρώτος που το 1886 περιέγραψε ένα βακτήριο, που το ονόμασε ‘*Micrococcus ovalis*’ σήμερα αναγνωρισμένο ως *Enterococcus faecalis*.

Με την περιγραφή του Thiercelin, οι Mc Callum και Hastings την ίδια χρονιά (1899) περιέγραψαν μια περίπτωση ενδοκαρδίτιδας η οποία οφείλετο στον *Enterococcus faecalis* ένα βακτήριο το οποίο ήταν ανθεκτικό σε θερμοκρασίες υψηλότερες από εκείνες που ήταν θανατηφόρες για πολλούς μικρόκοκκους. (Breed et al., 1986).

Την ίδια χρονιά οι Mc Callum και Hastings περιέγραψαν την αντοχή του μικροβίου στο καρβοξυλικό οξύ και στο χλωροφόρμιο. Το 1904 ο Houston παρατήρησε την αφθονία εντεροκόκκων στους υπονόμους και διατύπωσε την άποψη ότι θα μπορούσαν να αποτελέσουν χρήσιμο στοιχείο, για τον προσδιορισμό της μόλυνσης του νερού με ανθρώπινα κόπρανα.

Με αυτό τον τρόπο, μέσα στην πρώτη 10ετία του αιώνα, τα περισσότερα από τα χαρακτηριστικά των εντεροκόκκων είχαν περιγραφεί, όπως π.χ. η σχετική αντοχή στα αντιβιοτικά, στην αποξήρανση, στις υψηλές θερμοκρασίες, αλλά και η επιβίωση στο περιβάλλον, η σχέση με το γαστρεντερικό σύστημα και με τη μόλυνση του νερού από κόπρανα καθώς επίσης και η δυνατότητα τους να προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις.

4. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Ο Dible το 1921, πρότεινε σε μια ομάδα στρεπτοκόκκων ανθεκτικών στην θερμότητα που απομονώθηκαν από κόπρανα ανθρώπου να δοθούν τα ονόματα *Streptococcus faecalis* και *Enterococcus*.

Το 1930 η εργασία της Lancefield, εξασφάλισε μια απλή μέθοδο ταξινόμησης των στρεπτοκόκκων. Η κατάταξη των στρεπτοκόκκων με την οροτυπία, αποτέλεσε ένα σπουδαίο μέσο ταξινόμησης από τότε που προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Lancefield το 1933 (Lancefield R.C., 1933).

Οι στρεπτόκοκκοι φέρουν στο κυτταρικό τους τοίχωμα πολυσακχαριδικά αντιγόνα που ονομάζονται C. Η ταξινόμηση της Lancefield αντικατοπτρίζει την « χαρακτηριστική αντιγονικότητα» αυτών των πολυσακχαριδικών αντιγόνων και ορίζονται αλφαβητικά ως A, B, C, D, E κ.λ.π., με λιγότερη έμφαση στα βιοχημικά και φυσικά χαρακτηριστικά.

Σύμφωνα πάντα με την Lancefield, οι περισσότεροι Εντερόκοκκοι εκφράζουν το αντιγόνο D και ορίζονταν ως ομάδα D. Οι όροι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι και εντερόκοκκοι χρησιμοποιήθηκαν ως συνώνυμοι για αρκετά χρόνια.

Ο Kalina το 1970, ήταν ο πρώτος που άρχισε να αμφισβητεί την κατάταξη των εντεροκόκκων στο γένος των στρεπτοκόκκων λόγω της μορφολογίας τους και των αποτελεσμάτων των μελετών του Sherman.

Το 1937, ο Sherman προσπάθησε να ταξινομήσει τους στρεπτοκόκκους με βάση τα χαρακτηριστικά καλλιέργειας τους και αιμόλυσης. Αυτή η ταξινόμηση περιλαμβάνει μια κεντρική ομάδα, που φαίνεται να είναι εντερικής προέλευσης, τους εντερόκοκκους.

Για πολλά χρόνια συνεχίζεται η σύγχυση ανάμεσα σε στρεπτοκόκκους εντερικής προέλευσης και βακτηρίων που ανήκουν στο γένος των εντεροκόκκων. Το 1984 η ταξινόμηση των στρεπτοκόκκων έχει υποστεί ριζική αλλαγή και έχουν χωρισθεί σε 3 γένη: Στρεπτόκοκκος, Εντερόκοκκος και Λακτόκοκκος.

Το 1984 οι Schleifer και Klipper εφάρμοσαν τον υβριδισμό DNA-DNA και διαπίστωσαν πως οι Εντερόκοκκοι έχουν σημαντική ομολογία και είναι ελάχιστα συγγενείς με τους στρεπτοκόκκους ενώ ο *S. faecalis* και ο *S. faecium* αποτελούν ξεχωριστά είδη.

Το 1990 οι Williams εφαρμόζοντας την ανάλυση της αλληλουχίας 16SrRNA, ανακοίνωσαν την ταυτοποίηση των ακολούθων ειδών εντεροκόκκων.

Πίνακας Ι : Βάση της αλληλουχίας 16SrRNA, ομάδες με γενετικά συγγενή είδη των Εντεροκόκκων.

Ομάδα avium	Ομάδα cerorum	Ομάδα faecium	Ομάδα gallinarum	Διαφορετικά Είδη
E. avium E. pseudoavium E. raffinosus E. malodoratus	E. cerorum E. colombae	E. faecium E. durans E. mundii E. hiraе	E. gallinarum E. casseliflavus	E. faecalis E. dispar E. sulfurous E. solitarius E. saccharolyticus E. flavescens

5. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Τα χαρακτηριστικά των εντεροκόκκων είναι αρκετά, έτσι ώστε να τα κάνουν να ταξινομούνται ξεχωριστά από άλλους Gram θετικούς (Gram +) κόκκους καταλάση-αρνητικούς κόκκους.

Οι Εντερόκοκκοι αναπτύσσονται σε αρκετά αντίξοες συνθήκες. Κάποιες από τις ιδιότητες που θα αναφερθούν παρακάτω χρησιμοποιήθηκαν από τον Sherman για την ταξινόμηση τους το 1937. Ανάπτυξη Εντεροκόκκων σε: 0,1% κυανού του μεθυλενίου (bleu de methylene), σε υλικά με 6,5% NaCl ή 40% χολής βόως, σε pH 9,6 και σε θερμοκρασία 10-45 °C.

Τα περισσότερα στελέχη ζουν στην χαμηλή παστερίωση και σε παρατεταμένη κατάψυξη, αναπτύσσονται σε υλικά που περιέχουν ορυκτά άλατα όπως το χλωριούχο βάριο (Laplace et al., 1996), και αντέχουν για πολύ καιρό σε αναερόβιες συνθήκες και σε pH<5.

Σημαντικό κριτήριο φαινοτυπικών διαφορών για την τυποποίηση των εντεροκόκκων είναι η διάσπαση των σακχάρων.

Κάποιες διαφορές των Εντεροκόκκων και των Στρεπτοκόκκων είναι ότι συνήθως, η οξείδωση του υλικού παρουσία γλυκογόνου είναι αρνητική για τους Εντεροκόκκους και θετική για κάποιους Στρεπτοκόκκους, ενώ αντίθετα η διάσπαση της L-αραβινόζης

μπορεί να είναι θετική σε αρκετά είδη Εντεροκόκκων όχι όμως και στους Στρεπτοκόκκους.

Μερικά είδη δεν αναπτύσσονται σε συνθήκες που θεωρούνται απαραίτητες για το γένος π.χ. ο *E. durans*, δεν αναπτύσσεται στους 50 °C όπως ο *E. faecium* (Farrow et al., 1983). Ο *E. dispar* δεν αναπτύσσεται σε 45 °C και οι *E. cecorum* και *E. columbiae* δεν πολλαπλασιάζονται στους 10 °C (Devriese et al., 1993).

5.1 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΙ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΕΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ

Τα κύτταρα του Εντεροκόκκου είναι σφαιρικά ή ωοειδή. Το μέγεθος τους ποικίλλει από 0,6-2μm έως 0,6-2,5μm, δημιουργούν αλυσίδες κοντές ή πιο μακριές και μερικές φορές παρουσιάζονται ως διπλόκοκκοι. Συνήθως είναι ακίνητα δεν διαθέτουν έλυτρο και βλεφαρίδες εκτός των *E. gallinarum* και *E. casseliflavus* που σε ορισμένες συνθήκες είναι κινητά. (Collins et al., 1986).

Οι Εντερόκοκκοι διασπούν ένα μεγάλο αριθμό υδατανθράκων (Πιν 2). Οι Εντερόκοκκοι διαθέτουν ενζυμικό σύστημα ικανό να αντιδράσει με το οξυγόνο (O₂) όπως η οξειδάση του NADH και η οξειδάση της γλυκεροφωσφατάσης που ανιχνεύθηκαν στον *E. faecalis* και στον *E. faecium* το 1962 (Hoskin et al., 1962).

Πίνακας II : Σημαντικότερες δοκιμασίες για τον διαχωρισμό των διάφορων ειδών εντεροκόκκων.

ΕΙΔΟΣ	Αιμόλυση	Bes	6,5% NaCl	Ara	Ado	Man	Lac	Raf	Suc	Sor	Sac
<i>E. faecalis</i>	α,β, καμία	+	+	-	-	+	V/+	-	+	V/+	+
<i>E. faecium</i>	α,β, καμία	+	+	+	-	V/+	+	V/-	V	V	V
<i>E. dispar</i>	α, καμία	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>E. avium</i>	α, καμία	V/+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>E. gallinarum</i>	α, β	+	+	+	-	+	+	V/+	+	V/-	+
<i>E. durans</i>	α, β	+	+	-	-	V/-	+	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>	-	+	+	-	-	-	+	V	V/+	-	+
<i>E. mundii</i>	καμία	+	+	+	-	+	+	V/+	+	V	+
<i>E. pseudoavium</i>	α	V/+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>E. malodoratus</i>	καμία	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Bes= Υδρόλυση εσκουλίνης σε υλικό με χολή,
6,5% NaCl= Ανάπτυξη σε υλικό με NaCl 6,5%

V= Ποικίλλει η αντίδραση
V/+ Συνήθης θετική
V/- Συνήθης αρνητική

Ara= Διάσπαση Αραβινόζης
Ado= Διάσπαση Αδονιτόλης
Man= Διάσπαση Μαννιτόλης
Lac= Διάσπαση Λακτόζης
Raf= Διάσπαση Ραφινόζης
Suc= Διάσπαση Σουκρόζης
Sor= Διάσπαση Σορβιτόλης
Sac= Διάσπαση Σακχαρόζης

6. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΠΟ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΥΣ

Οι Εντερόκοκκοι αποτελούν μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων. Θεωρούνται όμως υπεύθυνοι για σοβαρές νοσοκομειακές λοιμώξεις. Αποτελούν το δεύτερο κατά σειρά συχνότητας αίτιο λοίμωξης χειρουργικών τραυμάτων και νοσοκομειακών ουρολοιμώξεων και το τρίτο αίτιο νοσοκομειακών βακτηριαιμιών στις Η.Π.Α. (Low D.E. et al., 2001) ενώ σχετίζονται με το 5-15% των περιπτώσεων μικροβιακής ενδοκαρδίτιδας, (Donlan R.M. et al., 2002).

Σημαντικό πλεονέκτημα των Εντεροκόκκων για την επιβίωση τους κάτω από περιβαλλοντικό στρες, είναι η φυσική τους δυνατότητα να αποκτούν, να συσσωρεύουν και να διασπείρουν εξωχρωμοσωμικά στοιχεία που κωδικοποιούν λοιμογόνες ιδιότητες ή γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Έτσι εξηγείται η αυξημένη σημασία τους ως νοσοκομειακά παθογόνα.

Οι Εντερόκοκκοι προσβάλλουν κυρίως το ουροποιητικό σύστημα, το ενδοκάρδιο, το αίμα, την κοιλιακή χώρα, τα χοληφόρα, ενώ προκαλούν λοιμώξεις μετά από εγκαύματα και καθετηριασμούς (Elioroulos G.M., 1992).

Οι εντεροκοκκικές βακτηριαίμιες (πρωτοπαθείς ή δευτεροπαθείς) οδηγούν σε σήψη και θάνατο σε ποσοστό που φθάνει ως και 50% (Stoser V. et al., 1998). Συχνά απεικονίζουν τους T σωλήνες (Kehr) και προκαλούν ηπατικές και χολαγγειακές λοιμώξεις σε ασθενείς με μεταμόσχευση ήπατος (Murray, 1990).

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αυξανόμενη συχνότητα απομόνωσης του *E. faecium* από διάφορα κλινικά δείγματα. (Webb M.N. et al., 2001, Torell et al., 2003).

Στα τέλη της δεκαετίας του 1980 έκαναν την εμφάνιση τους στελέχη Εντεροκόκκων ανθεκτικά στις πενικιλίνες, αμινογλυκοσίδες και τα γλυκοπεπτίδια. Η ανθεκτικότητα στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά αποτέλεσε σοβαρό πρόβλημα για την θεραπευτική αντιμετώπιση της λοίμωξης. Τα τελευταία 15 με 20 χρόνια επιταχύνθηκε η αντοχή των Εντεροκόκκων στην βανκομυκίνη. Από νοσοκομειακές βακτηριαίμιες εντεροκόκκων στις ΗΠΑ ανθεκτικοί στην βανκομυκίνη ήταν ένα ποσοστό της τάξεως του 15%. Ο *E. faecium* είναι πιο ανθεκτικός στην βανκομυκίνη από τον *E. faecalis* (Bishof W.E. et al., 1999).

Οι παράγοντες κινδύνου για την απόκτηση ανθεκτικών στελεχών στη βανκομυκίνη είναι: η προηγηθείς χρήση αντιβιοτικών, η διάρκεια παραμονής στο νοσοκομείο και η σοβαρότητα της νόσου.

6.1 ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Η διασπορά των εντεροκόκκων στο περιβάλλον γίνεται με τα κόπρανα των ανθρώπων, των ζώων και τα οικιακά απόβλητα.

Από το πρώτο ήμισυ του αιώνα, ήταν γνωστή η αναγνώριση των Εντεροκόκκων μαζί με τα Κολοβακτηριοειδή (coli-forms) ως δείκτες μόλυνσης των νερών και των τροφίμων. Η επιλογή των Εντεροκόκκων ως δείκτη μόλυνσης του νερού έγινε αργότερα (Buttiaux 1959), αφού τα κόπρανα των ανθρώπων και των χοίρων περιέχουν πάντα Εντεροκόκκους, ενώ το 80-90% των δειγμάτων περιέχει κολοβακτηριοειδή. Από την στοματική κοιλότητα του ανθρώπου εισέρχονται 10^3 βακτήρια ανά gr τροφής, καθώς βρίσκονται στον εντερικό βιότοπο, πολλαπλασιάζονται και αποβάλλονται με τα κόπρανα σε ποσότητες 10^5 - 10^8 (Duncan H.E., et al, 1995). Σε διαδικασίες απολύμανσης η ανθεκτικότητα των Εντεροκόκκων είναι περίπου διπλάσια από εκείνη της *E. coli*. Έχοντας γνώση της πιθανής πηγής των διαφορετικών ειδών Εντεροκόκκων, δίνεται η προοπτική να είμαστε ικανοί να ανιχνεύσουμε τις πηγές μόλυνσης από κόπρανα και να τα διακρίνουμε ανάμεσα στα αποχετευτικά απόβλητα και τη ζωική μόλυνση.

Πίνακας III: Είδη Εντεροκόκκου και η εντερική τους προέλευση.

ΕΙΔΟΣ	ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
<i>E. faecalis</i>	Άνθρωπος, βοοειδή, χοίροι, πτηνά
<i>E. faecium</i>	Άνθρωπος, βοοειδή, χοίροι, πτηνά
<i>E. cecorum</i>	Βοοειδή, χοίροι, πτηνά
<i>E. avium</i>	Άνθρωπος, βοοειδή, χοίροι, πτηνά
<i>E. gallinarum</i>	Άνθρωπος, βοοειδή, χοίροι, πτηνά
<i>E. durans</i>	Άνθρωπος, χοίροι, πτηνά
<i>E. hirae</i>	Άνθρωπος, βοοειδή, χοίροι, πτηνά
<i>E. columbae</i>	Βοοειδή, χοίροι, πτηνά

Τα είδη *E. faecalis* και *E. faecium* είναι αυτά που πιο συχνά απομονώνονται από τον άνθρωπο.

Τα φυτά και το έδαφος αποτελούν υπόστρωμα για τον *E. casseliflavus*, τον *E. mundii* και για τα είδη *E. faecalis* και *E. faecium* (Mundt, 1982).

Βάση κάποιων ιδιοτήτων των Εντεροκόκκων, δηλαδή η ανάπτυξη τους σε ένα μεγάλο φάσμα θερμοκρασιών, η ανθεκτικότητα τους στο αλάτι, η διάσπαση της καζεΐνης και η ζύμωση της λακτόζης, τους κάνουν ικανούς να βρίσκονται σε κάποια σκεύη τα οποία έρχονται σε επαφή με το γάλα και τα παράγωγα του.

Μεγάλο σύγχρονο πρόβλημα αποτελεί η διατήρηση της καλής ποιότητας του νερού και των τροφίμων, για τον λόγο αυτό τα νερά διαφορετικής προέλευσης υπόκεινται με το πέρασμα του χρόνου σε λεπτομερή έλεγχο και μικροβιολογική ανάλυση.

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα που διαθέτουν οι Εντερόκοκκοι ως δείκτες μόλυνσης του νερού από κόπρανα βάση του Ostrolenk το 1947 και του Burton το 1949 είναι ότι:

1. Δεν πολλαπλασιάζονται στο νερό σε αντίθεση, με τα κολοβακτηριοειδή που μερικές φορές πολλαπλασιάζονται.
2. Η συγκέντρωσή τους στα κόπρανα είναι μικρότερη απ' ό,τι τα κολοβακτηριοειδή (ελάχιστη σχέση 1:4) αυτή η σχέση αντανάκλα τη μόλυνση από ανθρώπινα κόπρανα.
3. Ζουν στο υδάτινο περιβάλλον για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα απ' ό,τι τα κολοβακτηριοειδή, δηλώνουν έτσι μια παλιά μόλυνση.

Το 1957, ξεκίνησαν στην Ελλάδα, οι πρώτες μικροβιολογικές εξετάσεις των θαλάσσιων νερών. Η συστηματική τους όμως εξέταση ξεκίνησε το 1962, οπότε συστάθηκε ειδική επιτροπή του Υπουργείου Υγείας με αυτό το αντικείμενο (Παπαπετροπούλου Μ., 1995). Η ρύπανση της θάλασσας μπορεί να προκληθεί είτε από ρίψη λυμάτων είτε απευθείας από τα σώματα των κολυμβητών.

Όλο και πιο επιτακτική έγινε η ανάγκη της χρησιμοποίησης αυτών των μετρήσεων, καθώς με την εξέλιξη της μικροβιολογίας και της επιδημιολογίας επιβεβαιώνονταν οι υποψίες ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της μόλυνσης των θαλάσσιων νερών με κόπρανα και της εμφάνισης διάφορων νόσων στους κολυμβητές.

Η μικροβιακή καταλληλότητα του πόσιμου νερού ελέγχεται με την καταμέτρηση των μικροβιακών δεικτών. Οι δείκτες αυτοί είναι αλλόχθονοι μικροοργανισμοί οι οποίοι περνούν μέσα στο υδάτινο οικοσύστημα, προερχόμενοι συνήθως από τον γαστρεντερικό σωλήνα είτε των ανθρώπων είτε των ζώων.

Σήμερα οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι δείκτες είναι τα ολικά κολοβακτηριοειδή, τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή και οι κοπρανώδεις εντερόκοκκοι.

6.2. ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΟ ΔΥΣΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Μεγάλες αντιστάσεις διαθέτουν οι εντερόκοκκοι έναντι δύσκολων συνθηκών και διακατέχονται από πολύ μεγάλη ανθεκτικότητα από άλλα μεσόφιλα βακτήρια. Οι εντερόκοκκοι εκτός των φυσικών τους αντοχών έχουν την δυνατότητα να αυξάνουν τις αντιστάσεις όταν έρχονται αντιμέτωποι με συνθήκες πίεσης (stress).

Οι παραπάνω αντιστάσεις μπορούν να χαρακτηριστούν ως φαινοτυπική προσαρμογή στις αλλαγές του περιβάλλοντος, η οποία είναι γρήγορη και παροδική.

Το μικροβιακό κύτταρο βρίσκεται σε μια δυναμική κατάσταση και προσαρμόζεται εύκολα στις μεταβολές των περιβαλλοντικών συνθηκών με ανάλογη προσαρμογή των γενετικών και φαινοτυπικών χαρακτήρων του, όπως τροποποίηση της σύνθεσης των ενζύμων του και αλλαγή των πρωτεϊνών της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης. (Harder W. et al., 1983).

Τα πλασμίδια και τα τρανσποζόνια εξασφαλίζουν τα πλεονεκτήματα των εντεροκόκκων να επιβιώνουν σε ασυνήθη περιβάλλοντα.

Οι εντερόκοκκοι είναι βακτήρια που υπάρχουν παντού, από τον εντερικό σωλήνα στο έδαφος, από το νερό ή κόπρανα σε έναν ιστό διασποράς όπου τα βακτήρια εισέρχονται χάρη στις ιδιότητες προσκόλλησης που διαθέτουν. Η ποικιλία των αντιδράσεων των εντεροκόκκων, βρίσκεται πίσω από την μεγάλη διασπορά τους. Κοινό βακτήριο, απειλητικό για τον άνθρωπο, ο εντερόκοκκος, καταλαμβάνει σήμερα μια πρωταρχική θέση στην Μικροβιολογία και την Επιδημιολογία.

7. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

Η απουσία ή η παρουσία μέχρι ενός αριθμού των δεικτών μας διασφαλίζει μέχρι ένα βαθμό την πιθανότητα για την παρουσία παθογόνων.

Η οδηγία 98/83/ΕΕ στο μέρος Α του Παραρτήματος Ι καθορίζει ότι πρέπει να ελέγχονται οι παρακάτω μικροβιακοί δείκτες:

- ✓ Κολοβακτηρίδια κοπράνων (*Escherichia coli*)
- ✓ Εντερόκοκκος

Τα δείγματα πρέπει να δίνουν μηδέν αποικίες ανά δείγμα 100 ml προκειμένου να θεωρούνται κατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση.

Η δειγματοληψία είναι το πρώτο στάδιο το οποίο θα πρέπει να γίνει σωστά για να έχουμε τα σωστά αποτελέσματα στην ανάλυση μας. Οι βρύσες που θα χρησιμοποιηθούν στην συγκεκριμένη έρευνα θα είναι εσωτερικές, σταθερού τύπου και χωρίς φίλτρα από κτιριακές εγκαταστάσεις των καταναλωτών. Θα χρησιμοποιηθούν αποστειρωμένες φιάλες οι οποίες θα περιέχουν θειοθειικό νάτριο για τη δέσμευση υπολειπόμενου χλωρίου.

Η μεταφορά είναι το δεύτερο σημαντικότερο στάδιο, κατά το οποίο τα δείγματα μεταφέρονται σε ειδικά ψυγεία με ιδανική θερμοκρασία $5 - 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, αποφεύγοντας την έκθεση τους στην ηλιακή ακτινοβολία και κάτω από κατάλληλες συνθήκες μεταφοράς.

Ο χρόνος μεταξύ δειγματοληψίας και ανάλυσης στο εργαστήριο, πρέπει να είναι όσο το δυνατόν συντομότερος. Για το πόσιμο νερό θα πρέπει να ξεκινάει η ανάλυση την ίδια ακριβώς ημέρα που έλαβε χώρα και η δειγματοληψία. Σε περίπτωση που αυτό καθίσταται αδύνατο, τα δείγματα θα πρέπει να αναλυθούν εντός 24 h, διάστημα κατά το οποίο θα είναι αποθηκευμένα στους $5 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Πίνακας IV : Συνιστώμενες και αποδεκτές τιμές για μέγιστο χρόνο αποθήκευσης δειγμάτων συμπεριλαμβανομένου του χρόνου μεταφοράς και θερμοκρασίες. (Πηγή:ΚΕΕΛΠΝΟ)

	Μέγιστος χρόνος αποθήκευσης σε h συμπεριλαμβανομένης της μεταφοράς		Θερμοκρασία αποθήκευσης νερού	
	Συνιστώμενες	Αποδεκτές μέγιστες τιμές	Συνιστώμενες	Αποδεκτές
Δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης <i>Enterococci</i>	12h	18h	$5 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$	-

8. ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΝΕΡΟΥ

Η σωστή δειγματοληψία και η ταχεία μεταφορά κάθε δείγματος είναι από τα πιο κρίσιμα σημεία για την λήψη σωστού αποτελέσματος. Ακόμη και η πιο λεπτομερής εξέταση να γίνει στο εργαστήριο, εάν δεν έχει γίνει η σωστή δειγματοληψία και η ταχεία μεταφορά τα αποτελέσματα θα είναι λανθασμένα.

Τρεις είναι οι λόγοι για να λάβει χώρα η δειγματοληψία του νερού:

1. Η συμμόρφωση του νερού με τις προδιαγραφές ποιότητας.
2. Ο χαρακτηρισμός μια μόλυνσης και η έκταση αυτής.
3. Η διαπίστωση της πηγής μόλυνσης.

Οι μικροοργανισμοί που αναζητούνται στα νερά εξαρτώνται από το είδος του δείγματος και από το σκοπό της εξέτασης. Οι βασικότεροι από αυτούς τους μικροοργανισμούς είναι:

Ο ολικός αριθμός μικροοργανισμών που αναπτύσσονται μετά από επώαση στους $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ και στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Τα ολικά κολοβακτηριοειδή.
- Τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή.
- Οι εντερόκοκκοι.
- Οι παθογόνοι σταφυλόκοκκοι.
- Οι σαλμονέλλες
- *Pseudomonas aeruginosa*.
- Μυκοβακτηρίδια.
- Θειοαναγωγικά κλωστηρίδια.
- Άλγες.

- Ζυμομύκητες.
- Παράσιτα.
- Ιοί, βακτηριοφάγοι.
- Λεγεωνέλλες.

8.1 ΦΙΑΛΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

Για την ανάλυση των παραμέτρων που ζητείται κάθε φορά από ένα δείγμα νερού ο όγκος των φιαλών δειγματοληψίας θα πρέπει να είναι επαρκής. Στις περισσότερες περιπτώσεις εξετάζονται λιγότερες από πέντε κατηγορίες μικροοργανισμών, κάθε μια από τις οποίες συνήθως απαιτείται διήθηση και εμβολιασμός 100ml, έτσι με αυτόν τον τρόπο οι φιάλες που είναι επαρκείς σε μια τέτοια περίπτωση είναι χωρητικότητας 1000ml.

Για να χρησιμοποιηθούν οι φιάλες δειγματοληψίας θα πρέπει να είναι καθαρές και αποστειρωμένες. Εάν είναι φιάλες επαναχρησιμοποίησης τότε θα πρέπει αυτές και τα πώματα τους να καθαρίζονται με μη τοξικά, ελεύθερα φωσφόρου απορρυπαντικά και το ξέπλυμα τους να γίνεται με απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό. Η αποστείρωση των φιαλών αυτών γίνεται στο αυτόκαυστο στους $121\text{ }^{\circ}\text{C} +3\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 15 min περίπου. Στο αυτόκαυστο μπορούν να αποστειρωθούν τόσο οι γυάλινες με πλαστικό πώμα όσο και αυτές οι φιάλες με το εσφυρισμένο πώμα.

Για την εξουδετέρωση των απολυμαντικών ουσιών του νερού πρέπει να προσθέσουμε στις φιάλες ένα αναγωγικό μέσο πριν την αποστείρωση τους το οποίο δεν καταστρέφεται με την διαδικασία της αποστείρωσης. Το μέσο που χρησιμοποιείται συνήθως είναι το θειοθειϊκό νάτριο ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

Για το πόσιμο νερό χρησιμοποιούμε 0,60 ml διαλύματος θειοθειϊκού νατρίου ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 3 gr/dl ανά 1 L νερού που θα συλλέξουμε δηλαδή 18 mg θειοθειϊκού νατρίου ανά 1 L νερού.

Το Εργαστήριο το οποίο θα μας παραχωρήσει τις φιάλες δειγματοληψίας έχει και την ευθύνη της στείρας τους. Ο έλεγχος της στείρας μπορεί να γίνει τοποθετώντας υπό άσηπτες συνθήκες 20-50ml στείρου θειογλυκολικού ζωμού, στριφογυρνώντας την φιάλη με σκοπό να βραχούν τα τοιχώματα. Στην συνέχεια, την επωάζουμε στους $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ για πέντε ημέρες και παρατηρούμε τα αποτελέσματα. Εάν ο ζωμός δεν θολώσει σημαίνει πως οι φιάλες μας είναι στείρες και έτοιμες για χρήση.

8.2 ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Ο χρόνος μεταξύ της δειγματοληψίας και της ανάλυσης στο εργαστήριο πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος. Τα πόσιμα νερά πρέπει να αναλύονται μέσα σε 24 ώρες.

Κατά την διάρκεια της μεταφοράς των δειγμάτων σε φορητά ισόθερμα δοχεία θα πρέπει να φροντίζουμε να μην καταψύχονται εκτός βέβαια αν πρόκειται για ιούς, αλλά να διατηρούνται υπό ψύξη στους $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Σε αυτό που πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή κατά την μεταφορά των δειγμάτων είναι οι παγοκύστες να μην έρχονται σε άμεση επαφή με τα δείγματα γιατί μπορεί να προκαλέσουν stress στους μικροοργανισμούς και με αυτό τον τρόπο κατά την ανάλυση να έχουμε ψευδή αποτελέσματα.

Η καθυστέρηση μεταξύ της δειγματοληψίας και της εργαστηριακής ανάλυσης περιλαμβάνει μεταφορά, καταχώρηση και διαδικασίες στο εργαστήριο. Οι δειγματολήπτες και οι αναλυτές πρέπει να συνεργάζονται όσο το δυνατόν καλύτερα έτσι ώστε ο αριθμός των δειγμάτων που θα μείνει να αναλυθεί μετά από 24 ώρες από την ώρα της δειγματοληψίας θα πρέπει να είναι ο ελάχιστος δυνατός.

9. ΟΔΗΓΙΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΝΕΡΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ (ΧΛΩΡΙΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ)

9.1 ΣΧΕΤΙΚΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

1. ΚΥΑ Υ2/2600/2001 (ΦΕΚ 892/τ.β'/ 11.7.2001) « Ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης», σε συμμόρφωση προς την Οδηγία 98/83/ΕΚ του Συμβουλίου της Ευρωπαϊκής Ένωσης της 3^{ης} Νοεμβρίου του 1998 (ισχύει από 25.12.2003).

9.2 ΤΡΟΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

- Χρησιμοποιούμε φιάλες οι οποίες ανάλογα με την ποσότητα που θέλουμε να συλλέξουμε έχουν και την ανάλογη ποσότητα θειοθειϊκού νατρίου για την δέσμευση και εξουδετέρωση του υπολλειματικού χλωρίου.
- Τοποθέτηση ετικέτας σε κάθε δείγμα με τα χαρακτηριστικά του.
- Συντάσσουμε το δελτίο Δειγματοληψίας.
- Από την βρύση που θέλουμε να πάρουμε δείγμα νερού εάν έχει φίλτρα, γάζες, βαμβάκι κ.τ.λ. τα αφαιρούμε.
- Για την απολύμανση της βρύσης καίμε φλόγιστρο ή με αναπτήρα το ρύγχος της.
- Ανοίγουμε τέρμα την βρύση και την αφήνουμε να τρέξει για 2-3 min.

- Περιορίζουμε την ροή της βρύσης, ξεβιδώνουμε το πώμα της φιάλης διατηρώντας το στείρο.
- Συλλέγουμε το νερό στη φιάλη αφήνοντας περίπου 10% του όγκου της κενό, ώστε να διευκολύνεται η καλή ανάμειξη του νερού.
- Πωματίζουμε την φιάλη και καλύπτουμε το πώμα με αλουμινόχαρτο ή λαδόκολλα.
- Τοποθετούμε την φιάλη στο ισόθερμο δοχείο με τις προκαταψυγμένες παγοκύστες και το μεταφέρουμε το συντομότερο δυνατόν στο Εργαστήριο για ανάλυση.

9.3 ΟΔΗΓΙΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΝΕΡΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΑΠΟ ΓΕΩΤΡΗΣΕΙΣ. (ΜΗ ΧΛΩΡΙΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ)

Η ανάλυση του νερού από κοινοτικές ή ιδιωτικές γεωτρήσεις και πηγάδια γίνεται συνήθως για δύο διαφορετικούς σκοπούς:

1. Για τον έλεγχο της ποιότητας του νερού της υπόγειας στάθμης, όπου σε αυτή την περίπτωση είναι απαραίτητη η εκτεταμένη άντληση, για να αντικατασταθεί το νερό στη γεώτρηση ή στο πηγάδι από το υπόγειο νερό πριν την δειγματοληψία και
2. Για τον έλεγχο της ποιότητας του νερού όπως αυτή χρησιμοποιείται, όπου σε αυτή την περίπτωση το δείγμα λαμβάνεται από την αντλία χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη φιάλη.

9.4 ΤΡΟΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΑΠΟ ΓΕΩΤΡΗΣΗ Ή ΑΠΟ ΠΗΓΗ.

- Χρησιμοποιούμε φιάλες που δεν περιέχουν διάλυμα θειοθειϊκού νατρίου.
- Τοποθέτηση ετικέτας σε κάθε δείγμα με τα χαρακτηριστικά του.
- Συντάσσουμε το δελτίο Δειγματοληψίας.
- Αφαιρούμε με προσοχή το πώμα της φιάλης και το διατηρούμε στείρο.
- Για δειγματοληψία από πηγάδι πιάνουμε την ανοιχτή φιάλη από τη βάση της και τη βυθίζουμε κάτω από την επιφάνεια του νερού, 20 cm περίπου.
- Εάν πρόκειται για γεώτρηση η οποία έχει ηλεκτροκίνητη αντλία, αφήνουμε την αντλία να λειτουργεί επί 3-4 λεπτά και μετά παίρνουμε το δείγμα.
- Συλλέγουμε το νερό στη φιάλη αφήνοντας περίπου 10% του όγκου της κενό, ώστε να διευκολύνεται η καλή ανάμειξη του νερού.
- Πωματίζουμε την φιάλη και καλύπτουμε το πώμα με αλουμινόχαρτο ή λαδόκολλα.
- Τοποθετούμε την φιάλη στο ισόθερμο δοχείο με τις προκαταψυγμένες παγοκύστες και το μεταφέρουμε το συντομότερο δυνατόν στο Εργαστήριο για ανάλυση.

10. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

10.1 ΥΛΙΚΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην παρούσα συγκριτική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα νερού ανθρώπινης κατανάλωσης από τον Δήμο Δομοκού του Ν. Φθιώτιδας, τα οποία αναλύθηκαν για την ανίχνευση και καταμέτρηση Εντεροκόκκων με την μέθοδο ISO 7899-2:2001 και με την Enterolert-DW Quanti-Tray (μέθοδος πολλαπλών σωλήνων).

Από τον Απρίλιο έως τον Δεκέμβριο του 2014 συλλέχθηκαν 72 δείγματα από τα οποία τα 40 δείγματα είναι από πηγές, τα 15 δείγματα είναι δικτύου και 17 δείγματα είναι γεωτρήσεων.

Η επιλογή των πηγών και των γεωτρήσεων έγινε με τυχαία δειγματοληψία. Όλα τα μπουκάλια συλλογής νερού ήταν αποστειρωμένα και κάποια από αυτά περιείχαν θειοθειικό νάτριο για την λήψη δειγμάτων νερού από δίκτυο. Μεταφέρθηκαν με ισόθερμα ψυγεία και εντός αυτών υπήρχαν παγοκύστες για την διατήρηση της σωστής θερμοκρασίας.

Σε όλα τα δείγματα έγινε προσεχτική δειγματοληψία αποφεύγοντας την υπερχειλίση και την επιμόλυνση του δείγματος μας. Στη συνέχεια, τα ισόθερμα ψυγεία με τα δείγματα στάλθηκαν στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την εκτέλεση των απαραίτητων εργαστηριακών δοκιμών.

10.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΗΘΗΣΗΣ ΔΙΑ MEMBRANΗΣ (ISO 7899-2:2001)

Ικανή ποσότητα νερού διηθείται διαμέσου μεμβράνης κατασκευασμένης συνήθως από εστέρες κυτταρίνης ή νάilon με διάμετρο πόρων από 0,2-0,45μm για κατακρατεί τους μικροοργανισμούς όπου θέλουμε να μελετήσουμε.

Για την συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν 100ml δείγματος νερού.

Στην παρούσα μελέτη για την απομόνωση των Εντεροκόκκων χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη από εστέρες κυτταρίνης με διάμετρο 0,45μm.

ΥΛΙΚΑ-ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ:

- Αποστειρωμένες φιάλες
- Ισόθερμα δοχεία
- Προκαταψυγμένες παγοκύστες
- Συσκευές διήθησης
- Θρεπτικό υλικό Slanetz and Bartley, το οποίο είναι ένα εκλεκτικό θρεπτικό υλικό με την εξής σύσταση:

Tryptose	20.0g
Yeast Extract	5.0g
Glucose	2.0g
Dipotassium phosphate	
K ₂ HPO ₄	4.0g
Sodium-azide NaN ₃	0.4g
2,3,5- Triphenyl tetrazolium chloride	0.1g
Agar	10.0g
Distilled Water	1L
Τελικό pH	7.2

Διαλύονται 42g σε 1L απεσταγμένου νερού βράζονται μέχρι να διαλυθούν εντελώς. Μοιράζονται σε τρυβλία Petri.

- Θρεπτικό υλικό Bile esculin-azide agar του οποίου η σύσταση του είναι:

Peptone	5.0g
Beef Extract εκχύλισμα κρέατος	3.0g
Ταυροχολικό νάτριο	40.0g
Κιτρικός σίδηρος	0.5g
Εσκουλίνη	1.0g
Άγαρ	15.0g
Απεσταγμένο νερό	1000 ml

Τα συστατικά του διαλύονται στο στείρο νερό και ακολουθεί ελαφριά θέρμανση και ανάμιξη. Στην συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της αποστείρωσης σε αυτόκαυστο για 15 min στους 121 °C. Έπειτα μοιράζονται σε τρυβλία Petri.

ΜΕΘΟΔΟΣ

Για την λήψη των δειγμάτων χρησιμοποιούνται αποστειρωμένες φιάλες. Εάν το νερό είναι χλωριωμένο χρησιμοποιούνται φιάλες στις οποίες έχει προστεθείθειοθειϊκό νάτριο (Na₂S₂O₃) για να εξουδετερώσει το υπολειμματικό χλώριο.

Με τη μέθοδο διήθησης δια μεμβράνης χρειαζόμαστε ικανή ποσότητα νερού συνήθως >250ml. Η ποσότητα του νερού συνήθως υπολογίζεται ανάλογα με τις παραμέτρους που θέλουμε κάθε φορά να αναλύσουμε σε κάθε δείγμα αλλά και με το είδος του δείγματος.

Η μεμβράνη τοποθετείται σε θρεπτικό υλικό Slanetz & Bartley. Τα τρυβλία επώζονται στους 37°C για 48h. Μετά την επώαση οι ύποπτες αποικίες είναι χρώματος κόκκινου, βυσσινί και ροζ.

Στην συνέχεια ακολουθούν επιβεβαιωτικές διαδικασίες μεταφέροντας με προσοχή την μεμβράνη με την βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας από το Slanetz & Bartley στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Bile esculin-azide agar και επώαση στους 44 °C για 2 h.

Η υδρόλυση της εσκουλίνης υποδηλώνεται με την παρουσία καστανοκίτρινου έως μαύρου χρώματος με δακτύλιο κάτω από την αποικία λόγω της υδρόλυσης που κάνουν οι Εντεροκόκκοι.

10.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΣΩΛΗΝΩΝ (Enterolert-DW Quanti-Tray)

Η μέθοδος Enterolert-DW Quanti-Tray χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και καταμέτρηση εντεροκόκκων στον νερό ανθρώπινης κατανάλωσης. Η μέθοδος, είναι βασισμένη σε μια παλιά μέθοδο, αυτή των πολλαπλών σωλήνων. Η Enterolert-DW Quanti-Tray ανιχνεύει τους Εντεροκόκκους με ανίχνευση ενός διαγνωστικού ενζύμου για αυτά τα βακτήρια, ενώ αναστέλλει την ανάπτυξη άλλων βακτηριδίων. Η συγκεκριμένη μέθοδος δίνει αποτελέσματα μέσα σε 24 h. (www.idexx.com)

ΥΛΙΚΑ-ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ:

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν λύματα από τον βιολογικό καθαρισμό του Δήμου Λάρισας έτσι ώστε μετά από επεξεργασία και μετρήσεις του δείγματος των λυμάτων να πετύχουμε να έχουμε διαφορετικές αλλά ταυτόχρονα γνωστές συγκεντρώσεις Εντεροκόκκων.

- Αποστειρωμένες φιάλες
- Ισόθερμα δοχεία
- Προκαταψυγμένες παγοκύστες
- Αιματούχο θρεπτικό υπόστρωμα (Sheep Blood agar) για την απομόνωση παθογόνων μικροοργανισμών του οποίου η σύσταση είναι:

Hearth extract and peptones	20,0 gr/l
Sodium chloride	5,0 gr/l
Agar-agar	15,0 gr/l
Sheep blood	52,0 gr/l

Τα συστατικά του διαλύονται στο στείρο νερό και ακολουθεί ελαφριά θέρμανση και ανάμιξη. Στην συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της αποστείρωσης σε αυτόκαυστο για 15 min στους 121 °C. Έπειτα μοιράζονται σε τρυβλία Petri. Το θρεπτικό υπόστρωμα διατίθεται έτοιμο στο εμπόριο.

- Γλυκερόλες
- Πιπέτες του 1ml και των 100μl
- Αποστειρωμένες σύριγγες των 5ml
- Ειδικά αποστειρωμένα δοχεία των 100ml.
- Αντιδραστήριο Enterolert-DW (άγνωστων συστατικών)
- Ειδικές αποστειρωμένες σακούλες Quanti-tray/2000s (οι οποίες στο εσωτερικό τους έχουν κάποιο θρεπτικό υπόστρωμα άγνωστο προς εμάς).
- Ειδικές θήκες Quanti-tray (στις οποίες τοποθετούνται οι σακούλες με το δείγμα)
- Συσκευή Enterolert-DW: Είναι μια συσκευή κατά την οποία γίνεται μια διαδικασία θερμοκόλλησης της σακούλας που περνάει μέσα από αυτή και δεν αφήνει το δείγμα να χυθεί.
- Maldi-Tof Ms

ΜΕΘΟΔΟΣ

Για την λήψη των δειγμάτων χρησιμοποιούνται αποστειρωμένες φιάλες. Εάν το νερό είναι χλωριωμένο χρησιμοποιούνται φιάλες στις οποίες έχει προστεθεί θειοθειϊκό νάτριο ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) για να εξουδετερώσει το υπολειμματικό χλώριο.

Με την μέθοδο Enterolert-DW η ποσότητα νερού που χρειαζόμαστε είναι 250 ml.

100 ml δείγματος νερού τοποθετούνται στα ειδικά αποστειρωμένα δοχεία. Στην συνέχεια ρίχνουμε μέσα στο δοχείο το αντιδραστήριο Enterolert-DW το οποίο είναι σε μορφή σκόνης. Γίνεται πολύ καλή ανάδευση ώστε να ομογενοποιηθεί το δείγμα με το αντιδραστήριο. Το δείγμα παίρνει ένα χρώμα μπλε.

Το δείγμα μπαίνει στις ειδικές σακούλες Quanti-tray/2000s, οι οποίες στην συνέχεια τοποθετούνται στις ειδικές θήκες.

Οι θήκες Quanti-tray τοποθετούνται στην υποδοχή της συσκευής Enterolert-DW όπου λαμβάνει χώρα μια διαδικασία θερμοκόλλησης η οποία δεν αφήνει ελεύθερο το δείγμα να χυθεί.

Ακολουθεί η αρίθμηση της κάθε σακούλας και επώαση στους 41°C για 24 h.

Όταν οι Εντερόκοκκοι είναι παρόντες σε ένα δείγμα νερού το χρώμα του θεραπευτικού μέσου από μπλε μετατρέπεται σε πράσινο. Ο αριθμός των θετικών πηγαδιών αντιστοιχεί σε μια γνωστή συγκέντρωση εντεροκόκκων στο αρχικό δείγμα.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στις κυψελίδες πράσινου χρώματος της σακούλας Enterolert, υπό άσηπτες συνθήκες λαμβάνεται δείγμα με αποστειρωμένη σύριγγα από το πράσινο υπόστρωμα και ανακαλλιεργείται σε αιματούχο άγαρ με ερυθρά προβάτου. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 24 h. Την επόμενη ημέρα ελέγχεται αν αναπτύχθηκαν αποικίες.

Οι αποικίες που αναπτύχθηκαν ταυτοποιούνται στο MALDI-ToF MS (Αυτόματο σύστημα ταυτοποίησης μικροοργανισμών με φασματογραφία μάζας).

11. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Μια μέρα πριν από την δειγματοληψία γίνεται παραλαβή αποβλήτων από τον βιολογικό του Δήμου Λάρισας και ξεκινάει η επεξεργασία του για την καταμέτρηση των εντεροκόκκων που περιέχει.

Σε μια κωνική φιάλη των 2 L διηθούμε απόβλητα με την βοήθεια διηθητικού χαρτιού και αντλίας κενού. Στόχος είναι να παραλάβουμε 1 L φιλτραρισμένων αποβλήτων. (Σε κάθε 250 ή 500 ml την φορά γίνεται αλλαγή του φίλτρου).

Σε 10 δοχεία των 100 ml γίνεται η αρίθμηση -2, -3, -4, -5 και -6. Σε κάθε δοχείο τοποθετούνται 100ml στείρου νερού (WFI) το οποίο ογκομετρείται πρώτα σε ογκομετρικό κύλινδρο για περισσότερη ακρίβεια και ύστερα τοποθετείται στα αριθμημένα δοχεία. Σε κάθε δοχείο ρίχνουμε το αντιδραστήριο Enterolert-DW και αναδεύουμε καλά μέχρι να διαλυθεί το αντιδραστήριο εντελώς. Στην συνέχεια, από τα φιλτραρισμένα απόβλητα ακολουθεί μια διαδικασία αραιώσεων με την βοήθεια πιπέτας των 100μl και 1ml. Η αραιώση γίνεται ως εξής:

- Παίρνουμε 1ml από τα απόβλητα και τοποθετούμε στο δοχείο με αρίθμηση -2
- Παίρνουμε 100ml από τα απόβλητα και τοποθετούμε στο δοχείο με αρίθμηση -3
- Παίρνουμε 1 ml από το δοχείο -2 και τοποθετούμε στο δοχείο με αρίθμηση -4
- Παίρνουμε 1 ml από το δοχείο -3 και τοποθετούμε στο δοχείο με αρίθμηση -5
- Παίρνουμε 1 ml από το δοχείο -4 και τοποθετούμε στο δοχείο με αρίθμηση -6



Εικόνα 1: Αντιδραστήριο Enterolert-DW.



Εικόνα 2: Δείγμα νερού μετά την χρήση του αντιδραστηρίου Enterolert-DW.

Μετά την διαδικασία των αραιώσεων γίνεται πάλι καλή ανάδευση του κάθε δοχείου για να πετύχουμε την καλύτερη ομογενοποίηση του κάθε δείγματος. Λαμβάνει χώρα στην συνέχεια η διαδικασία του γεμίσματος των σακούλων Quanti-tray/2000s οι οποίες αριθμούνται με τον ίδιο τρόπο όπου αριθμούνται και τα δοχεία και γίνεται το αντίστοιχο γέμισμα. Αφού γεμίσαμε τις σακούλες Quanti-tray/2000s στην συνέχεια τις τοποθετούμε στις ειδικές θήκες Quanti-tray/2000s και στη συσκευή Enterolert για την διαδικασία της θερμοκόλλησης της κάθε σακούλας. Τέλος ακολουθεί η επώαση στους 41 °C για 24 h.

Την επόμενη ημέρα γίνεται η διαδικασία της καταμέτρησης και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης εντεροκόκκων στο δείγμα. Η τιμή που έχει βγάλει το -2 δείγμα τοποθετείται στον τύπο:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Όπου C_1 = Συγκέντρωση που θέλουμε να πετύχουμε σε κάθε δείγμα

V_1 = Όγκος νερού κάθε δείγματος

C_2 = Συγκέντρωση που έχουμε βγάλει από την -2 αραιώση (με την μέθοδο Enterolert)

V_2 = Όγκος λύματος που θα χρειαστεί να μπει σε κάθε δείγμα ανάλυσης.

12. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΜΕ ΤΙΣ ΔΥΟ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

1^η ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ

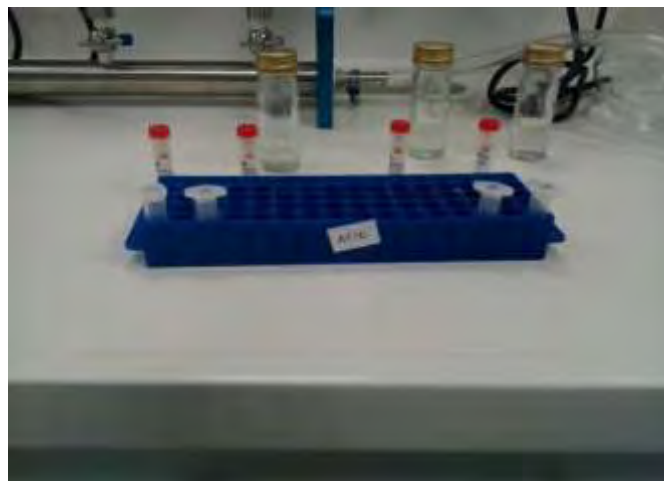
Παράλληλα με την ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιείται και έλεγχος θετικών και αρνητικών προτύπων δείγματος ελέγχου (control) και με τις δύο μεθόδους.

ΑΡΝΗΤΙΚΑ CONTROL

Και στις μεθόδους αντί για δείγμα νερού εμβολιάζουμε στείρο νερό ίσου όγκου με τον όγκο των αναλυόμενων δειγμάτων και τα αναμενόμενα αποτελέσματα πρέπει να είναι μηδενικά.

ΘΕΤΙΚΑ CONTROL

Σε δύο eppendorf τοποθετείται από 1ml MRD και στο καθένα από αυτά από 1 χαπάκι Lenticules (στελέχη εντεροκόκκων γνωστής συγκέντρωσης από 44-210 cfu). Το διάλυμα αυτό τοποθετείται σε στείρο νερό ίσου όγκου με τον όγκο των αναλυόμενων δειγμάτων και χρησιμοποιείται και για τις δύο μεθόδους. Τα αποτελέσματα πρέπει να είναι επιβεβαιωμένοι Εντερόκοκκοι σε συγκεκριμένη συγκέντρωση που να περιέχεται εντός των προκαθορισμένων ορίων των Lenticule.



Εικόνα 3: Διαδικασία θετικών control.

Όταν φθάσουν τα δείγματα στο εργαστήριο αυτά που προέρχονται από το δίκτυο περνούν από μια διαδικασία χημικών μετρήσεων για τον υπολογισμό του υπολειμματικού χλωρίου. (Η τιμή που θα πρέπει να μας δίνει είναι πάντα 0,00).

Στην συνέχεια κάθε δείγμα ποσότητας 250 ml εμβολιάζεται με την αντίστοιχη ποσότητα λύματος που έχει υπολογιστεί από τον παραπάνω τύπο. Γίνεται καλή ανάδευση κάθε δείγματος για την σωστή ομογενοποίηση του.

Για την μέθοδο ISO χρειαζόμαστε 100 ml δείγματος για διήθηση μέσω μεμβράνης πόρου 0,45 μm . Τοποθέτηση της μεμβράνης σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα Slanetz & Bartley και επώαση στους 37°C για 48 h.



Εικόνα 4: Διήθηση και μεταφορά μεμβράνης σε Slanetz & Bartley

Για την μέθοδο Enterolert σε ειδικό δοχείο τοποθετούνται 100 ml δείγματος και το αντιδραστήριο Enterolert- DW, γίνεται καλή ανάδευση μέχρι το δείγμα να πάρει ένα χρώμα μπλε. Τοποθέτηση του δείγματος σε σακούλες Quanti-tray/2000s και τοποθέτηση στη συσκευή Enterolert εφ' όσον έχει ανάψει η ενδεικτική πράσινη λυχνία. Επώαση στους 41°C για 24 h.



Εικόνα 5: Δείγμα νερού μέσα σε σακούλα Quanti-tray/2000s πριν από την επώαση.



Εικόνα 6: Συσκευή Enterolert-DW

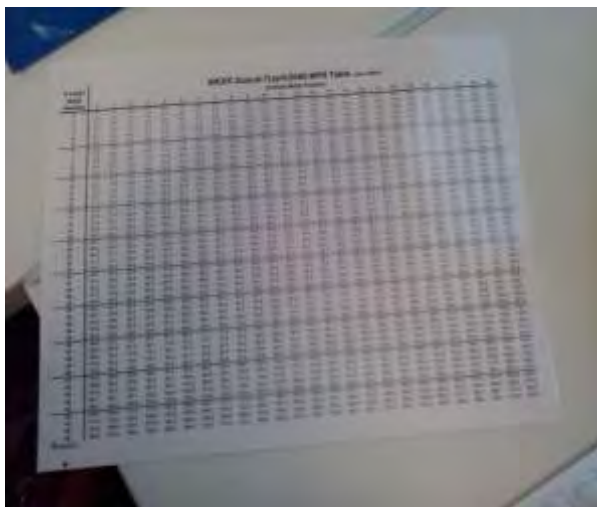
2^η ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ

Την επόμενη ημέρα γίνεται καταμέτρηση των θετικών πηγαδιών. Θετικά θεωρούνται αυτά που από μπλε έχουν αλλάξει χρώμα σε πράσινο και βγαίνει η

συγκέντρωση των Εντεροκόκκων μέσω των ειδικών πινάκων που έχουν δοθεί από την IDEXX.



Εικόνα 7: Δείγμα νερού μέσα σε σακούλα Quanti-tray/2000s μετά από επώαση και με θετικά πηγαδάκια.



Εικόνα 8: Πίνακας καταμέτρησης αποτελεσμάτων.

Στην συνέχεια γίνεται λήψη δείγματος από ένα θετικό πηγαδάκι και ανακαλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα (αιματούχο ή σοκολατόχρουν) και επώαση στους 37°C για 24 h.

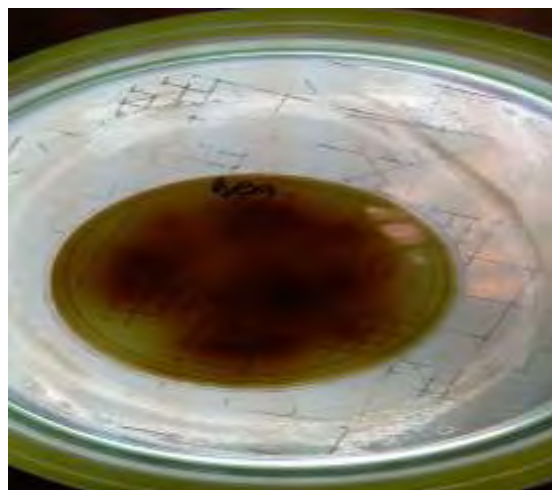
3^η ΗΜΕΡΑ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ

Την τρίτη ημέρα βγάζουμε από τον κλίβανο τα τρυβλία με Slanetz & Bartley και γίνεται καταμέτρηση ύποπτων αποικιών χρώματος κόκκινο, βυσσινί και ροζ.

Ακολουθούν επιβεβαιωτικές δοκιμασίες με την μεταφορά της μεμβράνης διήθησης σε τρυβλίο με Bile-esculine-azide agar και επώαση στους 44 °C για 2 h. Καταμέτρηση αποικιών καστανοκίτρινου έως μαύρου χρώματος με δακτύλιο κάτω από την αποικία λόγω της υδρόλυσης που κάνουν οι Εντερόκοκκοι.



Εικόνα 9: Δεξιά: ύποπτες αποικίες Εντεροκόκκου σε Slanetz & Bartley και αριστερά : επιβεβαιωμένες αποικίες εντεροκόκκου σε Bile-esculine-azide agar.



Εικόνα 10: Δακτύλιος κάτω από την αποικία εντεροκόκκου λόγω της υδρόλυσης της εσκουλίνης.

Την ίδια ημέρα γίνεται και η απομόνωση από αιματούχο ή σοκολατόχρουν άγαρ και η φύλαξη του στελέχους σε ζυμό γλυκερόλης σε βαθειά κατάψυξη και στην συνέχεια η ταυτοποίηση με **Maldi-Tof MS**.

13. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το Microsoft Excel και το SPSS v.20. Τα δεδομένα αναλύθηκαν σύμφωνα με το ISO 17994 βάσει του οποίου οι μετρήσεις μετατράπηκαν σε φυσικό λογάριθμο (ln) ώστε να υπολογιστεί η ποσοστιαία σχετική διαφορά (RD: relative difference) μεταξύ των μετρήσεων των δυο μεθόδων χρησιμοποιώντας την εξίσωση:

$$RD = [\ln(\alpha) - \ln(\beta)] \times 100\% \quad (1)$$

όπου α και β είναι οι κατά ζεύγη μετρήσεις των δυο μεθόδων.

όπου α= μέθοδος Enterolert DW και β= μέθοδος ISO 7899-2

Ο μέσος όρος των ποσοστιαίων σχετικών διαφορών υπολογίστηκε, καθώς και η αβεβαιότητα (expanded uncertainty: U) χρησιμοποιώντας την εξίσωση:

$$U = 2s / \sqrt{n} \quad (2)$$

όπου s: η τυπική απόκλιση της ποσοστιαίας σχετικής διαφοράς και n: το μέγεθος του δείγματος.

Επίσης, το t-test κατά ζεύγη (paired t-test) εφαρμόστηκε για να ελέγξουμε αν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των μετρήσεων των δυο μεθόδων, το Kolmogorov-Smirnov test για να ελεγχθεί η κανονικότητα των δεδομένων και ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson (Pearson's correlation coefficient) για να εκτιμηθεί η γραμμική συσχέτιση των μετρήσεων των δυο μεθόδων. Τέλος, διαγράμματα διασποράς (scatter plots) χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ύπαρξης ακραίων μετρήσεων στα δεδομένα. Ένα αποτέλεσμα θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό όταν το p-value ήταν μικρότερο του 0,05.

13.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν 72 δείγματα νερού ανθρώπινης κατανάλωσης από τον Δήμο Δομοκού του Νομού Φθιώτιδος, με την μέθοδο Enterolert DW και με την μέθοδο ISO 7899:2/2001 για την ανίχνευση και καταμέτρηση εντεροκόκκων. Από τα 72 δείγματα, τα 40 συλλέχθηκαν από πηγές, ποσοστό 56%, 15 δείγματα δικτύου, ποσοστό 21% και 17 δείγματα από γεωτρήσεις, ποσοστό 24%.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε έλεγχος αρνητικών και θετικών προτύπων νερού (controls) και με τις δύο μεθόδους.

Πίνακας V: Θετικά και αρνητικά controls με την μέθοδο Enterolert-DW και με την μέθοδο ISO 7899:2/2001.

#	Positive			Negative			Control run with Sample #
	Enterolert-DW		S&B/BAAA	Enterolert-DW		S&B/BAAA	
	Pos' Wells	MPN/100mL	CFU/100mL	Pos' Wells	MPN/100mL	CFU/100mL	
1	30	45,0	48	0	0,0	0	01-08
2	35	59,0	68	0	0,0	0	09-23
3	36	62,0	55	0	0,0	0	24-32
4	32	50,0	47	0	0,0	0	33-42
5	34	56,0	54	0	0,0	0	43-54
6	31	48,0	55	0	0,0	0	55-68
7	36	62,0	57	0	0,0	0	69-72

Πίνακας VI: Αποτελέσματα κάθε δείγματος και με τις δύο μεθόδους.

#	ISO 7899-2 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΟΙ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ S&B/BAAA. CFU/100mL	ENTEROLERT-DW MPN 100ML	In ISO 7899- 2	In ENTEROLERT- DW	ΣΧΕΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (RELATIVE DIFFERENCE RD)
01	46	32,0	3,82	3,45	-36,29%
02	54	83,0	3,99	3,99	42,99%
03	42	48,0	3,74	3,87	13,35%
04	31	43,0	3,43	3,76	32,72%
05	55	144,0	4,01	4,97	96,25%
06	31	56,0	3,43	4,02	59,14%
07	36	70,0	3,58	4,25	66,50%
08	37	25,0	3,61	3,22	-39,20%
09	35	62,0	3,56	4,13	57,18%
10	43	62,0	3,76	4,13	36,59%
11	43	70,0	3,76	4,25	48,73%
12	38	45,0	3,64	3,81	16,91%
13	49	53,0	3,89	3,97	7,85%
14	38	38,0	3,64	3,64	0,00%
15	43	101,0	3,76	4,62	85,39%
16	32	70,0	3,47	4,24	78,28%
17	69	118,0	4,23	4,77	53,66%
18	24	74,0	3,18	4,30	113,00%
19	49	94,0	3,89	4,54	65,15%
20	33	43,0	3,49	3,76	26,00%
21	45	130,0	3,80	4,87	106,09%
22	39	41,0	3,66	3,71	5,00%
23	58	78,0	4,06	4,36	29,63%
24	91	144,0	4,51	4,97	45,90%
25	68	59,0	4,22	4,08	-14,20%
26	57	74,0	4,04	4,30	26,10%
27	80	118,0	4,38	4,77	38,87%
28	76	101,0	4,33	4,62	28,44%
29	46	53,0	3,82	3,97	14,17%
30	75	109,0	4,32	4,69	37,39%
31	38	101,0	3,64	4,62	97,75%
32	74	83,0	4,30	4,42	11,48%
33	97	59,0	4,57	4,07	-49,72%
34	13	8,0	2,56	2,08	-48,55%
35	28	32,0	3,33	3,47	13,35%
36	12	43,0	2,48	3,76	127,63%
37	6	10,0	1,79	2,30	51,08%
38	29	11,0	3,36	2,39	-96,94%
39	8	15,0	2,09	2,71	62,86%
40	9	11,0	2,19	2,39	20,07%

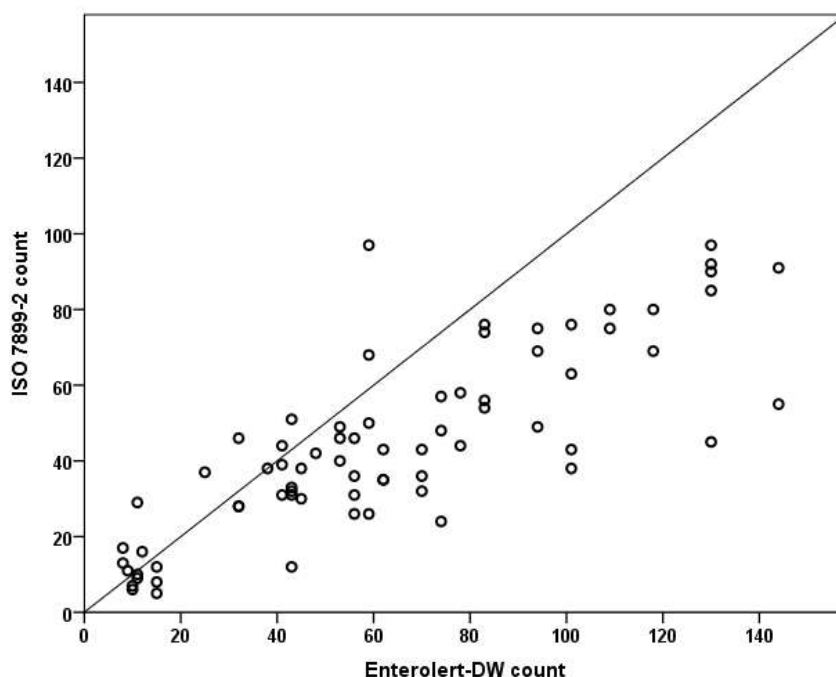
#	ISO 7899-2 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΟΙ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ S&B/BAAA. CFU/100mL	ENTEROLERT-DW MPN 100ML	ln ISO 7899- 2	ln ENTEROLERT- DW	ΣΧΕΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΑ (RELATIVE DIFFERENCE RD)
41	17	8,0	2,83	2,08	-75,38%
42	11	9,0	2,39	2,19	-20,07%
42	5	15,0	1,61	2,71	109,86%
43	7	10,0	1,95	2,30	35,67%
44	10	11,0	2,30	2,39	9,53%
45	12	15,0	2,48	2,71	22,31%
46	16	12,0	2,77	2,48	-28,77%
47	40	53,0	3,69	3,97	28,14%
48	35	62,0	3,55	4,13	57,18%
49	36	56,0	3,58	4,03	44,18%
50	90	130,0	4,50	4,87	36,77%
51	44	41,0	3,78	3,71	-7,06%
52	26	59,0	3,26	4,08	81,94%
53	44	78,0	3,78	4,36	57,25%
54	48	74,0	3,87	4,30	43,29%
55	50	59,0	3,91	4,08	16,55%
56	97	130,0	4,57	4,87	29,28%
57	30	45,0	3,40	3,81	40,55%
58	85	130,0	4,44	4,87	42,49%
59	92	130,0	4,52	4,87	34,57%
60	76	83,0	4,33	4,42	8,81%
61	51	43,0	3,93	3,76	-17,06%
62	46	56,0	3,82	4,03	19,67%
63	28	32,0	3,33	3,46	13,35%
64	31	41,0	3,43	3,71	27,96%
65	69	94,0	4,23	4,54	30,92%
66	75	94,0	4,32	4,54	22,58%
67	26	56,0	3,26	4,03	76,73%
68	56	83,0	4,02	4,42	39,35%
69	63	101,0	4,14	4,62	47,20%
70	80	109,0	4,38	4,69	30,93%
71	32	43,0	3,47	3,76	29,55%
72	46	32,0	3,83	3,47	-36,29%

13.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑ ISO 17994

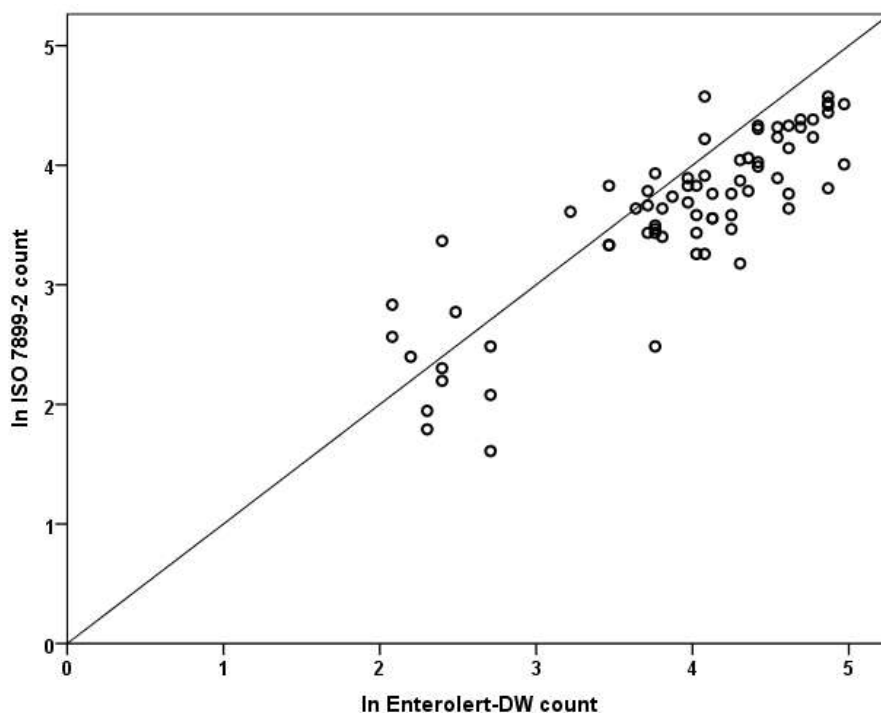
Σύμφωνα με το ISO δυο μέθοδοι θεωρούνται ποσοτικά ισοδύναμες εάν η μέση σχετική διαφορά τους (RD) δεν διαφέρει σημαντικά από το μηδέν και η αβεβαιότητα δεν εκτείνεται πέρα από μια μέγιστη αποδεκτή απόκλιση από το μηδέν (συνήθως -10%). Σημαντική διαφορά της μέσης σχετικής διαφοράς από το μηδέν δείχνει σημαντικά διαφορετική απόδοση της νέας μεθόδου (καλύτερη ή χειρότερη η νέα μέθοδος). Εάν η αβεβαιότητα καλύπτει τόσο τη μηδενική μέση σχετική διαφορά όσο και την αποδεκτή απόκλιση είτε στο +10% είτε στο -10%, το συμπέρασμα της σύγκρισης είναι ασαφές και απαιτούνται περισσότερα δείγματα για να μειωθεί το εύρος της αβεβαιότητας (το πρότυπο ISO 17994 παρέχει μια μέθοδο για τον υπολογισμό πόσα επιπλέον δείγματα θα χρειαστούν).

13.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Σύμφωνα με το ISO 17994 πριν προχωρήσουμε στην στατιστική ανάλυση των δεδομένων απαιτείται να ελέγξουμε εάν υπάρχουν ακραίες παρατηρήσεις οι οποίες θα μπορούσαν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα. Στα παρακάτω διαγράμματα διασποράς παρουσιάζονται τόσο οι μη-λογαριθμημένες όσο και οι λογαριθμημένες (ln) κατά ζεύγη μετρήσεις των δυο μεθόδων.



Διάγραμμα I: Διάγραμμα διασποράς των κατά ζεύγη μη-λογαριθμημένων μετρήσεων σε δείγματα νερού.



Διάγραμμα II: Διάγραμμα διασποράς των κατά ζεύγη λογαριθμημένων μετρήσεων σε δείγματα νερού.

Από τα γραφήματα παρατηρούμε ότι δεν υπάρχουν ακραίες μετρήσεις που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τα συμπεράσματα της μελέτης μας, συνεπώς καμία τιμή δεν αποκλείεται από την περαιτέρω στατιστική ανάλυση.

Συσχετίζοντας τις κατά ζεύγη μετρήσεις (συντελεστής συσχέτισης του Pearson) παρατηρούμε ότι υπάρχει υψηλή θετική συσχέτιση μεταξύ των δυο μεθόδων καθώς ο συντελεστής συσχέτισης ισούται με 0,852 και η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική ($p\text{-value} < 0,001$).

Πίνακας VII: Συσχέτιση των μετρήσεων.

	Paired Samples Correlations		
	Σύνολο δειγμάτων	Συντελεστής συσχέτισης	p-value
ln Enterolert-DW count & ln ISO 7899-2 count	72	0,852	<0,001

Επίσης, παρατηρούμε ότι στα δεδομένα των δειγμάτων νερού που αναλύθηκαν φαίνεται στην γραμμή ισοδυναμίας να υπάρχει ένας μεγαλύτερος αριθμός δεδομένων από την πλευρά της μεθόδου Enterolert-DW, το οποίο αποδεικνύει υψηλότερες μετρήσεις Εντεροκόκκων με την μέθοδο Enterolert-DW. Συγκρίνοντας τις μετρήσεις των κατά ζεύγη δύο μεθόδων, παρατηρείται από την σχετική διαφορά (RD) των 72 δειγμάτων που αναλύθηκαν, να είναι 59 δείγματα θετικά ως προς την Enterolert-DW και 12 δείγματα να

είναι αρνητικά. Το εύρος της σχετικής διαφοράς (RD) δίνεται από την ελάχιστη τιμή του εύρους (-96,94%) έως την μέγιστη τιμή (127,63%) με μέση διαφορά της σχετικής διαφοράς (RD) 30,82%.

Πίνακας VIII: Σχετική διαφορά ανάλυσης μεταξύ των δύο μεθόδων από τα αποτελέσματα των δειγμάτων σύμφωνα με το ISO 17994.

	Αριθμός δειγμάτων (n)	Σχετική διαφορά (Relative difference RD) %	Τυπική απόκλιση (Standard deviation SD) %	Αβεβαιότητα (expanded uncertainty U) %	Αβεβαιότητα εύρους (expanded uncertainty U) %		Αποτέλεσμα
					X _{Lo}	X _{Hi}	
Εντερόκοκκοι	72	30,82	41,62	9,81	21,01	40,3	Enterolert-DW καλύτερη ανάκτηση.

Μετά την συλλογή των δεδομένων και από τις δύο μεθόδους, διαπιστώθηκε πως η μέθοδος δοκιμής (Enterolert-DW) δίνει σημαντικά υψηλότερες μετρήσεις σε σχέση με την μέθοδο αναφοράς (ISO 7899-2) έχοντας μέση ποσοστιαία σχετική διαφορά (relative difference RD) 30,82% και εύρος αβεβαιότητας (U) από 21,01% έως 40,3%. Με αυτό τον τρόπο και βάση του παραπάνω πίνακα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος Enterolert-DW έχει κατά 30,82% καλύτερη ανάκτηση από την μέθοδο ISO 7899-2.

13.4 ΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Πέραν της ανάλυσης των δεδομένων κατά **ISO 17994**, πραγματοποιήθηκε και παραμετρική ανάλυση των λογαριθμημένων μετρήσεων (ln) χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία t-test κατά ζεύγη (paired t-test) για να ελέγξουμε αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μετρήσεων των δυο μεθόδων. Για να εφαρμοστεί το paired t-test απαιτείται οι διαφορές των κατά ζεύγη λογαριθμημένων μετρήσεων (RD) να ακολουθούν κανονική κατανομή. Η κανονικότητα των διαφορών ελέγχθηκε με το Kolmogorov-Smirnov test και ισχύει η κανονικότητα των δεδομένων αφού το p-value=0,349 (>0,05).

Πίνακας IX: Έλεγχος κανονικότητας των δεδομένων.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		RD
N		72
Normal Parameters	Μέσος όρος	0,3082
	Τυπική απόκλιση	0,4162
Kolmogorov-Smirnov Z		0,933
p-value		0,349

Στον επόμενο πίνακα παρουσιάζονται τα στατιστικά περιγραφικά μέτρα των λογαριθμημένων μετρήσεων των δυο μεθόδων. Παρατηρούμε ότι η μέση τιμή των μετρήσεων της μεθόδου Enterolert-DW ($3,9096 \pm 0,7935$) είναι υψηλότερη από τη μέση τιμή της μεθόδου ISO 7899-2 ($3,6014 \pm 0,7034$).

Πίνακας X: Στατιστικά περιγραφικά μέτρα των λογαριθμημένων μετρήσεων των δυο μεθόδων.

Paired Samples Statistics				
	Μέσος όρος	Σύνολο δειγμάτων	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα μέσου όρου
In Enterolert-DW count	3,9096	72	0,79353	0,09352
In ISO 7899-2 count	3,6014	72	0,70338	0,08289

Από τον επόμενο πίνακα συμπεραίνουμε ότι αυτή η διαφορά των μέσων τιμών των μετρήσεων μεταξύ των δυο μεθόδων ($0,3082 \pm 0,4162$) είναι στατιστικά σημαντική καθώς η τιμή του $p\text{-value} < 0,001$ ($< 0,05$). Επομένως, η μέθοδος δοκιμής Enterolert-DW έχει καλύτερη ανάκτηση από την μέθοδο αναφοράς ISO 7899-2.

Πίνακας XI: Σύγκριση των λογαριθμημένων μετρήσεων των δυο μεθόδων.

Paired Samples Test								
Paired Differences								
	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα μέσου όρου	95% ΔΕ της Διαφοράς	t	df	p-value	
In Enterolert-DW count & In ISO 7899-2 count	0,3082	0,4162	0,0490	0,2104 0,4060	6,283	71	<0,001	

ΔΕ: διάστημα εμπιστοσύνης

14. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Εδώ και πολλά χρόνια εκδηλώνεται μεγάλο ενδιαφέρον για το γένος των εντεροκόκκων, που οφείλεται στην αυξημένη συμμετοχή τους σε λοιμώξεις αλλά και στην αντοχή τους σε αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Οι εντερόκοκκοι αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου αλλά και των ζώων. Το τελευταίο σημείο του παχέως εντέρου είναι και το τμήμα που συνήθως αποικίζουν οι εντερόκοκκοι. Η παρουσία τους σε δείγματα εδάφους και νερών σημαίνει μόλυνση από περιττώματα ανθρώπων, ζώων, αλλά και από την ρίψη λυμάτων. (Divriese et al. 1992).

Η οδηγία 98/83/ΕΕ στο μέρος Α του Παραρτήματος Ι μας υποχρεώνει να ελέγχουμε τους Εντεροκόκκους ως μικροβιακούς δείκτες του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης με απλές και γρήγορες μεθόδους. Καθώς και η οδηγία (76/160/ΕΟΚ) για την ποιότητα των νερών κολύμβησης έχει σκοπό την προστασία του περιβάλλοντος και της δημόσιας υγείας, μειώνοντας τη ρύπανση των νερών κολύμβησης και προστατεύοντας τα από περαιτέρω υποβάθμιση. Η οδηγία θέτει ποιοτικά όρια υπό μορφή υποχρεωτικών τιμών αλλά και πιο αυστηρών κατευθυντήριων τιμών. Οι περιοχές κολύμβησης πρέπει να παρακολουθούνται κάθε δύο εβδομάδες ξεκινώντας δύο εβδομάδες πριν την έναρξη της κολυμβητικής περιόδου καθόλη τη διάρκεια της.

Ο μεγάλος αριθμός των παθογόνων μικροοργανισμών και η πολυπλοκότητα του προσδιορισμού τους ήταν ο λόγος για την χρήση κάποιων μικροοργανισμών-δεικτών οι οποίοι μπορούν να προσδιοριστούν γρήγορα, με απλά και φτηνά σχετικά μέσα από πολλά εργαστήρια που έχουν αυτή την δυνατότητα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν και οι εντερόκοκκοι, οι οποίοι σπανίως πολλαπλασιάζονται στο νερό και παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στις περιβαλλοντικές πιέσεις από την *E.coli*. Αυτό συμβαίνει, διότι οι εντερόκοκκοι ανήκουν στην κατηγορία των Gram (+) βακτηρίων και το κυτταρικό τους τοίχωμα είναι πολύ πιο ανθεκτικό από αυτό των Gram (-) όπως για παράδειγμα της *E.coli*. Πρέπει να σημειωθεί επίσης πώς οι εντερόκοκκοι είναι ανθεκτικότεροι από την *E.coli* και στην χλωρίωση του νερού, εκτός από τα περιβαλλοντικά stress. Τέλος, η παρουσία των εντεροκόκκων στο νερό αποτελεί απόδειξη μόλυνσης του νερού με περιττωματικές ουσίες και μάλιστα παλαιότερης μόλυνσης.

Οι εντερόκοκκοι εκτός του ότι είναι δείκτες για τα πόσιμα νερά και ανθεκτικότεροι από την *E.coli* αποτελούν τον ασφαλέστερο δείκτη για τα θερμά, θαλάσσια και υπόγεια νερά. Όσο αναφορά τα θαλάσσια νερά έχει αποδειχθεί ο καλύτερος δείκτης για την επιδημιολογία της κολύμβησης. (Papastergiou. P. et al., 2012)

Μετά από την μελέτη που έλαβε χώρα στο εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας φάνηκε η μέθοδος Enterolert να είναι μια ενδιαφέρουσα νέα πρόταση ανίχνευσης και καταμέτρησης εντεροκόκκων σε δείγματα νερού ανθρώπινης κατανάλωσης για τα εργαστήρια, λόγω της υψηλής της ανάκτησης και της ταχείας έκδοσης αποτελεσμάτων.

Η Enterolert είναι μια σύντομη και απλή μέθοδος σε αντίθεση με την μέθοδο ISO 7899-2:2001. Η νέα αυτή μέθοδος δίνει αποτελέσματα μέσα σε ένα 24ώρο. Αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο σε μια διερεύνηση εξάρσεων κρουσμάτων όπως για παράδειγμα μια γαστρεντερίτιδα. Σε μια τέτοια περίπτωση το ένα 24ώρο που χρειάζεται η νέα μέθοδος Enterolert-DW είναι πολύτιμος κερδισμένος χρόνος από τα δύο 24ώρα που χρειάζεται η μέθοδος ISO 7899-2.

Από την άλλη πλευρά κάθε εργαστήριο το οποίο για την ανίχνευση και καταμέτρηση εντεροκόκκων θέλει να χρησιμοποιήσει μια από τις δύο μεθόδους, θα πρέπει να λάβει σοβαρά υπόψη το κόστος, το όφελος και τον απαιτούμενο χρόνο για την λήψη αποτελεσμάτων. Τα αναλώσιμα μια τέτοιας ταχείας μεθόδου όπως η Enterolert είναι λίγο πιο ακριβά από τα αναλώσιμα της ISO, όμως η απλότητα της μεθόδου δεν απαιτεί εξειδικευμένο και πεπειραμένο προσωπικό όπως απαιτεί η μέθοδος ISO, για την διαδικασία της διήθησης, της μεταφοράς της μεμβράνης και της επιβεβαιωτικής δοκιμασίας.

Πρέπει να σημειωθεί πως με την μέθοδο Enterolert δεν υπάρχει εμφανής απομόνωση μικροοργανισμού, όπως συμβαίνει με την μέθοδο ISO. Αυτό είναι ένα μειονέκτημα το οποίο μπορεί να ξεπεραστεί με την βοήθεια αναρρόφησης υγρού καλλιεργήματος, από ένα θετικό πηγαδάκι της σακούλας Quanti-Tray. Στην συνέχεια το υγρό που θα υπάρχει μέσα στην σύριγγα μπορεί να ανακαλλιεργηθεί σε ένα ευρέως φάσματος θρεπτικό υπόστρωμα όπως είναι το αιματούχο και το σοκολατόχρουν άγαρ όπως ακριβώς έγινε και στην δικιά μας μελέτη. Πρέπει να σημειωθεί πως σε όλα τα δείγματα υπήρχε ανάκτηση των στελεχών. Με αυτό τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα να φυλαχτούν τα στελέχη σε βαθιά κατάψυξη εφόσον το εργαστήριο το επιθυμεί.

Συμπερασματικά, μετά από την μελέτη των δύο μεθόδων για την ανίχνευση και καταμέτρηση των εντεροκόκκων, διαπιστώνεται πως και οι δύο ανταπεξήλθαν στις απαιτήσεις του πρωτοκόλλου με ιδιαίτερα ικανοποιητικά αποτελέσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΑΓΓΛΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Bishof W.E., Reynolds T.M., Hall G., Wentel R.P., Edmond M.B.** (1999) *Molecular epidemiology of vancomycin – Resistant Enterococcus faecium (VREF), in a large urban hospital over a five-years period.* *J. Clin. Microb.* **37**:3912-16.
- **Breed R.S., Murray E.G., Hitchens A.P., (Editeurs)** (1986). *Bergey's manual of determinative bacteriology.* Williams & Wilkins co, Baltimore.
- **Burton M.C.,** (1949): *Comparison of coliforms and enterococcus organisms and indices of pollution in frozen foods.* *Food Res.* **434-448.**
- **Buttiaux R.** (1959). <<*The value of the association escherichial-group D streptococci in the diagnosis of contamination in foods.*>> **J. Appl. Bacteriol.** **22**:153-158.
- **Collins M.D., Jones D., Farrow J.A.E., Kilpper-Bälz R., et Schleifer K.H.,**(1984): *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *Enterococcus casseliflavus* nom. rev., camb. nov., *Enterococcus gallinarum* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol* **34**: 220-223.
- **Collins M.D., Farrow J.A.E., et Jones D.,** (1986): *Enterococcus mundii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**: 8-12.
- **Devriese L.A., Van De Kerckhove A., Kilpper-Balz R., and Schleifer, K.H.,** (1987): <<*Characterization and identification of Enterococcus species isolated 88 from the intestines of animals.*>> **International Journal of Systematic Bacteriology.** **37**:257-259.
- **Devriese L.A., Pot B., and Collins M.D.,** (1993): <<*Phenotypic identification of the genus Enterococcus and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups.*>>**Journal of Applied Bacteriology,** **75**:399-408.
- **Devriese L.A., Leven M., Goosens H., Vandamme P., Pot B., Hommer J.,and Haesebrouck F.,** (1996): *Presence of vancomycin-resistant enterococci in farm and pet animals.* *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2285-2287.
- **Devriese L.A., Laurier L., De Herdt P., and Haesebrouck F.,** (1992a): <<*Enterococcal and streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows.*>> **J. Appl. Bacteriol.** **72**:29-31.
- **Donlan R.M., Costerton J.W.:** *Biofilms – Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms.* *Clin. Microbiol. Rev.* (2002) **Apr.** 167-193.
- **Duncan H.E., et Edberg S.C.,** 1995. *Host microbe interaction in the gastrointestinal tract.* *Crit. Rev. Microbiol.* **21**:85-100.
- **Eliopoulos G.M.** (1992). *Enterococcal endocarditis* p. 209-223. In D. Kayl (ed). *Infective endocarditis.* Raven Press, New York.
- **Eliopoulos G.M., Wennersten C.B., Cole G., and Moellering R.C.** (1994). *Antimicrobial activity of two glycyclines against gram-positive bacteria.* *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:534-541.
- **Environment Agency (Standing Committee of Analysts).** <<*The Microbiology of Drinking Water* (2002)- *Part 3 – Practices and procedures for laboratories.*

Methods for the Examination of Waters and Associated Materials.>> Nottingham: Environment Agency.

- **Farrow J.A.E., Jones D., Philips P.A. et Collins M.D.** (1983): *Taxonomic studies on some group D streptococci.* *J. Gen. Microbiol.* **129**:1423-1432.
- **Fricker EJ, Illingworth KS and Fricker CR.** (1997) *Use of two formulations of Colilert and QuantiTray™ for assessment of the bacteriological quality of water.* *Water Res.* **31** 2495-2499.
- **G E Budnick, R T Howard, and D R Mayo** (1996).<<*Evaluation of Enterolert for enumeration of Enterococci in recreational waters.*>> **Appl. Environ. Microbiol.** *October* ,62:10 3881-4.
- **Harder W. and Duknizen C.:** *Physiological responses to nutrient limitation.* *Annu. Rev. Microbiol.* (1983). **37**:9-23.
- **Hoskins D.D., Whitely H.R., et Mackler B.** (1962): The reduced diphosphopyridine nucleotide oxidase of *Streptococcus faecalis*: purification and properties. *J. Biol. Chem.* **237**:2647-2651.
- **ISO (1999a)** <<*General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories.* *ISO/IEC 17025:1999.*>> **Geneva: International Organisation for Standardization.**
- **ISO (1999b) Water Quality** – <<*Enumeration of Culturable Micro-Organisms – Colony Count by Inoculation in a Nutrient Agar Culture Medium.* *ISO 6222:1999.*>> **Geneva: International Organisation for Standardization.**
- **ISO (2000a) Water Quality** – <<*Detection and Enumeration of Escherichia coli and Coliform Bacteria – Part 1: Membrane filtration method.* *ISO 9308-1:2000,*>> **Geneva: International Organisation for Standardization.**
- **ISO (2000b) Water Quality** – <<*Detection and Enumeration of Intestinal Enterococci – Part 2: Membrane Filtration Method.* *ISO 7899-2:2000.*>> **Geneva: International Organisation for Standardization.**
- **ISO (2000c) Water Quality** – <<*Guidance on Validation of Microbiological Methods.* *ISO/TR 13843:2000.*>>**Geneva: International Organisation for Standardization.**
- **ISO (2004) Water Quality** – <<*Criteria for the Establishment of Equivalency between Microbiological Methods.* *ISO 17994:2004.*>> **Geneva: International Organisation for Standardization.**
- **ISO 7899-2:2000 Water-Quality** –<<*Detection and enumeration of intestinal enterococci –Part: Membrane filtration method.* >> **Geneva: International Organization for Standarization.**
- **ISO 17994:2004 Water Quality** –<< *Criteria for establishing equivalence between microbiological methods.*>> **Geneva: International Organization for Standarization.**
- **Karl F. Eckner** (1998)<<*Comparison of Membrane Filtration and Multiple-Tube Fermentation by the Colilert and Enterolert Methods for Detection of Waterborne Coliform Bacteria, Escherichia coli, and Enterococci used in Drinking and Bathing Water Quality Monitoring in Southern Sweden.*>>**Appl. Environ. Microbiol.**, **64**:8 3079-3083 .
- **Lancefield R.C.** (1933): A Serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *Journal of Experimental Medicine.* **57**:571-595.
- **Low D.E., Keller N., Barth A., Jones R.N.** (2001). *Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci:*

Results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin. Infect. Dis. 2001, 32 (Suppl. 2): 5:133-145.

- **Mavridou A., Smeti E., Mandilara G., Boufa P., Vagiona-Arvanitidou M., Vantarakis A., Vassilandonopoulou G., Pappa O., Roussia V., Tzouanopoulos A., Livadara M., Aisopou I., Maraka V., Nikolaou E. and Mandilara G.** (2010). << *Equivalency testing of TTC Tergitol 7 agar (ISO 9308-1:2000) with five culture media for the detection of E. coli in water samples in Greece Evaluation of Enterolert for Enumeration of Enterococci in Recreational Waters.*>> **Water Science and Technology**, 61(1), 67-76.
- **Mundt J.O.**, 1982. *The ecology of the streptococci.* **Microb. Ecol.** 8:355-369.
- **Murray B.E.:** *The life and times of the enterococcus.* **Clin. Microb. of Rev.**1990. 3:46-65.
- **Murray B.E.:** *Diversity among multidrug-resistant Enterococci.* **Emerg. Infect. Dis.** 1998, 4:37-47.
- **Murray B.E.:** *β -lactamase producing enterococci.* **Antimicrob. Agents. Chemother.** 1992: 36:2355-9.
- **Ostrolenk M., Kramer N., et Cleverdon R.C.**, 1947. *Comparative studies of enterococci and Escherichia coli as indices of pollution.* **J. Bacteriol.** 53:197-203.
- **Sherman J.M.** 1937. *The streptococci.* **Bacterial. Rev.** 1:3-97.
- **Panagiotis Papastergiou, Varvara Mouchtouri, Ourania Pinaka, Anna Katsiaflaka, George Rachiotis, Christos Hadjichristodoulou.** << *Elevated Bathing-Associated Disease Risks Despite Certified Water Quality: A Cohort Study*>> **International Journal of Enviromental research and Public Health** 05/2012; 9(5): 1548-65.
- **Thiercelin M.E.** 1899. *Sur un diplocoque saprophyte de l'intestine susceptible de devenir pathogène.* **C.R. Soc. Bid.** 5 :269-271.
- **Thiercelin M.E. et Jouhand L.** 1903. *Reproduction de l'entérocoque: taches centrales : granulations périphériques et microblastes.* **J. Food Prot.** 55:686-688.
- **Webb M., Riley L.W., Roberts R.B.:** *Cost of hospitalization for and risk factors associated with vancomycin-resistant Enterococcus faecium infection and colonization.* **Clin. Infect. Dis.** (2001), 33:445-452.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ΕΚ (Ευρωπαϊκή Κοινότητα) (1998). Οδηγία 98/83/ΕΚ του Συμβουλίου σχετικά με την ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L 330/32, 05/12/1998. Εναρμόνιση της Ελλάδας με το νόμο **Κ.Υ.Α /2600/2001** ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης.
- **Κρεμαστινού Τ., Χατζηχριστοδούλου Χ.:** *Οδηγίες για δειγματοληψίες νερών.* Εκδόσεις ΕΣΔΥ. 2004.17-33.
- **Μπούφα Παναγιώτα:** *Ποιότητα νερού ανθρώπινης κατανάλωσης-Σχετική νομοθεσία.* Εκδόσεις Κεντρικό Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας, Υπουργείο Υγείας & Κοινωνικής Αλληλεγγύης. 2005.3-5
- **Οδηγία 76/160/ΕΚ** για τα νερά κολύμβησης.
- **Παπαπετροπούλου Μ., Μαυρίδου Α.:** *Μικροβιολογία υδάτινου περιβάλλοντος.* Εκδόσεις Π. Τραυλός. 1995.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

- www.idexx.co.uk/pdf/en_gb/water/096329400L.pdf
- www.keelpno.gr
- www.water.org
- www.who.int/water_sanitation_health
- www.waterinfo.gr/eedyp/Paros_papers/velonakis_e.pdf

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Πίνακας XIX: Αποτελέσματα δειγμάτων και με τις δύο μεθόδους.

Collected	Analysed	Lab Number	Reference	S&B	BAAA	Confirmed Enterococci	Pos' Wells	MPN/100mL	RD	concentration
22/4/2014	22/4/2014	01	41751	56	46	46	24	32,0	-0,3629	35
22/4/2014	22/4/2014	02	41751	67	54	54	41	83,0	0,4299	60
22/4/2014	22/4/2014	03	41751	54	42	42	31	48,0	0,1335	35
22/4/2014	22/4/2014	04	41751	39	31	31	29	43,0	0,3272	35
22/4/2014	22/4/2014	05	41751	64	55	55	48	144,0	0,9625	80
22/4/2014	22/4/2014	06	41751	56	31	31	34	56,0	0,5914	35
22/4/2014	22/4/2014	07	41751	62	36	36	38	70,0	0,6650	60
22/4/2014	22/4/2014	08	41751	52	37	37	20	25,0	-0,3920	35
6/5/2014	6/5/2014	09	41765	43	35	35	36	62,0	0,5718	60
6/5/2014	6/5/2014	10	41765	55	43	43	36	62,0	0,3659	60
6/5/2014	6/5/2014	11	41765	58	43	43	38	70,0	0,4873	60
6/5/2014	6/5/2014	12	41765	51	38	38	30	45,0	0,1691	35
6/5/2014	6/5/2014	13	41765	65	49	49	33	53,0	0,0785	60
6/5/2014	6/5/2014	14	41765	52	38	38	27	38,0	0,0000	35
6/5/2014	6/5/2014	15	41765	49	43	43	44	101,0	0,8539	60
6/5/2014	6/5/2014	16	41765	36	32	32	38	70,0	0,7828	60
6/5/2014	6/5/2014	17	41765	94	69	69	46	118,0	0,5366	80
6/5/2014	6/5/2014	18	41765	27	24	24	39	74,0	1,1260	35
6/5/2014	6/5/2014	19	41765	59	49	49	43	94,0	0,6515	60
6/5/2014	6/5/2014	20	41765	43	33	33	29	43,0	0,2647	35
6/5/2014	6/5/2014	21	41765	64	45	45	47	130,0	1,0609	60

Collected	Analysed	Lab Number	Reference	S&B	BAAA	Confirmed Enterococci	Pos' Wells	MPN/100mL	RD	concentration
6/5/2014	6/5/2014	22	41765	59	39	39	28	41,0	0,0500	35
6/5/2014	6/5/2014	23	41765	71	58	58	40	78,0	0,2963	80
19/5/2014	19/5/2014	24	41778	96	91	91	48	144,0	0,4590	100
19/5/2014	19/5/2014	25	41778	69	68	68	35	59,0	-0,1420	60
19/5/2014	19/5/2014	26	41778	58	57	57	39	74,0	0,2610	60
19/5/2014	19/5/2014	27	41778	90	80	80	46	118,0	0,3887	100
19/5/2014	19/5/2014	28	41778	79	76	76	44	101,0	0,2844	80
19/5/2014	19/5/2014	29	41778	49	46	46	33	53,0	0,1417	60
19/5/2014	19/5/2014	30	41778	75	75	75	45	109,0	0,3739	80
19/5/2014	19/5/2014	31	41778	42	38	38	44	101,0	0,9775	80
19/5/2014	19/5/2014	32	41778	74	74	74	41	83,0	0,1148	80
26/5/2014	26/5/2014	33	41785	107	97	97	35	59,0	-0,4972	80
26/5/2014	26/5/2014	34	41785	13	13	13	7	8,0	-0,4855	15
26/5/2014	26/5/2014	35	41785	32	28	28	24	32,0	0,1335	15
26/5/2014	26/5/2014	36	41785	13	12	12	29	43,0	1,2763	15
26/5/2014	26/5/2014	37	41785	6	6	6	9	10,0	0,5108	15
26/5/2014	26/5/2014	38	41785	29	29	29	10	11,0	-0,9694	15
26/5/2014	26/5/2014	39	41785	8	8	8	13	15,0	0,6286	15
26/5/2014	26/5/2014	40	41785	10	9	9	10	11,0	0,2007	15
26/5/2014	26/5/2014	41	41785	17	17	17	7	8,0	-0,7538	15

Collected	Analysed	Lab Number	Reference	S&B	BAAA	Confirmed Enterococci	Pos' Wells	MPN/100mL	RD	concentration
26/5/2014	26/5/2014	42	41785	13	11	11	8	9,0	-0,2007	15
1/12/2014	1/12/2014	43	41974	7	5	5	13	15,0	1,0986	15
1/12/2014	1/12/2014	44	41974	15	7	7	9	10,0	0,3567	15
1/12/2014	1/12/2014	45	41974	16	10	10	10	11,0	0,0953	15
1/12/2014	1/12/2014	46	41974	15	12	12	13	15,0	0,2231	15
1/12/2014	1/12/2014	47	41974	23	16	16	11	12,0	-0,2877	15
1/12/2014	1/12/2014	48	41974	55	40	40	33	53,0	0,2814	60
1/12/2014	1/12/2014	49	41974	37	35	35	36	62,0	0,5718	60
1/12/2014	1/12/2014	50	41974	36	36	36	34	56,0	0,4418	35
1/12/2014	1/12/2014	51	41974	93	90	90	47	130,0	0,3677	100
1/12/2014	1/12/2014	52	41974	49	44	44	28	41,0	-0,0706	35
1/12/2014	1/12/2014	53	41974	30	26	26	35	59,0	0,8194	35
1/12/2014	1/12/2014	54	41974	45	44	44	40	78,0	0,5725	60
8/12/2014	8/12/2014	55	41981	55	48	48	39	74,0	0,4329	60
8/12/2014	8/12/2014	56	41981	51	50	50	35	59,0	0,1655	60
8/12/2014	8/12/2014	57	41981	100	97	97	47	130,0	0,2928	100
8/12/2014	8/12/2014	58	41981	44	30	30	30	45,0	0,4055	35
8/12/2014	8/12/2014	59	41981	93	85	85	47	130,0	0,4249	100
8/12/2014	8/12/2014	60	41981	92	92	92	47	130,0	0,3457	100

Collected	Analysed	Lab Number	Reference	S&B	BAAA	Confirmed Enterococci	Pos' Wells	MPN/100mL	RD	concentration
8/12/2014	8/12/2014	61	41981	80	76	76	41	83,0	0,0881	80
8/12/2014	8/12/2014	62	41981	135	51	51	29	43,0	-0,1706	35
8/12/2014	8/12/2014	63	41981	112	46	46	34	56,0	0,1967	35
8/12/2014	8/12/2014	64	41981	50	28	28	24	32,0	0,1335	35
8/12/2014	8/12/2014	65	41981	54	31	31	28	41,0	0,2796	35
8/12/2014	8/12/2014	66	41981	78	69	69	43	94,0	0,3092	80
8/12/2014	8/12/2014	67	41981	75	75	75	43	94,0	0,2258	80
8/12/2014	8/12/2014	68	41981	46	26	26	34	56,0	0,7673	35
15/12/2014	15/12/2014	69	41988	70	56	56	41	83,0	0,3935	80
15/12/2014	15/12/2014	70	41988	78	63	63	44	101,0	0,4720	80
15/12/2014	15/12/2014	71	41988	83	80	80	45	109,0	0,3093	80
15/12/2014	15/12/2014	72	41988	63	32	32	29	43,0	0,2955	35

RD 30,82%

SD 41,62%

LO 21,01%

HI 40,63%

ΠΙΝΑΚΑΣ XX : Confirmation ISO

#	Date		Sample		Colony Confirmations			Total Confirmed Enterococci
	Collected	Analysed	Lab Number	Reference	#	S&B	BAAA	
	22/4/2014	22/4/2014	1	41751	1	56	46	46
	22/4/2014	22/4/2014	2	41751	2	67	54	54
	22/4/2014	22/4/2014	3	41751	3	54	42	42
	22/4/2014	22/4/2014	4	41751	4	39	31	31
	22/4/2014	22/4/2014	5	41751	5	64	55	55
	22/4/2014	22/4/2014	6	41751	6	56	31	31
	22/4/2014	22/4/2014	7	41751	7	62	36	36
	22/4/2014	22/4/2014	8	41751	8	52	37	37
	6/5/2014	6/5/2014	09	41765	9	43	35	35
	6/5/2014	6/5/2014	10	41765	10	55	43	43
	6/5/2014	6/5/2014	11	41765	11	58	43	43
	6/5/2014	6/5/2014	12	41765	12	51	38	38
	6/5/2014	6/5/2014	13	41765	13	65	49	49
	6/5/2014	6/5/2014	14	41765	14	52	38	38
	6/5/2014	6/5/2014	15	41765	15	49	43	43
	6/5/2014	6/5/2014	16	41765	16	36	32	32
	6/5/2014	6/5/2014	17	41765	17	94	69	69
	6/5/2014	6/5/2014	18	41765	18	27	24	24
	6/5/2014	6/5/2014	19	41765	19	59	49	49
	6/5/2014	6/5/2014	20	41765	20	43	33	33
	6/5/2014	6/5/2014	21	41765	21	64	45	45
	6/5/2014	6/5/2014	22	41765	22	59	39	39
	6/5/2014	6/5/2014	23	41765	23	71	58	58
	19/5/2014	19/5/2014	24	41778	24	96	91	91
	19/5/2014	19/5/2014	25	41778	25	69	68	68
	19/5/2014	19/5/2014	26	41778	26	58	57	57
	19/5/2014	19/5/2014	27	41778	27	90	80	80
	19/5/2014	19/5/2014	28	41778	28	79	76	76
	19/5/2014	19/5/2014	29	41778	29	49	46	46
	19/5/2014	19/5/2014	30	41778	30	75	75	75
	19/5/2014	19/5/2014	31	41778	31	42	38	38
	19/5/2014	19/5/2014	32	41778	32	74	74	74
	26/5/2014	26/5/2014	33	41785	33	107	97	97
	26/5/2014	26/5/2014	34	41785	34	13	13	13
	26/5/2014	26/5/2014	35	41785	35	32	28	28
	26/5/2014	26/5/2014	36	41785	36	13	12	12
	26/5/2014	26/5/2014	37	41785	37	6	6	6
	26/5/2014	26/5/2014	38	41785	38	29	29	29
	26/5/2014	26/5/2014	39	41785	39	8	8	8
	26/5/2014	26/5/2014	40	41785	40	10	9	9

#	Date		Sample		Colony Confirmations			Total Confirmed Enterococci
	Collected	Analysed	Lab Number	Reference	#	S&B	BAAA	
	26/5/2014	26/5/2014	41	41785	41	17	17	17
	26/5/2014	26/5/2014	42	41785	42	13	11	11
	1/12/2014	1/12/2014	43	41974	43	7	5	5
	1/12/2014	1/12/2014	44	41974	44	15	7	7
	1/12/2014	1/12/2014	45	41974	45	16	10	10
	1/12/2014	1/12/2014	46	41974	46	15	12	12
	1/12/2014	1/12/2014	47	41974	47	23	16	16
	1/12/2014	1/12/2014	48	41974	48	55	40	40
	1/12/2014	1/12/2014	49	41974	49	37	35	35
	1/12/2014	1/12/2014	50	41974	50	36	36	36
	1/12/2014	1/12/2014	51	41974	51	93	90	90
	1/12/2014	1/12/2014	52	41974	52	49	44	44
	1/12/2014	1/12/2014	53	41974	53	30	26	26
	1/12/2014	1/12/2014	54	41974	54	45	44	44
	8/12/2014	8/12/2014	55	41981	55	55	48	48
	8/12/2014	8/12/2014	56	41981	56	51	50	50
	8/12/2014	8/12/2014	57	41981	57	100	97	97
	8/12/2014	8/12/2014	58	41981	58	44	30	30
	8/12/2014	8/12/2014	59	41981	59	93	85	85
	8/12/2014	8/12/2014	60	41981	60	92	92	92
	8/12/2014	8/12/2014	61	41981	61	80	76	76
	8/12/2014	8/12/2014	62	41981	62	135	51	51
	8/12/2014	8/12/2014	63	41981	63	112	46	46
	8/12/2014	8/12/2014	64	41981	64	50	28	28
	8/12/2014	8/12/2014	65	41981	65	54	31	31
	8/12/2014	8/12/2014	66	41981	66	78	69	69
	8/12/2014	8/12/2014	67	41981	67	75	75	75
	8/12/2014	8/12/2014	68	41981	68	46	26	26
	15/12/2014	15/12/2014	69	41988	69	70	56	56
	15/12/2014	15/12/2014	70	41988	70	78	63	63
	15/12/2014	15/12/2014	71	41988	71	83	80	80
	15/12/2014	15/12/2014	72	41988	72	63	32	32

Πίνακας XXX: Confirmation Enterolert-DW

Date		Sample		Well Confirmations		
Collected	Analysed	Lab Number	Reference	#	Columbia Blood Agar	Maldi-Toff
22/4/2014	22/4/2014	01	41751	1	v	Enterococcus faecium
22/4/2014	22/4/2014	02	41751	2	v	Enterococcus casseliflavus
22/4/2014	22/4/2014	03	41751	3	v	Enterococcus faecium
22/4/2014	22/4/2014	04	41751	4	v	Enterococcus faecalis
22/4/2014	22/4/2014	05	41751	5	v	Enterococcus faecalis
22/4/2014	22/4/2014	06	41751	6	v	Enterococcus faecium
22/4/2014	22/4/2014	07	41751	7	v	Enterococcus casseliflavus
22/4/2014	22/4/2014	08	41751	8	v	Enterococcus faecium
6/5/2014	6/5/2014	09	41765	9	v	Enterococcus faecium
6/5/2014	6/5/2014	10	41765	10	v	Enterococcus faecium
6/5/2014	6/5/2014	11	41765	11	v	Enterococcus faecalis
6/5/2014	6/5/2014	12	41765	12	v	Enterococcus faecalis
6/5/2014	6/5/2014	13	41765	13	v	Enterococcus faecalis
6/5/2014	6/5/2014	14	41765	14	v	Enterococcus durans
6/5/2014	6/5/2014	15	41765	15	v	Enterococcus faecium
6/5/2014	6/5/2014	16	41765	16	v	Enterococcus faecium
6/5/2014	6/5/2014	17	41765	17	v	Enterococcus faecium
6/5/2014	6/5/2014	18	41765	18	v	Enterococcus faecium
6/5/2014	6/5/2014	19	41765	19	v	Enterococcus faecium
6/5/2014	6/5/2014	20	41765	20	v	Enterococcus faecium
6/5/2014	6/5/2014	21	41765	21	v	Enterococcus faecalis
6/5/2014	6/5/2014	22	41765	22	v	Enterococcus faecalis
6/5/2014	6/5/2014	23	41765	23	v	Enterococcus hirae
19/5/2014	19/5/2014	24	41778	23	v	Enterococcus faecalis
19/5/2014	19/5/2014	25	41778	25	v	Enterococcus faecium
19/5/2014	19/5/2014	26	41778	26	v	Enterococcus faecalis
19/5/2014	19/5/2014	27	41778	27	v	Enterococcus faecium
19/5/2014	19/5/2014	28	41778	28	v	Enterococcus hirae
19/5/2014	19/5/2014	29	41778	29	v	Enterococcus faecalis
19/5/2014	19/5/2014	30	41778	30	v	Enterococcus faecium
19/5/2014	19/5/2014	31	41778	31	v	Enterococcus faecium
19/5/2014	19/5/2014	32	41778	32	v	Enterococcus faecium
26/5/2014	26/5/2014	33	41785	33	v	Enterococcus faecium
26/5/2014	26/5/2014	34	41785	34	v	Enterococcus faecium
26/5/2014	26/5/2014	35	41785	35	v	Enterococcus faecium
26/5/2014	26/5/2014	36	41785	36	v	Enterococcus faecalis
26/5/2014	26/5/2014	37	41785	37	v	Enterococcus faecium
26/5/2014	26/5/2014	38	41785	38	v	Enterococcus faecium
26/5/2014	26/5/2014	39	41785	39	v	Enterococcus faecium
26/5/2014	26/5/2014	40	41785	40	v	Enterococcus faecium

Date		Sample		Well Confirmations		
Collected	Analysed	Lab Number	Reference	#	Columbia Blood Agar	Maldi-Toff
26/5/2014	26/5/2014	41	41785	41	v	Enterococcus faecium
26/5/2014	26/5/2014	42	41785	42	v	Enterococcus faecium
1/12/2014	1/12/2014	43	41974	43	v	Enterococcus faecium
1/12/2014	1/12/2014	44	41974	44	v	Enterococcus faecium
1/12/2014	1/12/2014	45	41974	45	v	Enterococcus faecium
1/12/2014	1/12/2014	46	41974	46	v	Enterococcus faecium
1/12/2014	1/12/2014	47	41974	47	v	Enterococcus durans
1/12/2014	1/12/2014	48	41974	48	v	Enterococcus faecalis
1/12/2014	1/12/2014	49	41974	49	v	Enterococcus faecalis
1/12/2014	1/12/2014	50	41974	50	v	Enterococcus faecium
1/12/2014	1/12/2014	51	41974	51	v	Enterococcus faecalis
1/12/2014	1/12/2014	52	41974	52	v	Enterococcus faecium
1/12/2014	1/12/2014	53	41974	53	v	Enterococcus faecalis
1/12/2014	1/12/2014	54	41974	54	v	Enterococcus faecalis
8/12/2014	8/12/2014	55	41981	55	v	Enterococcus faecium
8/12/2014	8/12/2014	56	41981	56	v	Enterococcus faecium
8/12/2014	8/12/2014	57	41981	57	v	Enterococcus faecium
8/12/2014	8/12/2014	58	41981	58	v	Enterococcus faecium
8/12/2014	8/12/2014	59	41981	59	v	Enterococcus faecium
8/12/2014	8/12/2014	60	41981	60	v	Enterococcus faecium
8/12/2014	8/12/2014	61	41981	61	v	Enterococcus faecium
8/12/2014	8/12/2014	62	41981	62	v	Enterococcus faecalis
8/12/2014	8/12/2014	63	41981	63	v	Enterococcus faecalis
8/12/2014	8/12/2014	64	41981	64	v	Enterococcus faecalis
8/12/2014	8/12/2014	65	41981	65	v	Enterococcus hirae
8/12/2014	8/12/2014	66	41981	66	v	Enterococcus casseliflavus
8/12/2014	8/12/2014	67	41981	67	v	Enterococcus faecium
8/12/2014	8/12/2014	68	41981	68	v	Enterococcus faecium
15/12/2014	15/12/2014	69	41988	69	v	Enterococcus faecium
15/12/2014	15/12/2014	70	41988	70	v	Enterococcus faecium
15/12/2014	15/12/2014	71	41988	71	v	Enterococcus faecalis
15/12/2014	15/12/2014	72	41988	72	v	Enterococcus faecalis

