



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

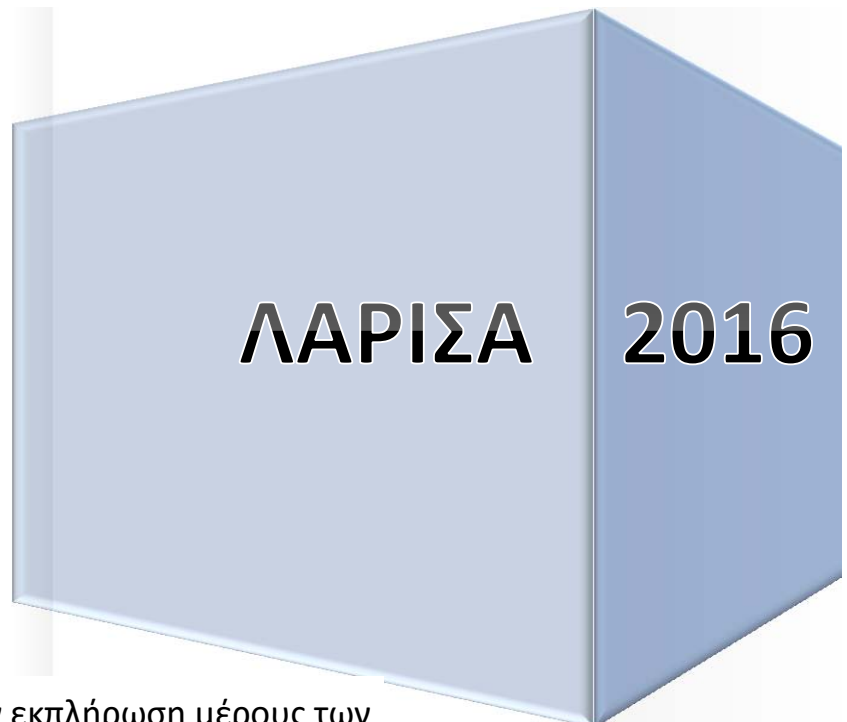
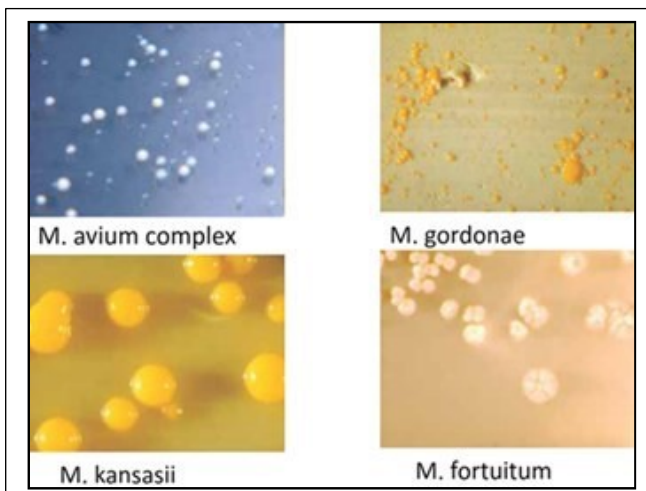
Διευθυντής: Καθηγητής Κωνσταντίνος Ι. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ

Διδακτορική Διατριβή

**“ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ
ΑΠΟ ΑΤΥΠΑ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ – ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟΣ, ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΚΑΙ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ
ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (ΥΔΑΤΩΝ & ΕΔΑΦΩΝ)”**

υπό

ΕΛΕΝΗΣ Γ. ΔΟΒΡΙΚΗ, MSc Περιβαλλοντολόγου



Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

© 2016 Ελένη Δοβρίκη

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (.../..... ΓΣΕΣ):

1^{ος} Εξεταστής (Επιβλέπων)	Δρ. Κωνσταντίνος Ι. Γουργουλιάνης Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2^{ος} Εξεταστής	Δρ. Έφη Πετεινάκη Αν. Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3^{ος} Εξεταστής	Δρ. Χρήστος Χατζηχριστοδούλου Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
4^{ος} Εξεταστής	Δρ. Αναστάσιος Γερμενής Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
5^{ος} Εξεταστής	Δρ. Παναγιώτης Νάστος Καθηγητής Κλιματολογίας, Τμήματος Γεωλογίας και Γεωπεριβάλλοντος, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
6^{ος} Εξεταστής	Δρ. Ζωή Δανιήλ Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
7^{ος} Εξεταστής	Δρ. Γεώργιος Ραχιώτης Επίκουρος Καθηγητής Επιδημιολογίας και Επαγγελματικής Υγιεινής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ιδιαίτερα θέλω να αναφερθώ στον επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη, εκφράζοντας την ευγνωμοσύνη μου και τις θερμές ευχαριστίες μου, διότι μου εμπιστεύθηκε την εκπόνηση αυτής της διδακτορικής διατριβής. Η καθοδήγηση, η ενθάρρυνση και συμπαράσταση που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής, καθώς και η αμέριστη βοήθειά του ήταν καθοριστική. Πάντα θα θυμάμαι την συνεργασία που είχα μαζί του, θεωρώντας τον εαυτό μου ιδιαίτερα τυχερό άνθρωπο που είχα τη δυνατότητα να συνεργαστώ μαζί του.

Επίσης, εκφράζω τις θερμές ευχαριστίες μου στα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, στην κ. Έφη Πετεινάκη, Αν. Καθηγήτρια Μικροβιολογίας και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Κλινικής Χημείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και στον Καθηγητή κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου, Καθηγητή Υγιεινής και Επιδημιολογίας και Διευθυντή του Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, οι οποίοι ήταν πάντοτε στη διάθεσή μου για να με καθοδηγήσουν και να απαντήσουν στα ερωτήματά μου. Τους ευχαριστώ από την καρδιά μου.

Επιπρόσθετα, ευχαριστώ θερμά τους υπευθύνους της ΔΕΥΑ Λάρισας και ιδιαίτερα την Υπεύθυνη του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου κ. Δήμητρα Ντινούλη, η οποία με την πολύχρονη εμπειρία της συνέβαλε στην επιτυχία της παρούσας έρευνας.

Τέλος, ευχαριστώ τον κ. Άγγελο Παπαϊωάννου, Καθηγητή Βιοχημείας-Κλινικής Χημείας στο Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων του ΤΕΙ Θεσσαλίας και σύζυγό μου, για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθειά του.

Ελένη Δοβρίκη

4

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο: Ελένη Δοβρίκη
Τόπος και Έτος Γεννήσεως: Δράμα, 1977
Διεύθυνση Κατοικίας: Αιολίδος 2, 41334 Λάρισα
Τηλέφωνο: 2410 612 484

Σπουδές – Ακαδημαϊκοί Τίτλοι

Πτυχίο: Διαχείριση Αγροτικού Περιβάλλοντος & Φυσικών Πόρων, Γεωπονικής Σχολής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
Μεταπτυχιακό Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία & Περιβαλλοντική Υγιεινή, Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημοσιευμένο Επιστημονικό Έργο

A. Διεθνή Έγκριτα Επιστημονικά Περιοδικά

1. **Dovriki E.**, Gerogianni I., Petinaki E., Hadjichristodoulou Ch., Papaioannou A., Gourgoulianis K. "Isolation and Identification of Non Tuberculous Mycobacteria from Hospitalized Patients and Drinking Water Samples - Examination of their Correlation by Chemometrics". *Environ Monit Assess.* 2016 (DOI: 10.1007/s10661-016-5258-7).
2. Papaioannou A., Mavridou A., Hadjichristodoulou C., Papastergiou P., Pappa O., **Dovriki E.**, Rigas I. "Application of Multivariate Statistical Methods for Groundwater Physicochemical and Biological Quality Assessment in the Context of Public Health". *Environ Monit Assess.* 2010, 170: 1-4; 87-97.
3. Papaioannou A., **Dovriki E.**, Rigas N., Plageras P., Rigas I., Kokkora M., Papastergiou P. "Assessment and Modelling of Groundwater Quality Data by Environmentric Methods in the Context of Public Health". *Water Resources Management* 2010, 24: 12; 3257-3278.

4. Papaioannou A., Rigas N., Rigas G., Paliatsos AG., Nastos PT., Plageras P., Roupa Z., Kakavas KV., **Dovriki E.** Multivariate Statistical Interpretation of Soil Quality Data in the Context of Public Health. *Fresenius Environmental Bulletin* 2009, 18: 2; 204-212.

B. Διεθνή Επιστημονικά Συνέδρια με σύστημα κριτών και τήρηση πρακτικών

1. **Dovriki E.**, Kokkora M., Gourgoulianis Kl., Hadjichristodoulou Ch., Petinaki E., Gerogianni I., G Rigas, Dinouli D., Papaioannou A. **Assessment and modelling river quality data by environmetric methods.** *In: PROTECTION2010.*
2. Rigas I., **Dovriki E.**, Rigas N., Paliatsos AG., Plageras P., Papaioannou A. **CHEMOMETRIC CHARACTERIZATION OF GROUNDWATER QUALITY FROM DIFFERENT WELLS – DRINKING WATER SUPPLIERS.** *In: 15th International Symposium on Environmental Pollution and its Impact on Life in the Mediterranean Region, October 7-11, 2009, Bari, Italy.*
3. Rigas N., **Dovriki E.**, Rigas I., Goula IM., Kantas D., Plageras P., Papaioannou A. **MULTIVARIATE ANALYSIS OF SEVEN YEARS DRINKING WATER QUALITY DATA FROM THESSALY REGION – CENTRAL GREECE.** *In: 11th INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENTAL SCIENCE AND TECHNOLOGY– 2009 (CEST2009), September 3rd - 5th, 2009, CHANIA, CRETE, GREECE.*

Γ. Πανελλήνια Συνέδρια με σύστημα κριτών και τήρηση πρακτικών

1. **Δοβρίκη E.**, Πετεινάκη E., Χατζηχριστοδούλου Χ., Παπαϊωάννου Α., Γερογιάννη E., Γουργουλιάνης Κ. **«ΑΤΥΠΑ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΑ – ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ».** 21ου Πανελληνίου Πνευμονολογικού Συνεδρίου, Αθήνα 2012.
2. **Δοβρίκη E.**, Γερογιάννη E., Πετεινάκη E., Χατζηχριστοδούλου Χ., Γουργουλιάνης Κ. **«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΑΤΥΠΩΝ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΥΤΑ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΣΕ ΠΟΣΙΜΟ ΝΕΡΟ».** 24^{ου} Πανελληνίου Πνευμονολογικού Συνεδρίου, Αθήνα 2015.

**“ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ
ΑΠΟ ΑΤΥΠΑ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ – ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟΣ, ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΚΑΙ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ
ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ”**

ΕΛΕΝΗ ΔΟΒΡΙΚΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Δρ. Κωνσταντίνος Ι. Γουργουλιάνης**, Καθηγητής Πνευμονολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας – **(Επιβλέπων)**
- 2. Δρ. Έφη Πετεινάκη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3. Δρ. Χρήστος Χατζηχριστοδούλου**, Καθηγητής Υγιεινής και
Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λάρισα, 2016

Περίληψη

Τα άτυπα ή περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια (NTM) υπάρχουν ευρέως διασκορπισμένα στο περιβάλλον, και είναι πλέον γνωστό ότι ορισμένα από αυτά είναι δυνητικά παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα. Η μετάδοση των NTM στον άνθρωπο και τα ζώα, σύμφωνα με τις μέχρι σήμερα ερευνητικές μελέτες, πραγματοποιείται μέσω του νερού και των αερολυμάτων, ενώ ελάχιστες μελέτες αναφέρουν μετάδοσή τους από άνθρωπο σε άνθρωπο. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν θετικοί σε NTM ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, την περίοδο 2003 – 2013, καθώς και δείγματα πόσιμου ύδατος από τις περιοχές μόνιμης κατοικίας των θετικών σε NTM ασθενών, την περίοδο 2010-2013. Για την απομόνωση και ταυτοποίηση των NTM στο πόσιμο ύδωρ, χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας για την απομόνωση και ταυτοποίηση του *M. tuberculosis* και των NTM, σε κλινικά δείγματα. Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκε η ποιότητα των δειγμάτων πόσιμου ύδατος με προσδιορισμό των φυσικοχημικών, βιολογικών και μικροβιολογικών παραμέτρων, σύμφωνα με την ευρωπαϊκή οδηγία 98/83. Για τη διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης μεταξύ των NTM που βρέθηκαν σε ασθενείς και στα δείγματα του πόσιμου ύδατος, εφαρμόστηκαν δύο χημειομετρικές μέθοδοι πολυπαραγοντικής ανάλυσης, για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία. Οι παράμετροι που αναλύθηκαν ήταν: «NTM σε ασθενείς», «NTM στο πόσιμο ύδωρ», «Φύλο του ασθενούς», «Προέλευση βιολογικού δείγματος» και «Προέλευση δείγματος πόσιμου ύδατος». Συνολικά, μελετήθηκαν 367 ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας, την περίοδο 2003-2010 και βρέθηκαν θετικοί σε NTM. Ακολούθως προσδιορίστηκε η περιοχή μόνιμης κατοικίας τους. Με βάση αυτή (30 διαφορετικές περιοχές του Νομού Λάρισας), προσδιορίστηκαν τα σημεία δειγματοληψίας του πόσιμου ύδατος. Τα βιολογικά δείγματα που βρέθηκαν θετικά σε NTM προήλθαν από την πνευμονολογική κλινική σε ποσοστό 40,9%, από τη γαστρεντερική κλινική σε ποσοστό 3,0%, από την παθολογική κλινική σε ποσοστό 45,5% και από τη ρευματολογική κλινική σε ποσοστό 3,3%, ενώ το υπόλοιπο των δειγμάτων προήλθε από άλλες κλινικές. Από τα 383 NTM που απομονώθηκαν από τα κλινικά δείγματα, τα πιο συχνά απαντώμενα NTM ήταν το *M. fortuitum* (n = 118,

30,8%), το *M. gordonae* (n = 87, 22,7%), το *M. peregrinum* (n = 46, 12,0 %), το *M. chelonae* (n = 11, 2,9%), το *M. avium* (n = 8, 2,1%) και το *M. intracellulare* (n = 7, 1,8%), ενώ 88 NTM (23,0%) που απομονώθηκαν δεν ταυτοποιήθηκαν. Σημειώνεται ότι, σε 8 ασθενείς απομονώθηκε το *M. tuberculosis* μαζί με ένα NTM, σε 15 ασθενείς μαζί με δύο 2 NTM, ενώ σε έναν ασθενή μαζί με τρία NTM. Συνολικά αναλύθηκαν 3360 δείγματα πόσιμου νερού που συλλέχθηκαν από τις 30 τοποθεσίες μόνιμης κατοικίας των θετικών σε NTM ασθενών, για την περίοδο 2010-2013. Το 11.2% των δειγμάτων πόσιμου ύδατος βρέθηκε θετικό σε NTM. Με εφαρμογή δύο πολυπαραγοντικών μεθόδων ανάλυσης, της Cluster Analysis και της Factor Analysis, προκύπτει ότι τα NTM που βρέθηκαν στους ασθενείς και εκείνα που βρέθηκαν στα δείγματα πόσιμου ύδατος, συσχετίζονται μεταξύ τους. Καμία συσχέτιση δεν βρέθηκε μεταξύ των NTM και των υπολοίπων μελετώμενων φυσικοχημικών, βιολογικών και μικροβιολογικών παραμέτρων ποιότητας του πόσιμου ύδατος. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας ενισχύουν την άποψη ότι το πόσιμο ύδωρ αποτελεί μία πιθανή οδό μετάδοσης των NTM από το περιβάλλον στον άνθρωπο.

Abstract

Nontuberculous mycobacteria (NTM) have been found to be widely dispersed in the environment, being considered potentially pathogenic for humans and animals, and there are rare reports of their human to human transmission. Potential transmission modes of NTM to humans and animals are water and aerosols. Hospitalized patients with NTM for the period 2003 – 2013 and drinking water samples from their residence areas for the period 2010-2013 were studied. Same methods as those used for the isolation and identification of *M. tuberculosis* used for the isolation and identification of NTM, both in clinical specimens as well as in drinking water samples. Two different chemometric methods, Cluster Analysis and Factor Analysis, were first used in the literature to analyze the data matrix consisted of the parameters: NTM in patients, NTM in drinking water, patient gender, source of the biological sample and sampling area of drinking water. Totally, 367 hospitalized patients who lived at 30 different localities in the Prefecture of Larissa (central Greece) were tested positive for NTM. The source of the NTM isolates was respiratory specimens from pulmonary clinic (40.9%), samples from gastrointestinal clinic (3.0%); pathology clinic (45.5%); and rheumatology clinic (3.3%), while the remaining of the samples came from other clinics. In the 383 NTM isolates from the clinical specimens, the most frequently isolated NTM species were *M. fortuitum* (n=118, 30.8%), *M. gordonae* (n=87, 22.7%), *M. peregrinum* (n=46, 12.0%), *M. chelonae* (n=11, 2.9%); *M. avium* (n=8, 2.1%), *M. intracellulare* (n=7, 1.8%), while 88 (23.0%) of these isolated were not identified. Noted that *M. tuberculosis* isolated with NTM in 8 patients and 2 NTM were isolated together in 15 patients while 3 NTM together were isolated in 1 patient. Additionally, 3360 drinking water samples were collected from the 30 localities and analyzed for the period 2010 to 2013, and 11.2% of them found NTM positive. Cluster Analysis and Factor Analysis results show that the NTM found in patients and those found in the drinking water samples correlated to each other. No other association was found between the parameter “NTM” and the other studied parameters of drinking water (physicochemical, biological and microbiological quality parameters of drinking water). These results provide some indications that drinking water could be linked with NTM

cases in humans.

Πρόλογος

Η εν λόγω διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Πνευμονολογικής Κλινικής και στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, καθώς επίσης και στο Εργαστήριο Ποιότητας Ύδατος της ΔΕΥΑ Λάρισας.

Βασικό αντικείμενο της μελέτης ήταν η ανεύρεση άτυπων μυκοβακτηριδίων: α) σε ασθενείς από την Περιφέρεια Θεσσαλίας, οι οποίοι νοσηλεύτηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας και β) στο πόσιμο ύδωρ του δικτύου ύδρευσης των περιοχών που αποτέλεσαν μόνιμη κατοικία των θετικών σε άτυπα μυκοβακτηρίδια ασθενών. *Κεντρικός στόχος της εργασίας ήταν η διερεύνηση της ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ των άτυπων μυκοβακτηριδίων που βρέθηκαν στο πόσιμο ύδωρ και αυτών που απομονώθηκαν από τους ασθενείς, οι οποίοι είχαν μόνιμη κατοικία στις περιοχές λήψης των δειγμάτων του πόσιμου ύδατος.* Και αυτό, διότι μέχρι και σήμερα, υπάρχουν μόνο ασθενείς ενδείξεις για τον τρόπο μετάδοσης των άτυπων μυκοβακτηριδίων στον άνθρωπο, ενώ οι μέχρι σήμερα λιγοστές και αποσπασματικές μελέτες συνηγορούν στην μετάδοσή τους από το περιβάλλον στο άνθρωπο μέσω του νερού.

Σημειώνεται ότι η επίδραση και ο ρόλος των άτυπων μυκοβακτηριδίων στην υγεία των ανθρώπων και ζώων, καθώς και στην ποιότητα του περιβάλλοντος σχετικά πρόσφατα άρχισε να αναγνωρίζεται. Η μελέτη των λοιμώξεων που οφείλονται στα άτυπα μυκοβακτηρίδια, τα οποία μεταδίδονται από το περιβάλλον στον άνθρωπο και τα ζώα, τυχάνει σήμερα της απαιτούμενης προσοχής και αρκετές επιστημονικές μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε αυτά. Ιδιαίτερα, μετά την ανακάλυψη ότι τα άτυπα μυκοβακτηρίδια είναι υπεύθυνα για έναν αριθμό λοιμώξεων, κυρίως σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή, σε ασθενείς με το σύνδρομο της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS), καθώς και σε ασθενείς που ανήκουν σε ευάλωτες ομάδες, όπως ηλικιωμένους και παιδιά.

Πίνακας Περιεχομένων

Συντομογραφίες		16
Κατάλογος Εικόνων		17
Κατάλογος Πινάκων		21
Κεφάλαιο 1^ο	Εισαγωγή	24
Κεφάλαιο 2^ο	Άτυπα Μυκοβακτηρίδια	31
	2.1 Ιστορική Αναδρομή	31
	2.2 Χαρακτηριστικά των NTM	35
Κεφάλαιο 3^ο	Ταξινόμηση Μυκοβακτηριδίων	39
	3.1 Γενικά	39
	3.2 Ταξινόμηση κατά Runyon	40
	3.3 Ταξινόμηση κατά Wayne et al.	47
	3.4 Ταξινόμηση κατά Woolinsky	47
	3.5 Οδηγίες για τα Άτυπα Μυκοβακτηρίδια	49
Κεφάλαιο 4^ο	Επιδημιολογία των NTM	51
	4.1 Γενικά	51
	4.2 Λοιμώξεις – Άτυπα Μυκοβακτηρίδια	53
	4.2.1 Πνευμονικές Λοιμώξεις	54
	4.2.2 Λεμφαδενίτιδα	59
	4.2.3 Δερματοπάθειες	61
	4.2.4 Γενικευμένη Νόσος από NTM σε Ασθενείς με AIDS	64
Κεφάλαιο 5^ο	Παραφυματίωση	67
	5.1 <i>M. ratatuberculosis</i> Λοιμώξεις	67
Κεφάλαιο 6^ο	Ποιότητα Πόσιμου Ύδατος & Δημόσια Υγεία	70

Κεφάλαιο 7°	Μυκοβακτηρίδια & Περιβάλλον	74
	7.1 Μυκοβακτηρίδια & Περιβάλλον	74
	7.2 Επιφανειακά Ύδατα	75
	7.3 Υφάλμυρα Ύδατα & Θαλασσινό Νερό	76
	7.4 Κολυμβητικές Δεξαμενές	77
	7.5 Πόσιμο Νερό	77
	7.6 Άλλες Πηγές	79
Κεφάλαιο 8°	Άτυπα Μυκοβακτηρίδια – Μέτρα Πρόληψης	82
	8.1 Μέτρα Πρόληψης	82
Κεφάλαιο 9°	Ειδικό Μέρος	84
	9.1 Σκοπός της Μελέτης	84
	9.2 Υλικά & Μέθοδοι	85
	9.2.1 Κλινικά Δείγματα	85
	9.2.2 Καλλιέργεια των Δειγμάτων	89
	9.3 Οξεάντοχη χρώση Ziehl - Nielsen	93
	9.4 Ταυτοποίηση των Άτυπων Μυκοβακτηριδίων	94
	9.5 Δείγματα Πόσιμου Ύδατος	99
	9.5.1 Δειγματοληψία	100
	9.5.2 Μέθοδος Διήθησης Μέσω Μεμβράνης	101
	9.5.3 Μέθοδος MGIT OADC	104
	9.5.4 Βιοχημικά Τεστ για την Ταυτοποίηση των NTM	106
	9.6 Μέθοδοι Προσδιορισμού Φυσικοχημικών Παραμέτρων	112
	9.7 Μέθοδοι Προσδιορισμού Μικροβιολογικών Παραμέτρων	121
Κεφάλαιο 10°	Αποτελέσματα	126
	10.1 Επιμέρους Στάδια Κεντρικού Στόχου της Διατριβής	126
	10.2 Δημιουργία Βάσης Δεδομένων με τους Θετικούς σε NTM Ασθενείς του ΠΝΛ	127
	10.3 Εκατοστιαία αναλογία φύλου θετικών σε NTM ασθενών από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας	128
	10.4 Κλινικές του ΠΝΛ από τις οποίες προήλθαν τα θετικά σε NTM δείγματα ασθενών από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας	129
	10.5 Είδη βιολογικού δείγματος από το οποίο απομονώθηκαν NTM από ασθενείς από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας	130

10.6	Είδη NTM που απομονώθηκαν από ασθενείς από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας	131
10.7	Προσδιορισμός μόνιμης κατοικίας των θετικών σε NTM ασθενών	132
10.7.1	Σημεία Δειγματοληψίας Πόσιμου Ύδατος	133
10.8	Εκατοστιαία αναλογία φύλου θετικών σε NTM ασθενών από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας	136
10.9	Προέλευση των βιολογικών δειγμάτων από τα οποία απομονώθηκαν NTM, από την ευρύτερη περιοχή του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας	137
10.10	Είδη των NTM που απομονώθηκαν από ασθενείς από την ευρύτερη περιοχή του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας	138
10.11	Είδη των NTM που απομονώθηκαν από δείγματα πόσιμου ύδατος	139
10.12	Φυσικοχημικός & Βιολογικός Έλεγχος Ποιότητας Πόσιμου Ύδατος	140
10.13	Μικροβιολογικός Έλεγχος Ποιότητας Πόσιμου Ύδατος	142
10.14	Πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση	144
10.14.1	Εφαρμογή της Cluster Analysis	145
10.14.2	Εφαρμογή της Factor Analysis	147
10.14.3	Εφαρμογή Cluster Analysis για την ομαδοποίηση των μελετώμενων ασθενών	151
10.14.4	Εφαρμογή της Cluster Analysis στις επιμέρους ομάδες (A – F)	152
10.14.5	Εφαρμογή της Factor Analysis στις επιμέρους ομάδες (A – F)	155
10.14.6	Εφαρμογή Cluster Analysis ((K-Means Clustering)	156
10.14.7	Εφαρμογή Factor Analysis, με βάση τα αποτελέσματα της k-means Cluster Analysis	157
Κεφάλαιο 11^ο	Συζήτηση	160
	Σύνοψη	167
	Βιβλιογραφία	168

Συντομογραφίες

Συντομογραφία	Επεξήγηση
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ΑΡΗΑ	American Public Health Association
ATS	American Thoracic Society
BTS	British Thoracic Society
CA	Cluster Analysis
EC	European Communities
EK	Ευρωπαϊκές Κοινότητες
EPA	Environmental Protection Agency (US)
EU	European Union
FA	Factor Analysis
HIV	Human Immunodeficiency Virus
H-NTM	NTM που βρέθηκε σε ασθενή
MAC	Mycobacterium avium complex
OADC	Oleic acid-Albumin-Dextrose- Catalase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEM	Pathogenic Environmental Mycobacteria
RGM	Rapid-Growing Mycobacteria
SGM	Slow-Growing Mycobacteria
VF _s	VariFactors
WHO	World Health Organization
W-NTM	NTM που βρέθηκε σε δείγμα πόσιμου ύδατος
NTM	Non-Tuberculous Mycobacteria
ΠΝΛ	Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα	Λεζάντα
Εικόνα 1.1	Παγκόσμια διασπορά NTM από πνευμονικά δείγματα για το 2008 [(α) <i>Mycobacterium avium</i> complex, β) <i>M. Kansasii</i> , γ) <i>M. Xenopi</i> , δ) <i>M. Malmoense</i> , ε) <i>M. Abscessus</i> και στ) <i>M. fortuitum</i>].
Εικόνα 2.1	Διάκριση οξεάντοχων από μη οξεάντοχα βακτήρια με χρώση.
Εικόνα 3.1	Χρωματισμός (α) φωτοχρωμογόνων, (β) σκοτοχρωμογόνων και (γ) μη φωτοχρωμογόνων NTM.
Εικόνα 3.2	Αλλαγή χρώματος των αποικιών του <i>M. Kansasii</i> (α) στο σκοτάδι και (β) στο φως.
Εικόνα 3.3	Κίτρινες αποικίες των σκοτοχρωμογόνων άτυπων μυκοβακτηριδίων στο φως και στο σκοτάδι.
Εικόνα 3.4	Μη χρωμογόνα άτυπα μυκοβακτηρίδια.
Εικόνα 4.1	Διασπορά των NTM από ασθενείς με αναπνευστική νόσο (MAC: <i>Mycobacterium avium</i> complex; RGM: rapid-growing mycobacteria; SGM: slow-growing mycobacteria).
Εικόνα 4.2	Αποικίες <i>M. Avium</i> complex, <i>M. gordonae</i> , <i>M. kansasii</i> και <i>M. fortuitum</i> σε 7H11 άγαρ θρεπτικό υλικό.
Εικόνα 4.3	Διασπορά NTM από πνευμονικά δείγματα στην Ευρώπη το 2008 (MAC: <i>Mycobacterium avium</i> complex; RGM: rapid-growing mycobacteria; SGM: slow-growing mycobacteria).
Εικόνα 4.4	<i>M. Kansasii</i> και <i>M. Avium</i> .

- Εικόνα 4.5 Λοίμωξη πνευμόνων από NTM και συμπτώματα αυτής, (α) Λοίμωξη πνευμόνων από *Mycobacterium avium complex* (MAC), ως δευτερεύουσα λοίμωξη σε ασθενή με AIDS, HIV.
- Εικόνα 4.6 (α) Τα *M. avium complex* μυκοβακτηρίδια είναι κοντύτερα από το *M. tuberculosis* και (β) τα *M. tuberculosis* είναι αρκετά μεγάλα σε μήκος (κόκκινες γραμμές).
- Εικόνα 4.7 Διαφορές στις αποικίες *M. tuberculosis* και MAC.
- Εικόνα 4.8 Λεμφαδενίτιδες από NTM.
- Εικόνα 4.9 *Αποικίες του M. fortuitum*
- Εικόνα 4.10 Δερματικές λοιμώξεις από *M. Marinum*.
- Εικόνα 4.11 Δερματικές λοιμώξεις από *M. ulcerans*.
- Εικόνα 4.12 Δερματική λοίμωξη από *M. Chelonae*.
- Εικόνα 5.1 Παραφυματίωση προβάτου από *M. paratuberculosis*.
- Εικόνα 9.1. Διαδικασία απομόνωσης και ταυτοποίησης των άτυπων μυκοβακτηριδίων από κλινικά δείγματα ασθενών.
- Εικόνα 9.2 Θρεπτικό υλικό Lowenstein – Jensen (πράσινο λόγω της παρουσίας της ουσίας πράσινο του μαλαχίτη.
- Εικόνα 9.3 Δεξιά: Αποικίες *M. tuberculosis* και αριστερά: Αποικίες *M. smegmatis*, σε θρεπτικό υλικό Middlebrook 7H10.
- Εικόνα 9.4 Αντιδραστήρια της μεθόδου BD MGIT OADC.
- Εικόνα 9.5 Έλεγχος των σωληναρίων μετά την ολοκλήρωση της μεθόδου MGIT. Τα θετικά σε NTM σωληνάκια φθορίζουν στο UV.

- Εικόνα 9.6 Οξεάντοχη χρώση (Ziehl-Nielsen).
- Εικόνα 9.7 Χρώση Ziehl-Nielsen του *M. goodnae*.
- Εικόνα 9.8 Αρχή της μεθόδου GenoType Mycobacterium CM της εταιρείας Hain Lifescience, Germany.
- Εικόνα 9.9 Είδη NTM που ταυτοποιούνται με τη μέθοδο GenoType Mycobacterium CM / AS.
- Εικόνα 9.10 Είδη NTM που ταυτοποιούνται με τη μέθοδο Genotype mycobacteria Direct.
- Εικόνα 9.11 Στάδια της μεθόδου MGIT.
- Εικόνα 9.12 Δοκιμασία αναγωγής νιτρικών ιόντων.
- Εικόνα 9.13 Δοκιμασία Υδρόλυσης του TWEEN 80.
- Εικόνα 9.14 Θετικό τεστ καταλάσης, παραγωγή φυσαλίδων οξυγόνου.
- Εικόνα 9.15 Δοκιμή Αναγωγής Τελουρικών.
- Εικόνα 9.16 Δοκιμασία Παραγωγής Αρυλοσουλφατάσης.
- Εικόνα 10.1 Στάδια κεντρικού στόχου της διατριβής κατά σειρά υλοποίησης.
- Εικόνα 10.2 Εκατοστιαία αναλογία αρένων και θήλυ ασθενών θετικών σε NTM από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας (κόκκινο = άρρεν, 65% και πράσινο = θήλυ, 35%).
- Εικόνα 10.3 Κλινικές (%) του ΠΝΛ από τις οποίες προήλθαν τα θετικά σε NTM δείγματα ασθενών από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας.
- Εικόνα 10.4 Είδη βιολογικού δείγματος (%) από το οποίο απομονώθηκαν NTM [11, 12 = πτύελα, 10, 13-26) = διάφορα βιολογικά δείγματα].

- Εικόνα 10.5 Διαφορετικά είδων NTM (%) που απομονώθηκαν από ασθενείς από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας.
- Εικόνα 10.6 Περιοχές Μόνιμης κατοικίας ασθενών θετικών σε NTM.
- Εικόνα 10.7 Χάρτης του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας με τις περιοχές δειγματοληψίας πόσιμου ύδατος.
- Εικόνα 10.8 Κατανομή φύλου των θετικών σε NTM ασθενών από την περιοχή του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας [άρρεν (n=248 ασθενείς, 67.6%) και θήλυ (n=119 ασθενείς, 2.4%)].
- Εικόνα 10.9 Προέλευση βιολογικών δειγμάτων που βρέθηκαν θετικά σε NTM ανά κλινική του ΠΝΛ, από ασθενείς της ευρύτερης περιοχής του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας.
- Εικόνα 10.10 Είδη των NTM που απομονώθηκαν από ασθενείς από την ευρύτερη περιοχή του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας.
- Εικόνα 10.11 Συχνότητα των ειδών NTM που απομονώθηκαν από τα δείγματα πόσιμου ύδατος, από τις περιοχές μόνιμης κατοικίας των θετικών σε NTM ασθενών.
- Εικόνα 10.12 Δενδρόγραμμα που παράγεται με εφαρμογή της Cluster Analysis
- Εικόνα 10.13 Γραφική παράσταση των παραγόντων VF1 και VF2 στον χώρο.
- Εικόνα 10.14 Γραφική παράσταση των VF1 συναρτήσει των VF2 και VF3.
- Εικόνα 10.15 Δενδρόγραμμα ομαδοποίησης μελετώμενων ασθενών.
- Εικόνα 10.16 Δενδρογράμματα για κάθε ομάδα – cluster (A-F).
- Εικόνα 10.17 Γραφική απεικόνιση των δύο παραγόντων και των παραμέτρων που περιλαμβάνουν στον χώρο.

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας	Τίτλος
Πίνακας 1.1	Χαρακτηριστικές μελέτες για ορισμένα γνωστά είδη άτυπων μυκοβακτηριδίων και η περιβαλλοντική πηγή προέλευσής τους.
Πίνακας 2.1.	Άτυπα μυκοβακτηρίδια που προκαλούν λοιμώξεις στο μυοσκελετικό σύστημα των ανθρώπων και η πηγή προέλευσής τους.
Πίνακας 2.1	Άτυπα μυκοβακτηρίδια που προκαλούν λοιμώξεις στο μυοσκελετικό σύστημα των ανθρώπων και η πηγή προέλευσής τους.
Πίνακας 3.1	Δυνητικά παθογόνα άτυπα μυκοβακτηρίδια (NTM) για τον άνθρωπο.
Πίνακας 3.2	Άτυπα μυκοβακτηρίδια, τα οποία σπάνια είναι παθογόνα για τον άνθρωπο.
Πίνακας 3.3	Ταξινόμηση κατά Wolinsky, 1979.
Πίνακας 10.1	Αποτελέσματα των προσδιοριζόμενων φυσικοχημικών, βιολογικών και χημικών παραμέτρων ποιότητας πόσιμου ύδατος (Mean = Μέση τιμή, SE = τυπικό λάθος και SD = τυπική απόκλιση).
Πίνακας 10.2	Αποτελέσματα των προσδιοριζόμενων μικροβιολογικών παραμέτρων ποιότητας πόσιμου ύδατος [Επιτρεπόμενα όρια: (cfu/ml): TBF 22oC (100), TBF 37oC (20), (cfu/100ml): Total coliforms (0), E. coli (0), Enterococci Spp. (0), και <i>Cl. perfrigen</i> (0)]

Πίνακας 10.3	Αποτελέσματα (VFs, L) της Factor Analysis (παράμετροι με L μεγαλύτερο ή ίσο με 0.5 θεωρείται ότι συσχετίζονται)
Πίνακας 10.4	VFs και Factor Loadings (Un = Unrotated and Var = Varimax normalized), Eigenvalues, και συνολική διακύμανση (%).
Πίνακας 10.5	Παράμετροι που περιλαμβάνονται σε κάθε παραγόμενο cluster, με εφαρμογή της Cluster Analysis στις ομάδες (A-F).
Πίνακας 10.6	Eigenvalues (διακύμανση (%)) και παράμετροι (L = loading value, Varimax normalized) ανά VF για κάθε μελετώμενη ομάδα, και η ολική διακύμανση (%).
Πίνακας 10.7	Ανάλυση της διακύμανσης.
Πίνακας 10.8	Εξαγωγή νέων παραγόντων για τις μελετώμενες παραμέτρους με βάση τις συσχετίσεις μεταξύ τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

Κεφάλαιο 1^ο – Εισαγωγή

Τα άτυπα μυκοβακτηρίδια περιλαμβάνουν εκείνα τα στελέχη μυκοβακτηριδίων που δεν είναι μέλη του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης (*Mycobacterium tuberculosis*). Εξ' ου και η χρήση των όρων «μυκοβακτηρίδια πλην της φυματίωσης, Non-Tuberculous Mycobacteria (NTM)» και «παθογόνα περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια, Pathogenic Environmental Mycobacteria (PEM)» (*Carson et al. 1978; Collins et al. 1984; Covert et al. 1999, Dailloux et al. 1999; Dobos et al. 1999; du Moulin et al. 1988; EPA 1999; Falkinham et al. 1980; Falkinham 1996; Fischeider et al. 1991; Goslee and Wolinsky 1976; Singleton 1997; WHO 2003*).

Τα άτυπα μυκοβακτηρίδια είναι μία μεγάλη ομάδα μικροοργανισμών που ζει και αναπτύσσεται στο περιβάλλον. Ο ρόλος τους είναι μεγάλης σημασίας για την Δημόσια Υγεία και αυτό γιατί τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση της συχνότητας των λοιμώξεων που οφείλονται σε αυτά. Τα περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια είναι η πιο κοινή αιτία λοιμώξεων και ολόένα και περισσότερο αποδεικνύεται ότι η οδός μετάδοσής τους στον άνθρωπο και στα ζώα είναι το νερό (*Collins et al. 1984; Conger et al. 2004; Engel et al. 1980; Falkinham et al. 1980; Falkinham 1996, 2002, 2003, 2009; Fischeider et al. 1991; Furman et al. 2002; Gardner 2004; Gbery et al. 1996; Gerogianni et al. 2008; Graham et al. 1987; Grange et al. 1995; GRIFFITH 1997; Halstrom et al. 2015; Hanak et al. 2006; Harriff et al. 2007; Havelaar et al. 1985; Haverkamp et al. 2004; Haverkort 2003; Honarvar et al. 2012; Howell et al. 1997; Iffat and Abid 2011; Jarzembowski and Young 2008; Jindal et al. 2003; John and Velotta 2005; Jonson et al. 2007; Kalita et al. 2005; Kane et al. 2007; Kankya et al. 2011; Katoch 2004; Kent et al. 2004; Kheir et al. 2015; Kline et al. 2004; Kroner et al. 2013; Leoni et al. 1999; Lindeboom et al. 2005; Lindeboom 2006; Mahaisavariya et al. 2003; Malecha et al. 2002; Maloney et al. 1994; McSwiggan and Collins 1974; Mendes de Souza et al. 2010; Mijs et al. 2002; Moorthy et al. 2012; Murthy et al. 2013; Nguyen and Pieters 2005; Olson 1981; Ottenhoff et al. 2002; Pai et al. 2003; Parker et al. 1983; Pavlik et al. 2007; Peters and Muller 1995; Phillips and von Reyn 2001; Pittet et al. 2005; Portaels 1995; Rajasekaran and Krokovitz 2013; Ranger et al. 2006; Rodriguez et al. 2006; Rodriguez-Blanco and Fernandez 2011; Rosenblueth et al. 2011; Russell et al. 2014; Ryan et al. 2002; Saito and Tsukamura 1976; Schulz et al. 2005; Schwartz et al. 1998; Sharma et al. 2003; Slosarek et al. 1994; Stine et al. 1987; Takemoto et al. 1996; Thomson et al. 2013; Toekko et al. 2000 & 2001; Tsintzou*

et al. 2000; Tsitko et al. 2006; Vaerewijck et al. 2005; Vantarakis et al. 1998; Vu et al. 2005; Whiley et al. 2012; WHO 2004a,b; Wright et al. 1985; Yip et al. 2007).

Δεδομένου ότι η συχνότητα εμφάνισης της φυματίωσης μειώθηκε, η αναγνώριση λοιμώξεων από άτυπα μυκοβακτηρίδια έγινε πιο εύκολη (Wolinsky 1992). Ο ρόλος των παθογόνων περιβαλλοντικών μυκοβακτηριδίων (Pathogenic Environmental Mycobacteria (PEM)) και ειδικότερα των *Mycobacterium avium Complex (MAC)* στην εμφάνιση λοιμώξεων σε ανοσοκατασταλμένα άτομα έχει αποδειχθεί ότι είναι καθοριστικός, κύρια σε ασθενείς με HIV και AIDS. Βέβαια υπάρχουν και άλλες ασθένειες που προκαλούνται από τα PEM (*Ahn et al. 1979; Aitken et al. 1993; Aksamit 2002; Ali et al. 2007; Archibald and Jarvis 2011; Bamias et al. 2001; Bartalot et al. 2000 & 2005; Bicmen et al. 2010; Billinger et al. 2009; Brown-Elliott et al. 2002; Callaghan and Allen 2003; Chacon et al. 2004; Chalermkulrat et al. 2002 & 2006; Chamberlin and Naser 2006; Coulter and Robson 2004; De Baere et al. 2001; Dhillon and Watenakunakorn 2000; Ding et al. 2006; Dodge et al. 2007; Dolz-Marco et al. 2012; Douglas et al. 2003; Du Moulin et al. 1985; Ebert and Olivier 2002; Editorials 2008; Elahi et al 2011; Ellis 2004; Epton and Winthrop 2012; Falsey et al. 2013; Ford et al. 1988; Garman and Orenge 2003; Go and Jain 2012; Gusmao et al. 2005; Haverkamp et al. 2006; Henry et al. 2004; Hillebrand-Haverkort et al. 1999; Iseman and Marras 2008; Jeong et al. 2004; Johnson and Odell 2013; Jordan et al. 2007; Kahana et al. 1997; Kennedy et al. 2012; Khor et al. 2001; Koh et al. 2007; Li et al. 2003; Lindeboom et al. 2006; Loddenkemper et al. 2005; Iyu et al. 2011; Maekawa et al. 2011; Marcheti et al. 2004; Meier and Beekmann 1995; Mendoza et al. 2009; Mirnejad et al. 2011; Moore 1993; Moore et al. 2010; Mussaffi et al. 2005a,b; Nakamura et al. 2001; Nilsen and Andersen 2009; Noeden and Linell 1951; Olivier et al. 2003a,b; Olsen et al. 2006; Olson 1981; Panagiotou et al. 2014; Panesar et al. 2003; Penn et al. 2011; Pittet et al. 2005; Polesky et al. 2005; Primm et al. 2004; Pumberger et al. 2004; Robson et al. 1999; Roux et al. 2009; Saitz 1981; Shaarawy and Elhawary 2014; Simons et al. 2011; Solyar et al. 2012; Steyaert et al. 2011; Subcommittee of the Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society 2000; Tarantino et al. 2003; Tebruegge and Curtis 2011; Theodorou et al. 2001; Thomas et al. 2013; Tichenor et al. 2012; Tzen et al. 2006; von Reyn et al. 1994 & 2002; Wagner and Young 2004; Wallace et al. 2004; Wendt et al. 1980; Wolinsky 1995; Wong and Lam 1998).*

Τα PEM και κυρίως αυτά που αναφέρονται ως *Mycobacterium avium complex (MAC)*, έχουν ενοχοποιηθεί για ασθένειες όπως:

 Νόσο του Crohn

- ✚ Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας
- ✚ Αδενίτιδα
- ✚ Πνευμονικές λοιμώξεις
- ✚ Δερματικές λοιμώξεις

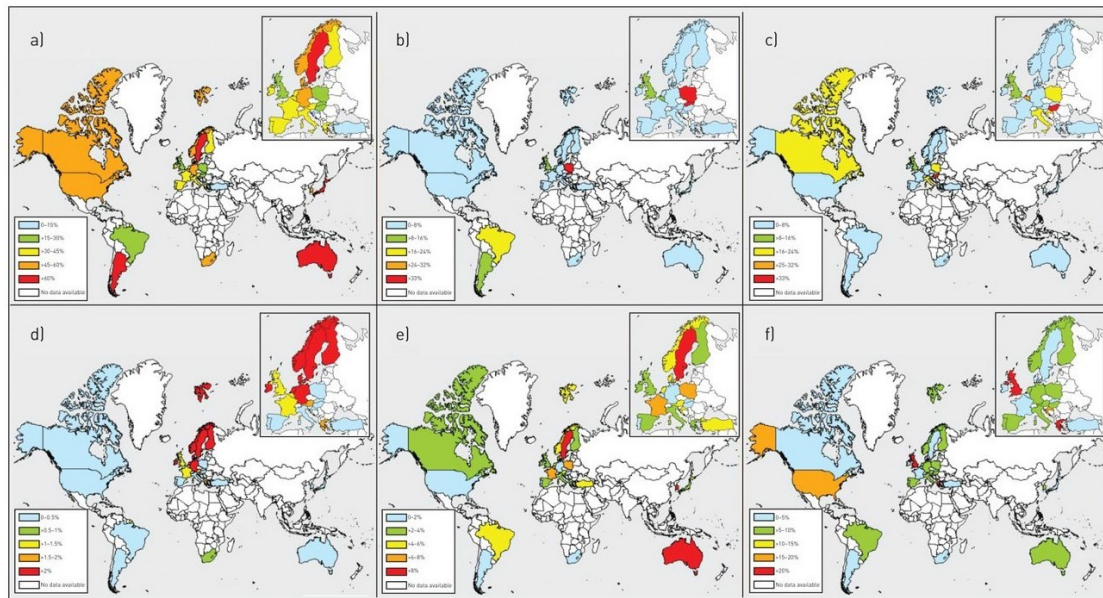
Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζονται χαρακτηριστικές μελέτες για ορισμένα γνωστά είδη άτυπων μυκοβακτηριδίων και η περιβαλλοντική πηγή προέλευσής τους.

Αυξημένο ενδιαφέρον υπάρχει στις λοιμώξεις ανοσοκατασταλμένων ατόμων (κύρια των θετικών σε HIV ατόμων) από MAC μέσω του πόσιμου ύδατος.

Πίνακας 1.1. Χαρακτηριστικές μελέτες για ορισμένα γνωστά είδη άτυπων μυκοβακτηριδίων και η περιβαλλοντική πηγή προέλευσής τους.

Μυκοβακτηρίδια	Φυσικά Νερά	Πόσιμο Νερό	Λύματα	Νερό Νοσοκομείου
<i>M. intracelulare</i>			Saito & Tsukamura 1976	
<i>M. kansasii</i>		Kaustova et al. 1981		
<i>M. fortuitum</i>	Jin et al. 1984		Jin et al. 1984	
<i>M. kansasii</i>				Wright et al. 1985
<i>M. xenopi</i>		Sniadack et al. 1993		
<i>M. xenopi</i>			Slosarek et al. 1994	Wright et al. 1985, Bennert et al. 1994
<i>M. malmoense</i>	Portaels et al. 1995			
<i>M. tusciae</i>		Tortoli et al. 1999		
<i>M. genavense</i>		Ristola et al. 1999		Hillebrand-Haverkort et al. 1999
<i>M. xenopi</i>	Torkko et al. 2000			
<i>M. bohemicum</i>	Torkko et al. 2001			
<i>M. intracelulare</i>		Falkinham et al. 2001		

Στην εικόνα 1.1 παρουσιάζεται η διασπορά παγκοσμίως των NTM που απομονώθηκαν από ασθενείς με πνευμονολογική νόσο, για το έτος 2008.



Εικόνα 1.1. Παγκόσμια διασπορά NTM από πνευμονικά δείγματα για το 2008 [(α) *Mycobacterium avium* complex, β) *M. Kansasii*, γ) *M. Xenopi*, δ) *M. Malmöense*, ε) *M. Abscessus* και στ) *M. fortuitum*].

(Πηγή: <http://erj.ersjournals.com/content/42/6/1604.figures-only>)

Σήμερα, οι λοιμώξεις από άτυπα μυκοβακτηρίδια παραμένουν μια πρόκληση για τους βιο - επιστήμονες και τους κλινικούς γιατρούς, οι οποίοι καλούνται να τα απομονώσουν με επιτυχία, ενώ παράλληλα να διαγνώσουν την πραγματική λοίμωξη από τον αποικισμό (Alvarado-Esquivel et al. 2009; Bettiker et al. 2006; Chou et al. 2014; Detjen et al. 2007; Dhanasekaran et al. 2014; Diel et al. 2006; Eriksson et al. 2001; Esteban et al. 2006; Forget and Menzies 2006; Gitti et al. 2006 & 2011; Glennon and Cormican 2001; Hosek et al. 2006; Ikononopoulos et al. 1999; Kirschner et al. 1996; Khanum et al. 2011; Kim et al. 2001; Kymionis et al. 2012; Lee et al. 2005; Lim et al. 2008; Lindeboom et al. 2006, 2007 & 2011; Luong et al. 2005; McNabb et al. 2004; Mediavilla-Gradolph et al. 2015; Mostrom et al. 2002; Neonakis et al. 2008; Nguyen et al. 2003; Parrish et al. 2007; Pena et al. 2012; Rastogi et al. 1995; Ricaldi and Guerra 2008; Ringuet et al. 1999; Roth et al. 2000; Ruiz et al. 2001 & 2002; Russo et al. 2006; Sartain et al. 2006; Schaible and Kaufmann 2004; Seagar et al. 2008; Shah et al. 2006; Shrestha et al. 2003; Singh et al. 2013; Sniadack et al. 1993; Teixeira et al. 2007; Telenti et al. 1993; Tenover et al. 1995; Tobler et al. 2006; Tonjum

et al. 1998; Vacher et al. 1999; Van Coppenraet et al. 2004; Wu et al. 2007; Xiong et al. 2006; Yee et al. 2003; Γερογιάννη et al. 2008).

Επιπρόσθετα, μέχρι και σήμερα, δεν έχει αποδειχθεί ο τρόπος μετάδοσής τους στον άνθρωπο, ενώ οι αποσπασματικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί παρέχουν μόνο ενδείξεις ότι ένας πιθανός τρόπος μετάδοσής των NTM στο άνθρωπο είναι μέσω του πόσιμου ύδατος (*Angenent et al. 2005; Briancesco et al. 2010; Carson and Bland 1988; Castillo-Rodal et al. 2012; Cook 2010; Corinne et al. 2002; Convert et al. 1999; Dantec et al. 2002b; Dirac et al. 2012; Falkinham et al. 2001; Falkinham 2002, 2003 & 2011; Gasperi et al. 2009; Gill et al. 2011; Glover et al. 1994; Griffith et al. 2007; Hamsch et al. 2011; Hilborn et al. 2006; Le Dantec et al. 2002a,b; Narag et al. 2009; Neumann et al. 1997; Parashar et al. 2004 & 2009, Santos et al. 2005; Schulze-Robbecke and Buchholtz 1992; Schulze-Robbecke et al. 1992; Sebakova et al. 2008; September et al. 2004; Taylor et al. 2000; Thomason 2013; Torvinen et al. 2004 and 2007; Tuffley and Holbeche 1980; von Reyn et al. 1994 and 2002; WHO 2003 and 2004).*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

Κεφάλαιο 2^ο – Άτυπα Μυκοβακτηρίδια

2.1 Ιστορική Αναδρομή

- ✚ Τη δεκαετία του 1860 αναγνωρίστηκε το *M. avian* από αυτό της φυματίωσης.
- ✚ Τη δεκαετία του 1930 έγιναν καλλιέργειες NTM που προέρχονταν από περιβαλλοντικές πηγές (π.χ. νερό, έδαφος, κα.).
- ✚ Τη δεκαετία του 1950 μελέτες έδειξαν τη μεγάλη διασπορά των NTM στις Η.Π.Α.
- ✚ Έκτοτε, αναγνωρίστηκαν ως αίτιο λοιμώξεων στους ανθρώπους και τα ζώα.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση των λοιμώξεων που οφείλονται στα περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια. Η αξιολόγηση της κλινικής εικόνας που προκαλούν τα άτυπα μυκοβακτηρίδια (nontuberculous mycobacteria, NTM) έγινε μετά το 1950, αν και η ανακάλυψή τους έγινε σχετικά νωρίς μετά από την ανακάλυψη του *M. tuberculosis* από τον Koch, όταν ταξινομήθηκαν ως «άτυπα μυκοβακτηρίδια» με βάση τα *in vitro* χαρακτηριστικά τους. Από τότε μέχρι και σήμερα έχουν αναγνωριστεί πολλά νέα είδη (*Autschbach et al. 2005; Azon et al. 2005; Bhattacharya et al. 2003; Brudey et al. 2006; Bull et al. 2003; Butler and Guthertz 1992 & 2001; Chang et al. 2002; Chemlal et al. 2002; Chemlal and Portaels 2003; Chiodini et al. 1984; Cloud et al. 2002; Cooksey et al. 2003; Daneishvili et al. 2004; Daniel et al. 2004; Daniel et al. 2011; Dauendorffer et al. 2003; Favivar et al. 2012; Feller et al. 2007; Fukushima et al. 2003; Galassi et al. 2003; Gurtler et al. 2006; Horan et al. 2006; Ichikawa et al. 2010; Iwamoto and Saito 2006; Kamala et al. 1994; Khan et al. 2005; Kubica et al. 1963; Leite et al. 2005; Levy-Frebault and Portaels 1992; Mignard and Flandrois 2007; Sampaio et al. 2006; Semret et al. 2006; Soini et al. 1994; Sookman and Coovadia 2014; Thorel et al. 1990; Tortoli 2003; Tortoli et al. 2005; Vernet et al. 2004; Wayne et al. 1993; Wilson et al. 2001; Yamada-Noda et al. 2007*).

Οι πρώτες απομονώσεις οξεάντοχων βακτηριδίων από δείγματα δικτύου παροχής νερού πραγματοποιούνται την χρονική περίοδο 1922–1927. Οι ερευνητές ονόμασαν τους μικροοργανισμούς αυτούς «μυκοβακτηρίδια του νερού»

Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζονται άτυπα μυκοβακτηρίδια που προκαλούν λοιμώξεις στο μυοσκελετικό σύστημα των ανθρώπων και η πηγή προέλευσής τους.

Πίνακας 2.1. Άτυπα μυκοβακτηρίδια που προκαλούν λοιμώξεις στο μυοσκελετικό σύστημα των ανθρώπων και η πηγή προέλευσής τους.

Mycobacterium	Πηγή προέλευσης
<i>avium-intracellulare</i>	Έδαφος, νερό, χοιροειδή, βοοειδή, πτηνά, όρνιθες
<i>xenopi</i>	Νερό
<i>malmoense</i>	Άγνωστο
<i>haemophilum</i>	Άγνωστο
<i>ulcerans</i>	Άγνωστο
<i>terrae</i>	Νερό, έδαφος
<i>triviale</i>	Νερό, έδαφος
<i>gastri</i>	Νερό, έδαφος
<i>kansasii</i>	Νερό, χοιροειδή, βοοειδή
<i>marinum</i>	Νερό, ψάρια
<i>simiae</i>	Πρωτεύοντα, πιθανόν νερό
<i>asiaticum</i>	Πρωτεύοντα
<i>scrofulaceum</i>	Νερό, έδαφος, υγροποιημένα ή υγρά τρόφιμα
<i>szulgai</i>	Άγνωστος
<i>fortuitum</i>	Νερό, έδαφος, ζώα, θαλάσσια ζωή
<i>chelonae</i>	Νερό, έδαφος, ζώα, θαλάσσια ζωή
<i>abscessus</i>	Νερό, έδαφος, ζώα, θαλάσσια ζωή
<i>smegmatis</i>	Υγρές επιφάνειες, χλωρίδα
<i>phlei</i>	Πράσινη βλάστηση, σανός
<i>nonchromogenicum</i>	Νερό, έδαφος

Πρώτος ο *Pinner, το 1935*, χρησιμοποίησε τον όρο «άτυπα μυκοβακτηρίδια», ενώ από τότε τους αποδόθηκαν και άλλες ονομασίες, όπως «μυκοβακτηρίδια διαφορετικά της φυματίωσης» (mycobacteria other than tuberculosis, MOTT) και «αταξινόμητα» (unclassified), αλλά και «περιβαλλοντικά

μυκοβακτηρίδια» (environmental mycobacteria, EM).

Ο [Da Costa Cruz, το 1938](#), απομόνωσε στο Rio de Janeiro το *M. fortuitum* από ασθενή και ακολούθησε ο Handuroy, που ταυτοποίησε το *M. kansasii*.

Ο [Feldman et al. \(1943\)](#), απομόνωσε από ασθενή μυκοβακτηρίδιο το οποίο αργότερα τυποποιήθηκε σαν *M. avium*.

Το 1951 δημοσιεύθηκε η απομόνωση ενός νέου μυκοβακτηριδίου «*M. balnei*», από τα τοιχώματα κολυμβητηρίων. Αυτό το είδος μυκοβακτηριδίου ταυτοποιήθηκε αργότερα σαν *M. marinum* ([Bojalil et al. 1969](#)).

Το 1953 ακολουθεί η απομόνωση του κίτρινου βακίλου (Yellow bacillus) όπως το αποκάλεσαν οι [Buhler & Polak \(1953\)](#), ενώ ο Handuroy το 1964 το ονόμασε *M. kansasii*.

Οι [Linell και Norden το 1954](#) απομόνωσαν το *M. marinum*, ενώ το 1957 απομονώθηκαν άτυπα μυκοβακτηρίδια από υγιείς ανθρώπους, ζώα, πσιίνες και χώμα ([Wolinsky et al. 1957](#)).

Το 1954 καταγράφηκε μια έξαρση κρουσμάτων με μόλυνση από μυκοβακτηρίδιο (*M. marinum*) έπειτα από έκθεση των πασχόντων σε μολυσμένη κολυμβητική δεξαμενή, ενώ μια άλλη μελέτη αναφέρει για μεγάλο αριθμό περιπτώσεων που αυτή τη φορά σχετίζονταν με παιδιά τα οποία κολύπησαν σε θερμαινόμενη πισίνα ([Wolinsky, 1979](#)).

Ο [Schwabacher \(1959\)](#), σε εργασία του αναφέρει την απομόνωση του *M. xenopi* από τραύματα βατράχου. Το 1962, οι [Bojalil et al.](#) έδωσαν την ονομασία *M. gordonae* σε μυκοβακτηρίδιο, το οποίο απαντάται συχνά σε πόσιμα νερά.

Επιπρόσθετα, σε μια άλλη επιδημιολογική μελέτη του [Falkinham et al. \(1980\)](#), παρουσιάζεται η γεωγραφική κατανομή των περιβαλλοντικών μυκοβακτηριδίων. Σύμφωνα με αυτή, περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια απομονώθηκαν σε ποσοστό 33% σε διάφορα υδάτινα οικοσυστήματα στις νοτιοανατολικές ΗΠΑ, ενώ στις βορειοανατολικές ΗΠΑ το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 20%.

Ο [Collins et al. \(1984\)](#), αναφέρει ότι ο Friedman το 1903 απομόνωσε μυκοβακτηρίδιο από μια χελώνα η οποία ζούσε σε μια δεξαμενή με θαλασσινό νερό. Το μυκοβακτηρίδιο αυτό έγινε γνωστό ως *M. chelonae*.

Στις ανατολικές ΗΠΑ, MAC μυκοβακτηρίδια απομονώθηκαν στο νερό και

το έδαφος αλλά και από ασθενείς (Brooks et al., 1984). Ένας μεγάλος αριθμός από τους ασθενείς αυτούς, ήταν πάσχοντες με χρόνια πνευμονική νόσο ενώ κάποιοι άλλοι ήταν ανοσοκατασταλμένοι. Στην συγκεκριμένη μελέτη αποκλείστηκε η περίπτωση μετάδοσης της νόσου από άνθρωπο σε άνθρωπο.

Άλλα είδη που είχαν απομονωθεί από το νερό ήταν τα *M. terrae*, *M. gastri*, *M. flavescens*, *M. smegmatis* και *M. phlei* (Wayne and Good, 1985).

Οι DuMoulin και Stottmeier (1986), αναφέρουν ότι πρώτος ο Pappenheim υποστήριξε ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί προκαλούν νόσο στους ανθρώπους και περιέγραψε για πρώτη φορά πνευμονική λοίμωξη οφειλόμενη στο *M. smegmatis*.

Άλλη μελέτη στις περιοχές Μέρυλαντ, Βιρτζίνια, Τζώρτζια και Νότια Καρολίνα, που αφορούσε στη συγκριτική μελέτη απομόνωσης άτυπων μυκοβακτηριδίων από το περιβάλλον (νερό, έδαφος, σκόνη, σταγονίδια) και από κλινικά δείγματα (κυρίως από τα πτύελα ασθενών με ύποπτη πνευμονική μόλυνση), έδειξε ότι ένας σημαντικός αριθμός άτυπων μυκοβακτηριδίων που απομονώθηκε από κλινικά δείγματα ήταν *M. avium* - intracellulare complex (Fry et al. 1986).

Σύμφωνα με μεγάλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε στις ΗΠΑ σε ασθενείς με πνευμονική μυκοβακτηρίωση, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια ήταν η πηγή της ανθρώπινης μόλυνσης. Οι περισσότεροι ασθενείς προέρχονταν από αγροτικές περιοχές και το είδος των άτυπων που είχαν απομονωθεί ήταν MAC (O'Brien et al. 1987).

Στη χώρα μας επιδημιολογική μελέτη (Δασκαλόπουλος 1991) έδειξε ότι ο δείκτης μόλυνσης με άτυπα μυκοβακτηρίδια μεταξύ ορεινών και παραθαλάσσιων περιοχών, εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά, με διπλάσια σχεδόν επικράτηση στις παραθαλάσσιες από ότι στις ορεινές περιοχές, ενώ αυξημένο ήταν το ποσοστό και σε παραποτάμιες και παραλίμιες περιοχές. Τα αποτελέσματα της έρευνας ισχυροποιούν την άποψη ότι κύρια πηγή των άτυπων μυκοβακτηριδίων είναι οι μεγάλες υδάτινες δεξαμενές.

Έχει παρατηρηθεί ότι τα ποσοστά μολύνσεων που αφορούν άτομα που πάσχουν από AIDS ολοένα και μεγαλώνουν, με κυριότερο είδος το *M. avium*. Έτσι η συχνότητα ασθενειών που οφείλονται σε άλλα στελέχη PEM (όπως *M. kansasii* και *M. intracellulare*), ενώ ήταν μεγάλη πριν την εμφάνιση επιδημίας AIDS, τώρα είναι μικρή, επειδή ο αριθμός των λοιμώξεων λόγω

M. avium σε ασθενείς με AIDS υπερτερεί ([Horsburg 1991](#)).

Σε άτομα που δεν πάσχουν από AIDS, η μόλυνση από άτυπα μυκοβακτηρίδια παρουσιάζει επίσης αύξηση, σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο χρονικό διάστημα 1972-1983 στη Μασαχουσέτη. Η εν λόγω έρευνα αφορούσε στην απομόνωση μυκοβακτηριδίων από κλινικά δείγματα ([du Moulin et al. 1985](#)).

Πνευμονολογικές νόσοι οι οποίες οφείλονται σε άτυπα μυκοβακτηρίδια συνεχώς αναφέρονται σε διάφορες μελέτες και μάλιστα τα τελευταία χρόνια ξεπερνούν την συχνότητα εμφάνισης της φυματίωσης ([Iseman 1998](#)).

Η συνεχής ανάπτυξη του αριθμού και της επίπτωσης των μολύνσεων από άτυπα μυκοβακτηρίδια και τα πρόσφατα πλεονεκτήματα τόσο στις διαγνωστικές όσο και στις θεραπευτικές μεθόδους, οδήγησαν στην έκδοση αντίστοιχων οδηγιών από την [American Thoracic Society \(ATS\) \(1997, 2000 και 2007\)](#) και από την [British Thoracic Society \(BTS\) το έτος 1999](#).

2.2 Χαρακτηριστικά των NTM

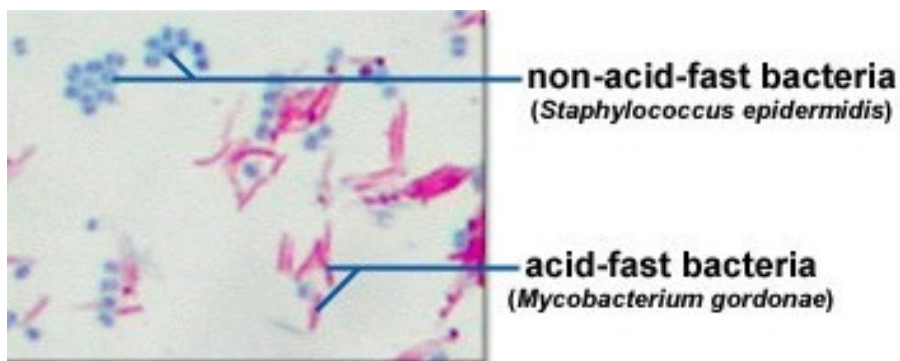
Τα μυκοβακτηρίδια είναι λεπτά, σπορογόνα, ακίνητα, αερόβια, gram θετικά βακτηρίδια, που έχουν ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό που τα διαχωρίζει από άλλα συγγενή βακτηρίδια. Έχουν πολλά λιπίδια στο κυτταρικό τους τοίχωμα και στο κυτταρόπλασμα. Η δομή του κυτταρικού τους τοιχώματος είναι ασυνήθης. Περιέχουν N-ακετυλομουραμικό οξύ πλούσιο σε μόρια άνθρακα.

Επειδή είναι πλούσια σε λιπίδια, η επιφάνεια του μικροβίου είναι τόσο πολύ υδρόφοβη ώστε είναι αδιαπέραστη από τις υδατοδιαλυτές χρωστικές της ανιλίνης που χρησιμοποιούνται στη χρώση των μικροβίων. Μόνο αν θερμανθεί το μικροβιακό κύτταρο τότε εισέρχονται οι χρωστικές, όπως η φουξίνη στο κυτταρόπλασμα, αλλά τότε το μικρόβιο δεν αποχρωματίζεται πλέον ούτε με ισχυρά οξέα (π.χ. 3% ή θειικό οξύ), ούτε με το οινόπνευμα. *Στην ιδιότητα αυτή, του μη αποχρωματισμού με οξέα οφείλεται η ονομασία των μυκοβακτηριδίων σαν οξεάντοχων, αλκοολοάντοχων βακτηρίων (εικόνα 2.1).*

Τα άτυπα μυκοβακτηρίδια είναι οξεάντοχοι μικροοργανισμοί, με διαφορετική όμως βιολογική συμπεριφορά και μικρότερη λοιμογόνο δύναμη

συγκριτικά με το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης (*Bodmer et al. 2000; Briken et al. 2004; Codecasa et al. 2006; Collins et al. 1984; Doucet-Populaire et al. 2002; Ferroni et al. 2005 & 2006; Hwang et al. 2007; Johnson et al. 2006; Kim and Kubica 1973; Kratky et al. 2014; Mahaisavariya et al. 2004; Nash et al. 2005; Pfister et al. 2004; Rogall et al. 1990; Romano et al. 2005; Ryll et al. 2001; Sharma and Mohan 2004; Shivannavar et al. 1996; Sohal et al. 2008; van de Vosse et al. 2003 & 2005; Vordermeier et al. 2007; Yeboah-Manu et al. 2004*).

Η ικανότητα των παθογόνων μυκοβακτηριδίων να επιβιώνουν σε μη φιλικά περιβάλλοντα όπως αυτά των φαγοκυτταρικών κυττάρων καθώς και να ανθίστανται σε θεραπευτικούς παράγοντες, μπορεί να σχετίζεται εν μέρει με την στεγανότητα του κυτταρικού τους τοιχώματος.



Εικόνα 2.1. Διάκριση οξεάντοχων από μη οξεάντοχα βακτήρια με χρώση.

(Πηγή: <http://midlandstech.edu/science/kelleherk/225/LabMaterials/bacterialstains.html>)

Η οικολογία των ελευθέρως διαβιούντων μυκοβακτηριδίων υπήρξε αντικείμενο επισταμένων ερευνών. Στο ερώτημα κατά πόσο το νερό αποτελεί το φυσικό περιβάλλον αυτών των μικροοργανισμών, οι απόψεις των ερευνητών δίστανται. Ορισμένοι συγγραφείς θεωρούν σαν φυσικό περιβάλλον το νερό και άλλοι κλίνουν υπέρ του εδάφους (*Parker et al. 1983, Brooks et al. 1984, Collins et al. 1984*).

Τα άτυπα μυκοβακτηρίδια είναι οργανισμοί οι οποίοι είναι ευρέως διαδεδομένοι στο περιβάλλον για τον λόγο αυτό υπάρχουν ενδείξεις ότι μολύνσεις από περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια ενδεχομένως να προέρχονται από το νερό, το έδαφος ή την επαφή με τα ζώα.

Λαμβάνοντας υπόψη τη βιβλιογραφία, ένα πιθανό μέσο μετάδοσης των άτυπων μυκοβακτηριδίων θεωρείται ότι είναι το νερό (*Mendes de Souza et al. 2010; Mendoza et al. 2009; Moorthy et al. 2012; Neumann et al. 1997; Panagiotou et*

al. 2014; Pavlik et al. 2007; Penn et al. 2011; Primm et al. 2004; Radomski et al. 2010a,b; Rosenblueth et al. 2011; Roux et al. 2009; Russell et al. 2014). Έχει βρεθεί ότι πολλά άτυπα μυκοβακτηρίδια προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο, οι οποίες σχετίζονται με το μολυσμένο νερό. Αντιθέτως, όσον αφορά τα γνωστά παθογόνα είδη *M. tuberculosis* και *M. leprae*, αυτά δεν έχουν απομονωθεί ποτέ από νερό και γενικά δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι το νερό είναι πηγή μόλυνσης για τη φυματίωση και τη λέπρα (*EPA, 1999*).

Όσον αφορά την απομόνωση των μυκοβακτηριδίων, μερικά είδη μπορούν να αναπτυχθούν σε απλά υποστρώματα αμμωνίας ή αμινοξέων ως πηγή αζώτου και γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα, ενώ κάποια άλλα είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν και να απομονωθούν. Η θερμοκρασία ανάπτυξης των μυκοβακτηριδίων ποικίλει μεταξύ των ειδών και κυμαίνεται από 25°C έως 50°C. Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι τα μυκοβακτηρίδια αναπαράγονται με δυαδική σχάση (*Grange1996*).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

Κεφάλαιο 3^ο – Ταξινόμηση των Μυκοβακτηριδίων

3.1 Γενικά

Τα μυκοβακτηρίδια την ονομασία τους την οφείλουν στον *Pinner*, ο οποίος πρώτος (1935) χρησιμοποίησε τον χαρακτηρισμό «άτυπα μυκοβακτηρίδια». Αργότερα (1958) το όνομα «άτυπα» χρησιμοποιήθηκε και από τον *Youmans*. Το 1958 ο *Marks* πρότεινε τη λέξη «ενδιάμεσα». Επίσης ονομάσθηκαν «αταξινόμητα» (unclassified) λόγω αδυναμίας να ενταχθούν σε μία από τις τότε γνωστές κατηγορίες μυκοβακτηριδίων, αλλά και «περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια» (environmental mycobacteria, PEM). Επιπλέον ονομάστηκαν «ανώνυμα» καθώς και «μη-φυματικά» (NTM – Non Tuberculosis Mycobacteria), (*Chapman 1960*). Ο *Jenkins (1981 & 1991)* αναφέρει ότι δεν υπάρχει τίποτα άτυπο σε αυτούς τους μικροοργανισμούς και το κατάλληλο όνομα είναι «ευκαιριακά» ή «δυσνητικά» παθογόνα.

Στον Πίνακα 3.1 παραθέτονται ορισμένα δυσνητικά παθογόνα μυκοβακτηρίδια (NTM) τα οποία μολύνουν τον άνθρωπο.

Πίνακας 3.1. Δυσνητικά παθογόνα άτυπα μυκοβακτηρίδια (NTM) για τον άνθρωπο.

Δυσνητικά Παθογόνα NTM	
<i>M. avium complex</i>	<i>M. malmoense</i>
<i>M. chelonae</i>	<i>M. marinum</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. mucogenicum</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. xenopi</i>
<i>M. genavense</i>	<i>M. heamophilum</i>
<i>M. simiae</i>	<i>M. szulgai</i>
<i>M. ulcerans</i>	<i>M. abscessus</i>
<i>M. peregrinum</i>	

Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται άτυπα μυκοβακτηρίδια, τα οποία σπάνια αποτελούν αίτιο λοιμώξεων, συνήθως μόνο σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς.

Πίνακας 3.2. Άτυπα μυκοβακτηρίδια, τα οποία σπάνια είναι παθογόνα για τον άνθρωπο.

Σπάνια Παθογόνα NTM	
<i>M. gordonae</i>	<i>M. terrae</i> complex
<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. gastri</i>
<i>M. celatum</i>	<i>M. smegmatis</i>

Όλα σχεδόν τα είδη που προαναφέρθηκαν ανωτέρω απαντώνται σε μεγάλη ποικιλία σε πηγές του περιβάλλοντος όπως:

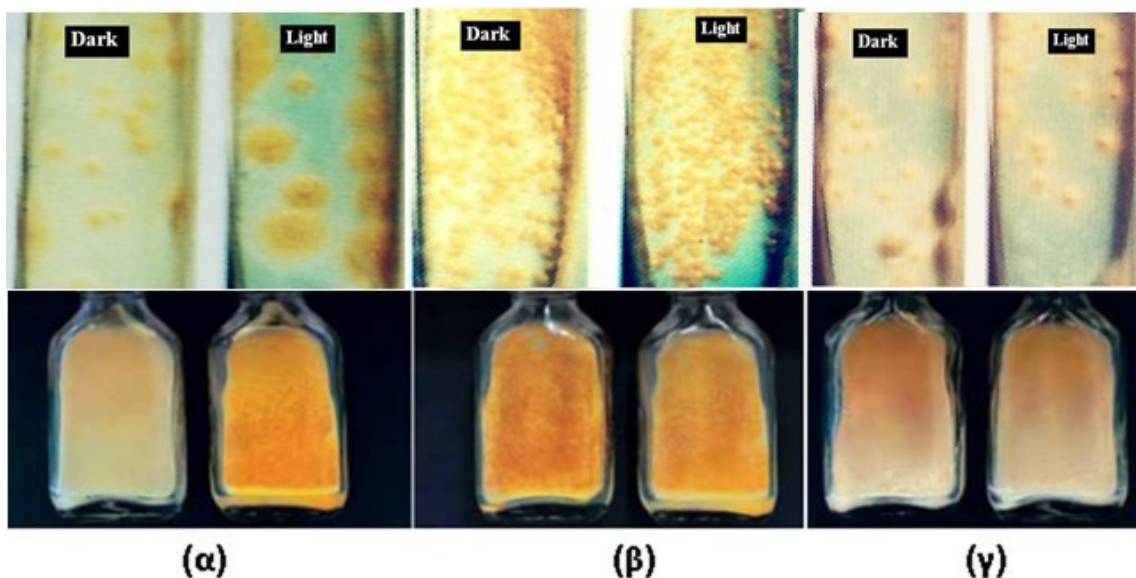
- ✚ πόσιμο νερό (παροχής δικτύου ή εμφιαλωμένο)
- ✚ νερό ακτών λιμνών, θαλασσών και ποταμών
- ✚ γάλα
- ✚ σκόνη των σπιτιών

Η αρχική προσέγγιση να ταξινομηθούν τα μυκοβακτηρίδια ήταν με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά καθώς και την ανθεκτικότητά τους στα οξέα και στην αλκοόλη τα οποία όμως είχαν κάποιες δυσκολίες όσον αφορά την διάκριση ορισμένων ειδών.

3.2 Ταξινόμηση κατά Runyon

Ο προσδιορισμός των μυκοβακτηριδίων, αρχικά, επιχειρήθηκε από τον [Runyon το 1959](#), όπου πρότεινε την ομαδοποίηση των μυκοβακτηριδίων με βάση τον ρυθμό ανάπτυξης και την μορφολογία των αποικιών τους, εκτός των *M. tuberculosis* και *M. bovis* που παρουσιάζονται στα κλινικά δείγματα. Δηλαδή ο Runyon επιχείρησε την ταξινόμηση των άτυπων μυκοβακτηριδίων με βάση τον ρυθμό αναπτύξεως των μυκοβακτηριδίων και τη μορφολογία των αποικιών τους στις εργαστηριακές καλλιέργειες. Επίσης, εξετάστηκε η ικανότητα ορισμένων μυκοβακτηριδίων να αντιδρούν στο φως και να παράγουν χρωστικές (εικόνα 3.1). Επιπρόσθετα, εξετάστηκε η ικανότητα παραγωγής καταλάσης και η θερμοκρασία ανάπτυξής τους στο εργαστήριο.

Αργότερα έγινε εμφανές ότι δεν ήταν δυνατό να ταξινομηθούν όλα τα είδη των NTM σε τέσσερις ομάδες σύμφωνα με το σύστημα του Runyon, γιατί το συγκεκριμένο σύστημα δεν έχει επίσημη ταξινομική ισχύ, ωστόσο παραμένει χρήσιμο τόσο σε κλινικές εφαρμογές όσο και στην ταυτοποίηση.



Εικόνα 3.1. Χρωματισμός (α) φωτοχρωμογόνων, (β) σκοτοχρωμογόνων και (γ) μη φωτοχρωμογόνων NTM.

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω, τα είδη των άτυπων μυκοβακτηριδίων συνήθως χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

- ✚ Τα «ταχέως αναπτυσσόμενα», τα οποία απαιτούν 7 ημέρες περίπου για την εμφάνιση των αποικιών τους σε θρεπτικό υλικό.
- ✚ Τα «βραδέως αναπτυσσόμενα», τα οποία απαιτούν μεγαλύτερο των 7 ημερών χρονικό διάστημα προκειμένου να γίνουν ορατές οι αποικίες τους στο θρεπτικό υλικό.

Τα «βραδέως αναπτυσσόμενα» είδη διαχωρίζονται σε τρεις επιπλέον κατηγορίες ανάλογα με τον χρωματισμό τους με ειδικές χρωστικές ([Runyon 1959](#)).

ΟΜΑΔΑ Ι (Φωτοχρωμογόνα)

Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τα φωτοχρωμογόνα μυκοβακτηρίδια:

✚ *M. kansasii*

✚ *M. marinum*

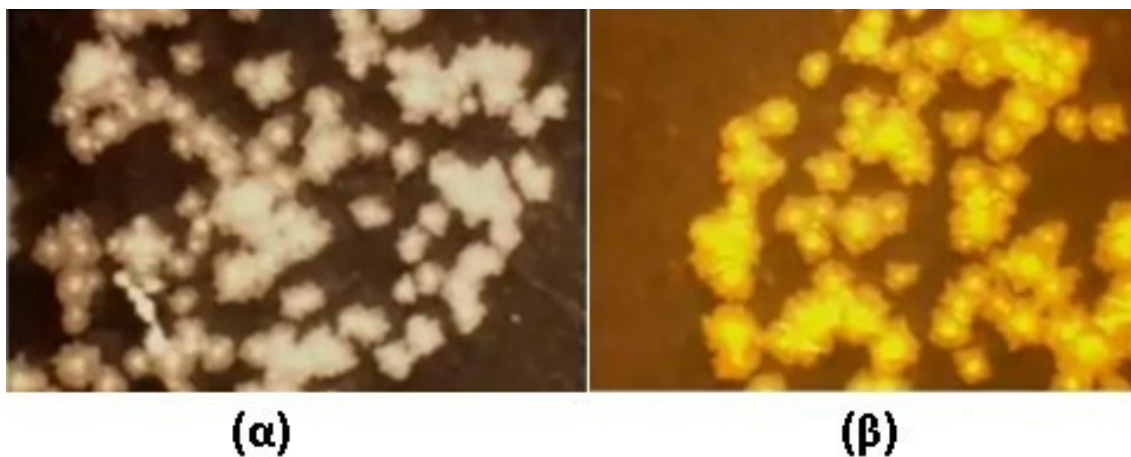
✚ *M. asiatic*

✚ *M. simiae*

Τα μυκοβακτηρίδια της ομάδας των φωτοχρωμογόνων παράγουν αποικίες ζυγηρά κίτρινες όταν εκτεθούν στο φως, ενώ δεν έχουν χρώμα στο σκοτάδι. Άλλα χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης ομάδας είναι ότι:

- ✚ Υδρολύουν το tween-80 ,
- ✚ Παράγουν εξωκυττάριο καρωτίνη,
- ✚ Αναπτύσσονται μέσα σε 2 -4 εβδομάδες

Μερικά από τα πιο σημαντικά είδη της ομάδας αυτής να είναι τα μυκοβακτηρίδια *M. kansasii* και *M. marinum* (εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2. Αλλαγή χρώματος των αποικιών του *M. Kansasii*, (α) στο σκοτάδι και (β) στο φως.

Οι αποικίες του *M. kansasii* στο θρεπτικό υλικό Lowenstein-Jensen είναι έντονα κίτρινες και μαλακές. Ευνοϊκή θερμοκρασία ανάπτυξης τους είναι αυτή των 37°C αλλά αναπτύσσονται και σε θερμοκρασία δωματίου (24-30 °C), σε

χρονικό διάστημα 3-4 εβδομάδων.

Οι αποικίες του *M. marinum* μοιάζουν μορφολογικά με των άλλων φωτοχρωμογόνων μυκοβακτηριδίων. Ανευρίσκονται στον άνθρωπο, στα ψάρια και στις κολυμβητικές δεξαμενές, προκαλούν πάθηση όμοια με τη φυματίωση (πνευμονική και αδενική μορφή), πνευμονική νόσο και δερματοπάθεια.

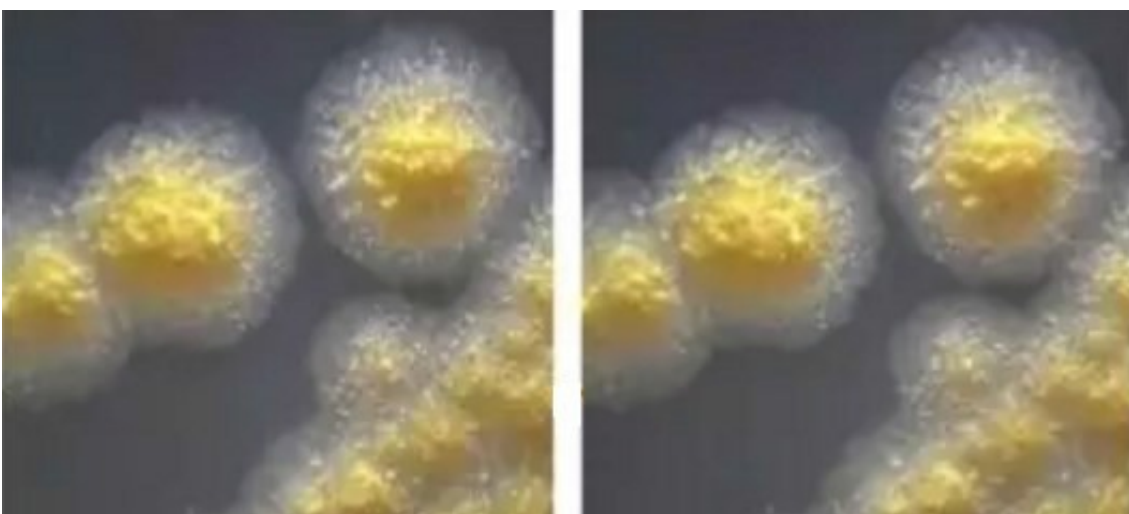
ΟΜΑΔΑ II (Σκοτοχρωμογόνα)

Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τα σκοτοχρωμογόνα μυκοβακτηρίδια:

- ✚ *M. scrofulaceum*
- ✚ *M. szulgai*
- ✚ *M. xenopi*
- ✚ *M. goodii*
- ✚ *M. flavescens*

Σημειώνεται ότι, το *M. szulgai* είναι φωτοχρωμογόνο στους 25°C και σκοτοχρωμογόνο στους 37°C.

Στην ομάδα των σκοτοχρωμογόνων μυκοβακτηριδίων, οι αποικίες παράγουν κίτρινη ή πορτοκαλόχρωμη χρωστική είτε αναπτυχθούν στο φως είτε αναπτυχθούν στο σκοτάδι (εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3. Κίτρινες αποικίες των σκοτοχρωμογόνων άτυπων μυκοβακτηριδίων στο φως και στο σκοτάδι.

Άλλα χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης ομάδας είναι ότι:

- ✚ Αναπτύσσονται πολύ αργά
- ✚ Οι αποικίες τους είναι λείες
- ✚ Μερικά δεν υδρολύουν το Tween-80
- ✚ Είναι τα πλέον συχνά απαντώμενα άτυπα μυκοβακτηρίδια

Το *M. xenopi* είναι το μυκοβακτηρίδιο με το βραδύτερο ρυθμό ανάπτυξης από όλα τα άλλα. Παράγει αποικίες πολύ μικρές αλλά φουσκωτές, με διακλαδώσεις όταν τις κοιτάξουμε στο μικροσκόπιο, επίσης δεν αναπτύσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανάπτυξη του είναι λίγο ταχύτερη στους 37°C.

Τα σκοτοχρωμογόνα ανευρίσκονται στα πτύελα ανθρώπου, στο γαστρικό υγρό και σε χύμα και σκόνη μολυσμένα από απεκκρίματα πτηνών ζώων. Προκαλούν πνευμονική νόσο και τραχηλική αδενίτιδα.

ΟΜΑΔΑ III (Μη χρωμογόνα ή Μη Φωτοχρωμογόνα)

Η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει τα μη φωτοχρωμογόνα μυκοβακτηρίδια:

- ✚ *M. avium*
- ✚ *M. intracellulare*
- ✚ *M. ulcerans*
- ✚ *M. malmoense*
- ✚ *M. gastri*
- ✚ *M. terrae*
- ✚ *M. haemophilum*
- ✚ *M. johnei*
- ✚ *M. triviale*
- ✚ *M. nonchromogenicum*

Οι αποικίες των μυκοβακτηριδίων της ομάδας των μη φωτοχρωμογόνων αυτής δεν παράγουν έντονη χρωστική παρά μόνο ελαφρώς κίτρινη, η οποία δεν επηρεάζεται από το φως (εικόνα 3.4).

Άλλα χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης ομάδας είναι ότι τα μη φωτοχρωμογόνα μυκοβακτηρίδια :

- + Υδρολύουν το tween-80
- + Ορισμένα μοιάζουν αντιγονικά μεταξύ τους
- + Οι αποικίες τους είναι λείες, μικρές και βραδέως αναπτυσσόμενες



Εικόνα 3.4. Μη χρωμογόνα άτυπα μυκοβακτηρίδια.

Το *M. avium* και το *M. Intracellulare* μπορούν να προκαλέσουν νόσο στους ανθρώπους και στα ζώα και ανήκουν στο *M. avium* complex. Τα δύο είδη σχετίζονται στενά και η διάκριση τους γίνεται με ειδικούς αντιορούς.

Ευνοϊκή θερμοκρασία για την ανάπτυξή τους είναι οι 37°C, είναι βραδείας ανάπτυξης, δεν παράγουν χρωστική, δεν εκκρίνουν νιασίνη, δεν ανάγουν τα νιτρικά και δεν διασπούν την ουρία.

Ανευρίσκονται στο έδαφος, το νερό, τα ζώα, τα πτηνά τα πύελα και τους ιστούς. Προκαλούν πνευμονική νόσο, εντερίτιδα σε ζώα, δερματική νόσο και αδενική νόσο.

ΟΜΑΔΑ IV (Ταχέως αναπτυσσόμενα)

Η τέταρτη ομάδα περιλαμβάνει τα είδη ταχείας αναπτύξεως:

- + *M. fortuitum*
- + *M. minetti*
- + *M. smegmatis*
- + *M. phlei*
- + *M. chelonae*
- + *M. vaccae*
- + *M. thermoresistable*
- + *M. abscessus*

Οι αποικίες τους αναπτύσσονται σε χρόνο μικρότερο της μίας εβδομάδας. Άλλα χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης ομάδας είναι ότι:

- + Αναπτύσσονται στους 37°C και στους 24°C
- + Δεν παράγεται, κατά κανόνα, χρωστική

Τα μυκοβακτηρίδια της ομάδας των ταχέως αναπτυσσόμενων ειδών απομονώθηκαν τη δεκαετία του 1930, αλλά μόνο το 1957 αποδείχτηκε ότι είναι παθογόνα για τον άνθρωπο. Τα σημαντικότερα είδη της ομάδας αυτής τα *M. fortuitum* και *M. chelonae*. Το *M. fortuitum*, μοιάζει μορφολογικά με τα άλλα άτυπα μυκοβακτηρίδια, όμως συχνά εμφανίζει κοκκοειδή και νηματοειδή μορφή. Είναι μυκοβακτηρίδιο που δεν παράγει χρωστική και αυτό είναι ένα από τα διαχωριστικά του στοιχεία σε σχέση με το *M. phlei*, με το οποίο μοιάζει σε όλους τους άλλους βασικούς του χαρακτήρες.

Αυτά ανευρίσκονται στα ζώα, σε πάσχοντες ανθρώπους, σε ποντικούς, στα ούρα, σε σμήγμα γεννητικών οργάνων και σε μηχανές παγωτού. Προκαλούν πνευμονική νόσο και λοιμώξεις μαλακών ιστών και οστών.

3.3 Ταξινόμηση κατά Wayne et al.

Εκτός της παραπάνω κατάταξης κατά Runyon, άλλοι ερευνητές (Wayne 1964 & 1966) χρησιμοποίησαν για τη διάκριση των άτυπων μυκοβακτηριδίων εκτός από τα κριτήρια του ρυθμού αναπτύξεως των μυκοβακτηριδίων και της παραγωγής χρωστικών και τις παρακάτω δοκιμασίες.

Οι δοκιμασίες αυτές είναι:

- ✚ η δοκιμή αναγωγής νιτρικών
- ✚ η παραγωγή καταλάσης
- ✚ η παραγωγή νιασίνης
- ✚ η πρόσληψη σιδήρου
- ✚ η παραγωγή ουρεάσης
- ✚ η ανοχή στο χλωριούχο νάτριο
- ✚ η δοκιμή παραγωγής της αρυλοσουλφατάσης

3.4 Ταξινόμηση κατά Woolinsky

Στις μέρες μας η ταξινόμηση των άτυπων μυκοβακτηριδίων γίνεται με βάση τον ρυθμό ανάπτυξης των αποικιών και την παθογονικότητά τους.

Σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Woolinsky, στον Πίνακα 3.3 περιλαμβάνονται τα σημαντικότερα από κλινικής πλευράς είδη μυκοβακτηριδίων.

Πίνακας 3.3. Ταξινόμηση κατά *Wolinsky, 1979*.

I. Βραδέως Αναπτυσσόμενα Μυκοβακτηρίδια	
Δυνητικά παθογόνα	Μη παθογόνα
<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>M. kansasii</i> 2. <i>M. avium</i> / <i>intracellulare</i> / <i>scrofulaceum</i> (MAIS complex) 3. <i>M. marinum</i> 4. <i>M. xenopi</i> 5. <i>M. szulgai</i> 6. <i>M. simiae</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>M. gordonae</i> 2. <i>M. gastri</i> 3. <i>M. terae complex</i> 4. <i>M. flavescens</i>
II. Ταχέως Αναπτυσσόμενα Μυκοβακτηρίδια	
Δυνητικά παθογόνα	Μη παθογόνα
<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>M. fortuitum</i> 2. <i>M. chelonae</i> 	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>M. smegmatis</i> 2. <i>M. vaccae</i> 3. <i>M. parafortuitu</i>

Τα άτυπα μυκοβακτηρίδια *M. avium* – *M. intracellulare* και το *M. scrofulaceum*, έχει προταθεί να χαρακτηρίζονται ως σύμπλεγμα MAIS, ενώ οι χρωματισμένες αποικίες του *M. scrofulaceum* θεωρούνταν μέχρι πρόσφατα ένα ξεχωριστό είδος ή ομάδα.

Από τα ταχέως αναπτυσσόμενα NTM σύμφωνα με τον Wolinsky, το *M. fortuitum* είναι περισσότερο διαδεδομένο στη φύση σε σχέση με το *M. chelonae*. Τα μυκοβακτηρίδια αυτά έχουν περιορισμένη παθογόνο δράση στον άνθρωπο, αλλά μερικές φορές είναι δυνατό να δημιουργήσουν σημαντικά προβλήματα υγείας, κατόπιν εισόδου στον οργανισμό μέσα από τραυματισμούς του δέρματος, που στην προκειμένη περίπτωση παίζουν ρόλο πύλης εισόδου των μικροβίων αυτών (*Rosenzweig 1979, 1980, 1981, 1984, 1996*).

Υπάρχει μία ποικιλία στις προσεγγίσεις και τις μεθοδολογίες που έχουν

χρησιμοποιηθεί για να χαρακτηρίσουν και να ταξινομήσουν τα NTM. Οι μελέτες αυτές έχουν επεκταθεί και επιβεβαιώνονται από τις μελέτες με τη χρήση νέων μοριακών τεχνικών. Σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί στην μελέτη της γενετικής βάσης των NTM. Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 125 είδη άτυπων μυκοβακτηριδίων, αλλά παρά τη συνεχή ταυτοποίηση των νέων ειδών, το 30% που εντοπίζεται στο νερό, το έδαφος και τον αέρα δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί. Τα είδη αυτά διαχωρίστηκαν, ταξινομήθηκαν σε ομάδες βάσει διαφόρων βιολογικών τους ιδιοτήτων, όπως βάσει των διατροφικών απαιτήσεων και του ρυθμού ανάπτυξης (βραδείας - ταχείας), της ευνοϊκής θερμοκρασίας αναπτύξεως, του χρώματος των αποικιών κατά την επώαση τους στο φως ή στο σκότος (φωτοχρωμογόνα, σκοτοχρωμογόνα), της παθογόνου δράσεως σε ζώα, ανθρώπους και πειραματόζωα. Ακόμα βάσει ιδιαίτερων βιοχημικών τους ιδιοτήτων. *Από όλες αυτές τις ταξινομήσεις, σήμερα, η γενικά παραδεκτή είναι αυτή των βραδέως και ταχείας αναπτύξεως.*

3.5 Οδηγίες για τα Άτυπα Μυκοβακτηρίδια

Η συνεχής ανάπτυξη του αριθμού και της επίπτωσης των μολύνσεων από άτυπα μυκοβακτηρίδια και τα πρόσφατα πλεονεκτήματα τόσο στις διαγνωστικές όσο και στις θεραπευτικές μεθόδους, οδήγησαν στην έκδοση αντίστοιχων οδηγιών από την *American Thoracic Society* και από την *British Thoracic Society*.

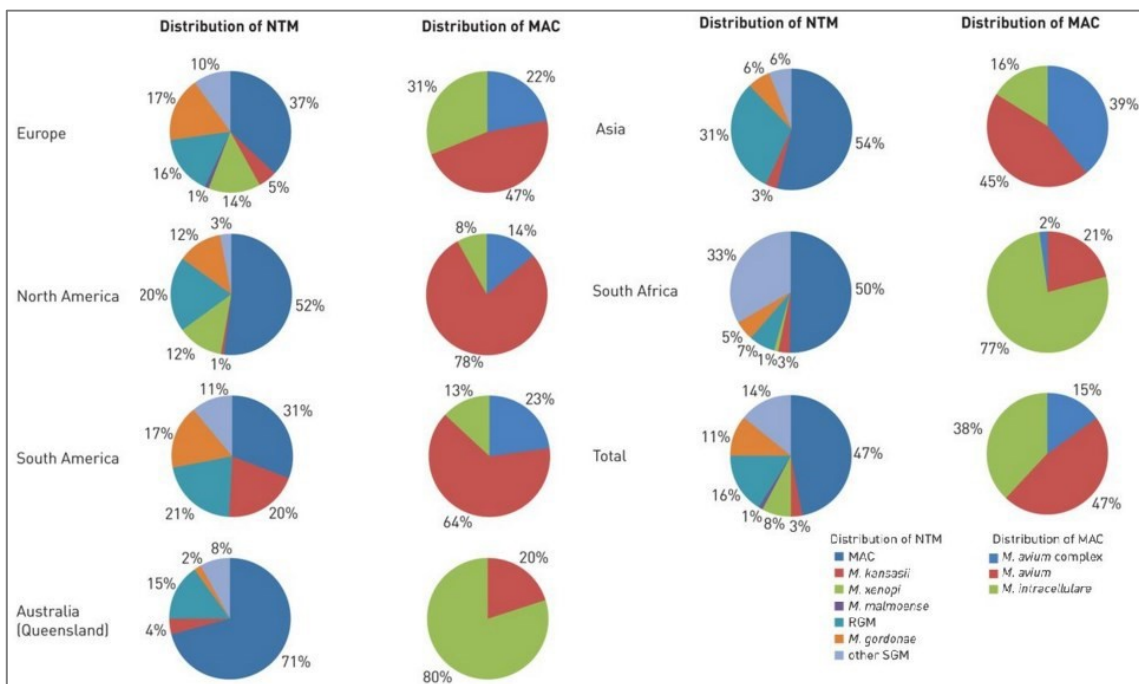
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

Κεφάλαιο 4^ο – Επιδημιολογία των NTM

4.1 Γενικά

Οι ασθένειες που προκαλούνται από NTM συνήθως εμφανίζονται σε ασθενείς στον αναπτυσσόμενο και σπάνια στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Στις Ηνωμένες Πολιτείες και την Ευρώπη, όπου η συχνότητα εμφάνισης της φυματίωσης είναι χαμηλή, η συχνότητα εμφάνισης τέτοιων λοιμώξεων σε ασθενείς με AIDS είναι μεγάλη.

Στο εικόνα 4.1 παρουσιάζεται η παγκόσμια διασπορά NTM που απομονώθηκαν από ασθενείς με αναπνευστική νόσο.



Εικόνα 4.1. Διασπορά των NTM από ασθενείς με αναπνευστική νόσο (MAC: *Mycobacterium avium* complex; RGM: rapid-growing mycobacteria; SGM: slow-growing mycobacteria).

(Πηγή: [Wouter Hoefsloot et al. Eur Respir J 2013;42:1604-1613](#)).

Η μεγάλη αύξηση των περιπτώσεων ασθενειών που οφείλονται σε NTM, εκτός από την ώθηση που έδωσε για την ταχεία ανίχνευση και ταυτοποίηση τους, τόνωσε την ανάπτυξη και μελέτη δεικτών για επιδημιολογικές έρευνες.

Μέχρι σήμερα, τέτοιοι διαθέσιμοι δείκτες καθώς και οι μέθοδοι

προσδιορισμού τους έχουν περιορισμένες δυνατότητες. Νεότερες μέθοδοι που έχουν αναπτυχτεί για επιδημιολογικές μελέτες NTM βασίζονται στην ανάλυση του DNA και έτσι δεν υπόκεινται σε διακύμανση της φαινοτυπικής έκφρασης. Αν και όλες οι παραπάνω μέθοδοι είναι απλές, απαιτούν τη γνώση των εξελιγμένων μεθόδων μοριακής βιολογίας και τα ανάλογα μέσα. Δυστυχώς, μέχρι σήμερα, δεν έχουν γίνει μελέτες σύγκρισης των αποτελεσμάτων των διαφόρων μεθόδων, στις περιπτώσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί τα ίδια στελέχη NTM. Ωστόσο, όπως έχει αποδειχθεί σε πρόσφατες μελέτες, οι μέθοδοι αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την ταυτοποίηση NTM σε μελετώμενα δείγματα.

Οι περισσότερες επιδημιολογικές και πρόσφατες μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η μετάδοση των NTM από άνθρωπο σε άνθρωπο είναι σπάνια. Οι κύριες κλινικές μορφές της νόσου λόγω NTM είναι:

- ✚ Η πνευμονική νόσος
- ✚ Η λεμφαδενίτιδα
- ✚ Η νόσος του δέρματος και των μαλακών μορίων
- ✚ Η γενικευμένη νόσος

Οι προδιαθεσικοί παράγοντες για εμφάνιση νόσου είναι η μεγάλη ηλικία, το περιβάλλον, το θερμό κλίμα, οι αγροτικές περιοχές, η σιλίκωση ή πνευμονοκονίαση, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, οι βρογχιεκτασίες, οι ακτινολογικές αλλοιώσεις προηγούμενης φυματίωσης, η HIV νόσος, η κακοήθεια, ο σακχαρώδης διαβήτης, η κατάχρηση οινόπνεύματος, κα.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, έχουν αναγνωρισθεί πολλά είδη άτυπων μυκοβακτηριδίων, από τα οποία άλλα είναι παθογόνα και άλλα όχι για τον άνθρωπο. Για το λόγο αυτόν έχουν διεξαχθεί και συνεχώς διεξάγονται μελέτες για τον προσδιορισμό της επιδημιολογίας τους αλλά και της κλινικής εικόνας και των θεραπευτικών προσεγγίσεων. Για παράδειγμα, το *M. avium* ευθύνεται για την εμφάνιση λοιμώξεων σε ασθενείς με AIDS. Έτσι ενώ η συχνότητα ασθενειών που οφείλονταν σε άλλα στελέχη NTM, όπως *M. kansasii* και *M. intracellulare*, ήταν μεγάλη πριν την εμφάνιση επιδημίας AIDS, τώρα είναι μικρή

επειδή ο αριθμός των λοιμώξεων λόγω *M. avium* σε ασθενείς με AIDS υπερτερεί.

4.2 Λοιμώξεις – Άτυπα Μυκοβακτηρίδια

Η κύρια πηγή μόλυνσης από τα άτυπα μυκοβακτηρίδια είναι το περιβάλλον, δηλαδή το νερό, το χώμα και η σκόνη.

Το νερό θεωρείται μία πιθανή πηγή μόλυνσης πολλών αναγνωρισμένων άτυπων μυκοβακτηριδίων, περιλαμβανομένων των *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. simiae*. Τα ταχέως αναπτυσσόμενα μυκοβακτηρίδια, όπως τα *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, συχνά απομονώνονται από το έδαφος και τις φυσικές υδάτινες πηγές και είναι αυτά που συνδέονται με υποκείμενη νόσο, οι πηγές της οποίας είναι το νερό της βρύσης, το νερό διύλισης και ο πάγος που παρασκευάζεται από αυτό. Το *M. xenopi* είναι θερμόφιλο και εντοπίζεται στο ζεστό πόσιμο νερό. Το *M. malmoense* έχει αναδειχθεί ως ένα από τα κύρια παθογόνα στη Βόρεια Ευρώπη και έχει ανευρεθεί και αυτό σε υδάτινες πηγές της Φινλανδίας, στο έδαφος του Ζαΐρ και στην Ιαπωνία, ενώ το *M. simiae* σε χώρες όπως το Ισραήλ, η Κούβα και η νοτιοδυτική Αμερική.

Το καλύτερα μελετημένο από τα άτυπα μυκοβακτηρίδια είναι το *M. avium* complex (εικόνα 4.2). Ωστόσο, πολλά ακόμη πρέπει να διευκρινιστούν σχετικά με την παθογένεση της μόλυνσης και της νόσου που προκαλείται από τα άτυπα μυκοβακτηρίδια.



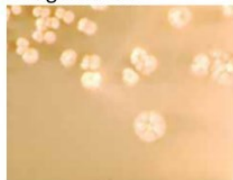
M. avium complex



M. gordonae



M. kansasii



M. fortuitum

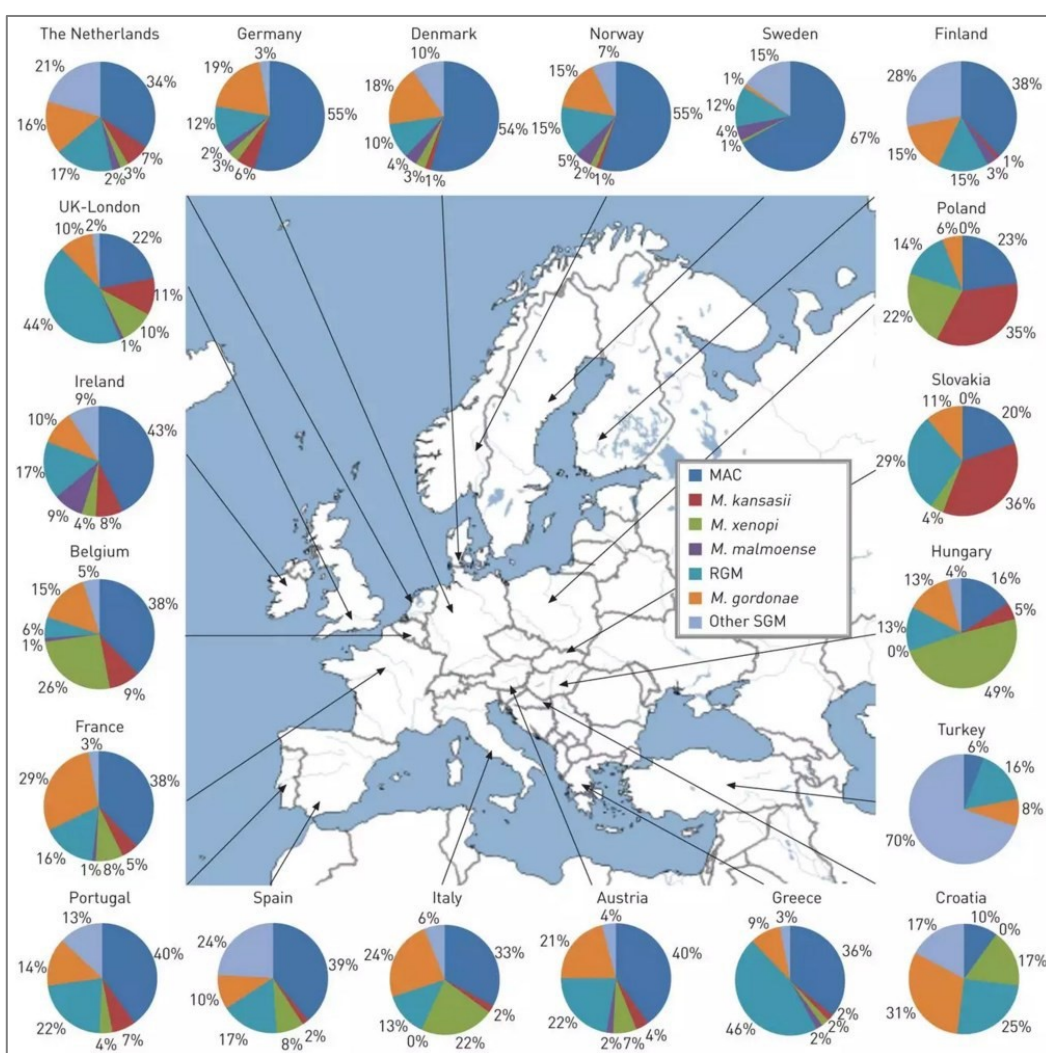
Εικόνα 4.2. Αποικίες *M. Avium* complex, *M. gordonae*, *M. kansasii* και *M. fortuitum*.

(Πηγή: <http://www.authorstream.com/Presentation/drnaseelsalim-1341355-nontuberculous-mycobacterial-infections/>).

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι κυριότερες λοιμώξεις που προκαλούνται από NTM.

4.2.1 Πνευμονικές Λοιμώξεις

Οι σπουδαιότερες λοιμώξεις που προκαλούν τα περιβαλλοντικά Μυκοβακτηρίδια είναι οι λοιμώξεις των πνευμόνων. Η πνευμονοπάθειες αυτές είναι συχνότερες σε ενήλικες. Η χρόνια πνευμονική νόσος είναι η συχνότερη κλινική εκδήλωση της νόσου που προκαλούν τα άτυπα μυκοβακτηρίδια (εικόνα 4.3).

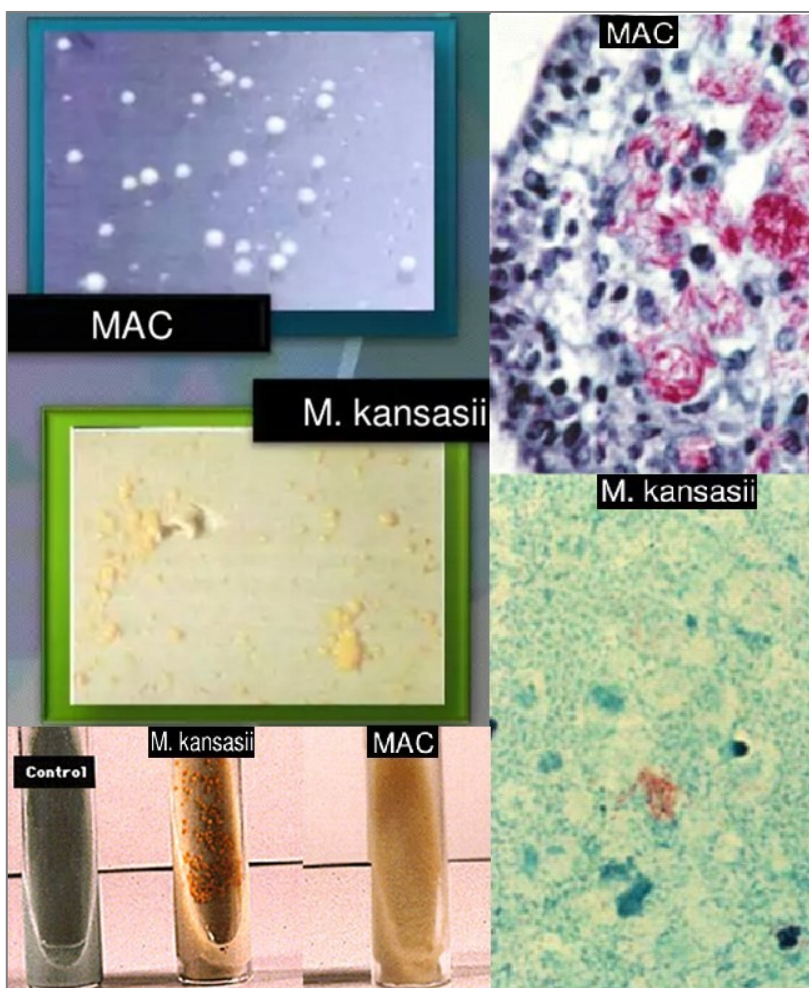


Εικόνα 4.3. Διασπορά NTM από πνευμονικά δείγματα στην Ευρώπη το 2008 (MAC: Mycobacterium avium complex; RGM: Rapid-Growing Mycobacteria; SGM: Slow-Growing Mycobacteria).

(Πηγή: *Wouter Hoefsloot et al. Eur Respir J 2013;42:1604-1613*).

Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από τα μέλη του MAC (δηλαδή, *M. avium*, *M. intracellulare*, και ειδών *Mycobacterium X*) είναι κυρίως πνευμονικής φύσεως. Το *M. avium* complex (MAC), ακολουθούμενο από το *M. kansasii*, είναι το συχνότερο παθογόνο που προκαλεί πνευμονική νόσο (εικόνα 4.4). Άλλα παθογόνα που περιστασιακά προκαλούν πνευμονική νόσο είναι τα *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. szulgai*, *M. malmoense* και *M. celatum*. Το *M. xenopi* είναι το δεύτερο μετά το *M. avium* complex αίτιο άτυπης πνευμονικής νόσου.

Το *M. avium* προσβάλλει άτομα με υποκείμενο νόσημα του αναπνευστικού, όπως χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, ή ανοσοκατασταλμένους ασθενείς, όπως ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα.



Εικόνα 4.4. *M. kansasii* και *M. avium*.

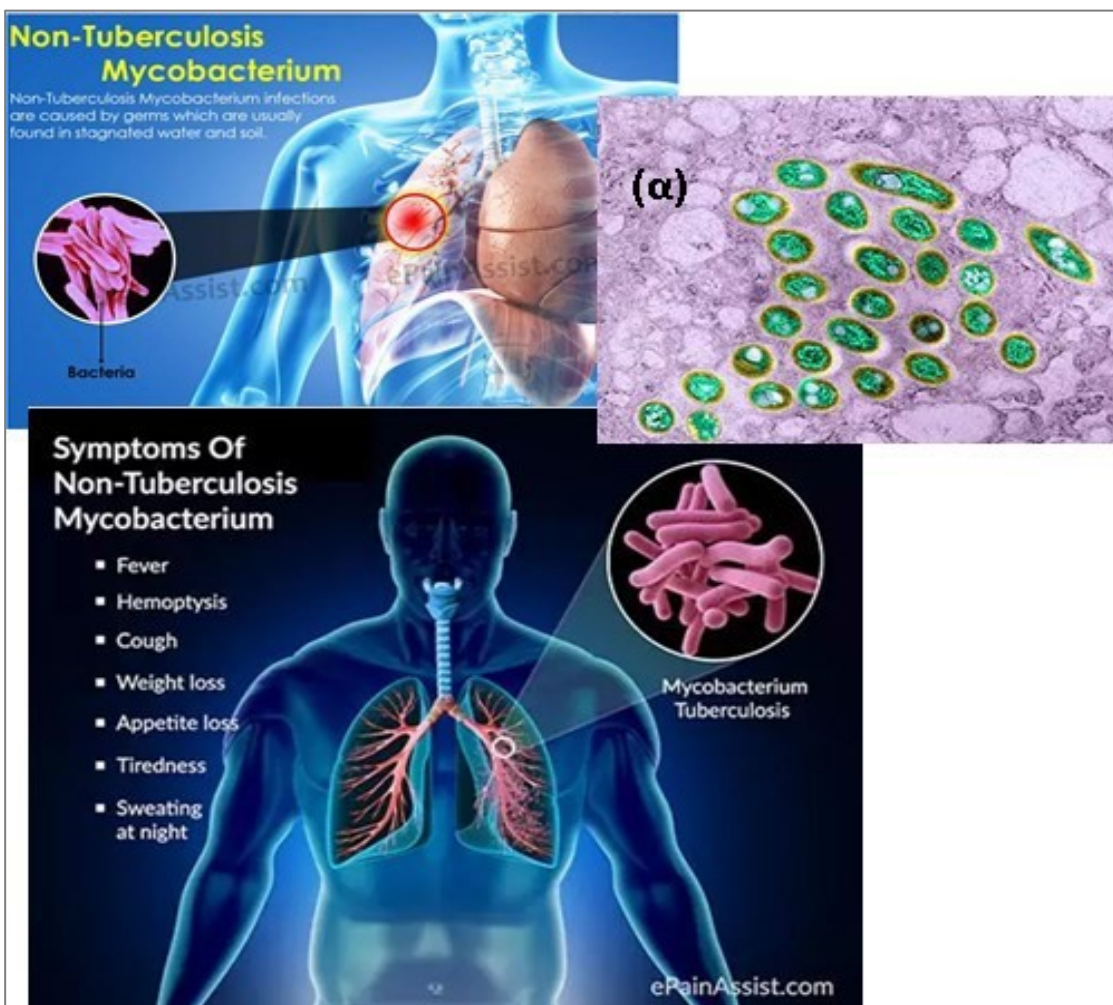
(Πηγή: http://cloud.med.nyu.edu/modules/nyu/microbiology/infect-disease/Branched_Rods6.html & <http://www.slideshare.net/revid/presentacin1-21132552?related=2>)

Τα παιδιά σπάνια αναπτύσσουν νόσο από NTM, εκτός εκείνων με κυστική ίνωση.

Υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες οι ασθενείς αποικίζονται ή και νοσούν από άτυπη λοίμωξη χωρίς υποκείμενη πνευμονική νόσο. Τα κλινικά συμπτώματα της άτυπης φυματίωσης είναι ποικίλα και μη ειδικά και μπορούν εύκολα να μπερδευτούν είτε με αυτά της φυματίωσης που προκαλείται από το *M. tuberculosis complex*, είτε με το υποκείμενο πνευμονικό νόσημα. Υπάρχουν ωστόσο διαφορές στην ακτινολογική εικόνα της άτυπης πνευμονικής νόσου από εκείνη που προκαλείται από το *M. tuberculosis complex*. Η παθογένεση της πνευμονικής νόσου των ενηλίκων δεν έχει διευκρινισθεί. Εικάζεται ότι μπορεί να αντιπροσωπεύει μια πρωτογενή μόλυνση από εισπνοή μολυσμένων σταγονιδίων (aerosols) που αιωρούνται και στην πορεία εντοπίζονται και πολλαπλασιάζονται σε ειδικές περιοχές του πνεύμονα ([Collins et al. 1984](#), [Wolinsky 1979](#)).

Πνευμονική MAC λοίμωξη έχει αναφερθεί σε όλον τον κόσμο, συμπεριλαμβανομένων των Ηνωμένων Πολιτειών, της Ιαπωνίας, της Αγγλίας και της Ουαλίας. Το *M. avium complex* (MAC), ακολουθούμενο από το *M. kansasii*, είναι το συχνότερο παθογόνο που προκαλεί πνευμονική νόσο στις ΗΠΑ (εικόνα 4.5). Το *M. xenopi* είναι το δεύτερο μετά το *M. avium complex* αίτιο άτυπης πνευμονικής νόσου σε περιοχές του Καναδά, του Ηνωμένου Βασιλείου και άλλων περιοχών της Ευρώπης, ενώ το *M. malmoense* είναι δεύτερο μετά το *M. avium complex* στη Σκανδιναβία. Οι λοιμώξεις στις Ηνωμένες Πολιτείες και τη Μεγάλη Βρετανία έχουν εμφανιστεί σε λευκούς άνδρες 45 έως 65 ετών με ιστορικό παθήσεων του πνεύμονα. Στελέχη MAC έχουν επίσης αναφερθεί ότι είναι υπεύθυνα για λοιμώξεις των μαλακών ιστών. Επίσης, στελέχη του MAC έχουν απομονωθεί από ασθενείς με κυστική ίνωση.

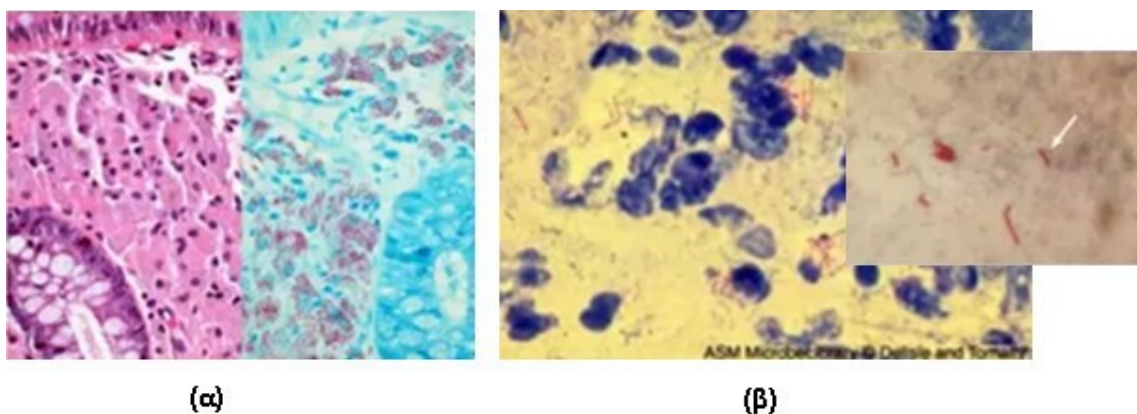
Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν αποδείξεις εξάπλωσης MAC από άνθρωπο σε άνθρωπο και οι περισσότερες μελέτες προτείνουν την μετάδοση MAC στον άνθρωπο μέσω του περιβάλλοντος. Τα MAC έχουν ανακτηθεί από σχεδόν όλες τις γωνίες του κόσμου και από μια μεγάλη ποικιλία περιβαλλοντικών δειγμάτων. Εκτός από τα ύδατα και τα εδάφη, MAC έχουν απομονωθεί από βρογχοσκόπια, το νωπό γάλα, και τα τσιγάρα.



Εικόνα 4.5. Λοίμωξη πνευμόνων από NTM και συμπτώματα αυτής, (α) Λοίμωξη πνευμόνων από *Mycobacterium avium complex* (MAC), ως δευτερεύουσα λοίμωξη σε ασθενή με AIDS, HIV.

Οι προδιαθεσικοί παράγοντες για εμφάνιση νόσου είναι άτομα με υποκείμενο νόσημα του αναπνευστικού, όπως χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια ή ανοσοκατασταλμένοι αλλά έχουν καταγραφεί και περιπτώσεις μολύνσεων σε άτομα χωρίς καμία προδιάθεση (*Prince et al. 1989, Field et al. 2004*). Οι παράγοντες κινδύνου για πνευμονική MAC λοίμωξη περιλαμβάνουν το κάπνισμα σε συνδυασμό με τη παρουσία χρόνιας αποφρακτικής πνευμονικής νόσου, την πνευμονοκονίαση, τη βρογχεκτασία πριν από φυματίωση ή άλλες παθήσεις που οφείλονται σε μυκοβακτηρίδια, τον αλκοολισμό, και την πνευμονική κυψελιδική πρωτεΐνωση. Απασχόληση σε σκόνη που δημιουργούν τα επαγγέλματα, όπως της εξόρυξης άνθρακα και της βιολογικής γεωργίας, είναι επίσης παράγοντας κινδύνου.

Υπάρχουν ακόμη περιπτώσεις στις οποίες οι ασθενείς αποικίζονται ή και νοσούν από άτυπη λοίμωξη χωρίς υποκείμενη πνευμονική νόσο. Η πιο κοινή προδιαθεσιακή κατάσταση είναι η αποφρακτική πνευμονοπάθεια και μόνο σε ένα μικρό ποσοστό της τάξεως του 20-30% δεν προϋπήρχε εμφανής πνευμονική πάθηση. Από τα κλινικά και ακτινογραφικά στοιχεία η νόσος δεν διαφέρει από αυτή που προκαλείται από το *M. tuberculosis* (εικόνα 4.6).



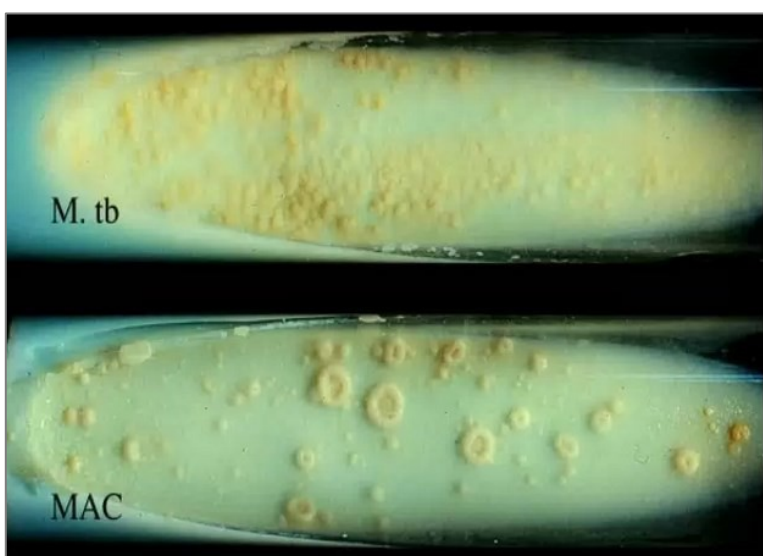
Εικόνα 4.6. (α) Τα *M. avium* complex μυκοβακτηρίδια είναι κοντύτερα από το *M. tuberculosis* και (β) τα *M. tuberculosis* είναι αρκετά μεγάλα σε μήκος (κόκκινες γραμμές).

(Πηγή: <http://www.slideshare.net/MicrobeswithMorgan/mycobacteriology>).

Επίσης, έχει αποδειχτεί ότι ακόμα και απολύτως υγιή άτομα μπορεί να μολυνθούν από άτυπα μυκοβακτηρίδια ύστερα μακροχρόνια έκθεση σε αυτά.

Η απομόνωση και ταυτοποίηση των NTM σε ασθενείς είναι υψίστης σημασίας για τη δημόσια υγεία, γιατί αν η αιτία της νόσου είναι το *M. tuberculosis*, πρέπει να αποφευχθεί η επαφή των πασχόντων με άλλους ανθρώπους προς αποφυγή μεταδόσεως της νόσου. Συνεπώς, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για τη διαθεσιμότητα ειδικών για κάθε είδος άτυπου μυκοβακτηριδίου δερματικών δοκιμασιών. Όμως κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει διότι πολλά αντιγόνα είναι κοινά μεταξύ διαφορετικών ειδών NTM. Η απουσία των ειδικών διαγνωστικών χαρακτηριστικών στη φυσική εξέταση και η μειωμένη διαγνωστική αξία των δερματικών δοκιμασιών, καθιστούν την απομόνωση των NTM μέσω κλασικών τεχνικών (καλλιέργεια), απαραίτητη για τη διάγνωση.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η απομόνωση των NTM με την καλλιέργειά τους είναι απαραίτητη για τη διάγνωση. Παρόλα αυτά, εφόσον οι συγκεκριμένοι οργανισμοί απαντώνται συχνά στο περιβάλλον, η επιλοίμωξη του υλικού καλλιέργειας είναι πιθανή. Επομένως, μία μοναδική θετική καλλιέργεια πτυέλων, ειδικά με μικρό αριθμό άτυπων μικροοργανισμών, δεν επαρκεί πάντα για τη διάγνωση της νόσου. Είναι σημαντικό να γίνει σαφές ότι η απομόνωση των άτυπων μυκοβακτηριδίων από δείγματα της αναπνευστικής οδού ασθενών δεν σημαίνει απαραίτητα ότι ο ασθενής αυτός έχει άτυπη φυματίωση (εικόνα 4.7).



Εικόνα 4.7. Διαφορές στις αποικίες *M. tuberculosis* και MAC.
(Πηγή: <http://www.slideshare.net/cud2018/mycobacteria-practical>).

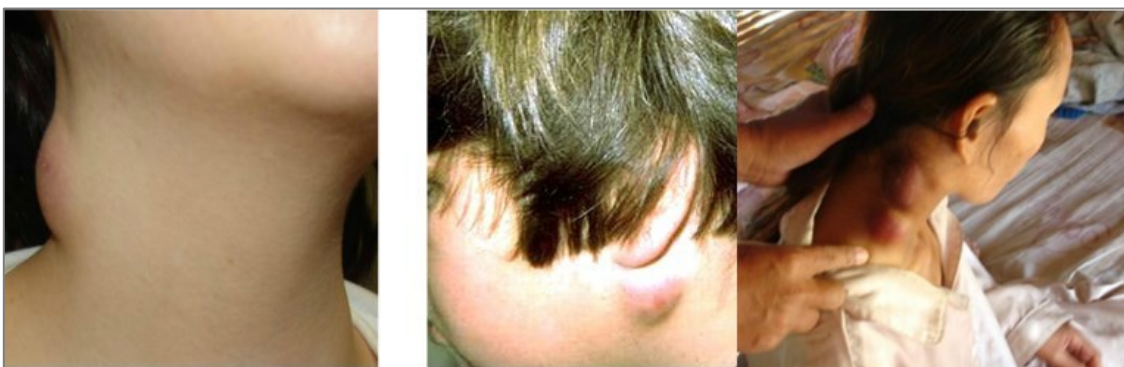
Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, η διάγνωση της πνευμονικής νόσου από άτυπα μυκοβακτηρίδια στηρίζεται στο συνδυασμό των ακτινολογικών, των κλινικών και των εργαστηριακών ευρημάτων.

4.2.2 Λεμφαδενίτιδα

Η λεμφαδενίτιδα όταν οφείλεται σε περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια, προσβάλλει τους τραχηλικούς λεμφαδένες, κυρίως των μικρών παιδιών, μεταξύ του πρώτου και του πέμπτου έτους της ηλικίας τους (εικόνα 4.8). Εντοπίζεται κυρίως στην πλάγια τραχηλική χώρα, αλλά και στους πρωταίους, υπογνάθιους και υπερκλείδιους λεμφαδένες, ενώ η έναρξή της είναι ύπουλη με

σπάνια συστηματικά συμπτώματα. Οι αδένες είναι μονόπλευροι στο 95% των περιπτώσεων και η ακτινογραφία θώρακα συνήθως φυσιολογική. Η κύρια πηγή μόλυνσης από τα άτυπα μυκοβακτηρίδια είναι το περιβάλλον, δηλαδή το νερό, το χώμα και η σκόνη.

Πρόσφατες εκθέσεις έχουν δείξει ότι το *M. avium* είναι η πιο κοινή αιτία εμφάνισης λεμφαδενίτιδας σε παιδιά στην Αγγλία και στις Ηνωμένες Πολιτείες. Οι μικροοργανισμοί που συχνότερα ευθύνονται είναι το *M. avium* του συμπλέγματος MAC και το *M. malmoense*, τα οποία χρησιμοποιούν τη στοματική κοιλότητα ως την κύρια πύλη εισόδου στον οργανισμό.



Εικόνα 4.8. Λεμφαδενίτιδες από NTM.

Σαν πύλες εισόδου περιλαμβάνονται οι αμυγδαλές και τα τραυματισμένα ούλα κυρίως μετά από οδοντιατρική θεραπεία ([Jenkins 1991](#)). Τα ανωτέρω NTM, σύμφωνα με έρευνες, συχνά απομονώνονται από το γάλα γεγονός που μπορεί να ερμηνεύσει την υψηλή συχνότητα των περιστατικών σε παιδιά ([Chapman 1968](#)).

Τα περισσότερα παιδιά με άτυπη λεμφαδενίτιδα θετικοποιούν την ειδική δερματική δοκιμασία, όπως είναι το PPD-B για το *M. avium* complex. Η διάκριση της φυματιώδους λεμφαδενίτιδας που προκαλείται από το *M. tuberculosis* complex από την άτυπη λεμφαδενίτιδα είναι απαραίτητη, επειδή η πρώτη απαιτεί θεραπεία ενώ η δεύτερη όχι. Η λοίμωξη αυτή δεν εμφανίζει συνήθως συστηματικές εμπλοκές.

Τα *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. xenopi* και *M. fortuitum* σπανίως έχουν αναφερθεί σαν αιτιολογικοί παράγοντες της λεμφαδενίτιδας.

4.2.3 Δερματοπάθειες

Τα άτυπα μυκοβακτηρίδια που προκαλούν φυματίωση του δέρματος, του υποδόριου ιστού, των συνδέσμων, των τενόντων και των οστών είναι το *M. fortuitum* (εικόνα 4.9), το *M. abscessus*, το *M. marinum* και το *M. ulcerans*.



Εικόνα 4.9. Αποικίες του *M. fortuitum*.

(Πηγή: <http://reference.medscape.com/features/slideshow/mycobacteria>)

Οι πιο συχνές πύλες εισόδου είναι τα σημεία συχνών μικροτραυματισμών, όπως τα νύχια, τα ανοικτά χειρουργικά τραύματα ή τα κατάγματα. Το *M. marinum* είναι η αιτία του «κοκκιώματος της πισίνας» ή του «κοκκιώματος του ενυδρείου».

Οι προσβεβλημένες περιοχές συνήθως εμφανίζονται ως βλατίδες εντοπισμένες στους αγκώνες, στα γόνατα και στις πελματιαίες επιφάνειες των ποδιών και των χεριών, που προοδευτικά μετατρέπονται σε δερματικά έλκη. Οι μικροοργανισμοί εισέρχονται στο δέρμα από παλαιότερα σημεία τραυματισμού κατά τη διάρκεια καθαρισμού ψαριών ή από τραύματα ψαριών θαλάσσιου νερού. Θεραπεία εκλογής είναι η χειρουργική αφαίρεση σε συνδυασμό με πλαστική επέμβαση του δέρματος.

Το συχνότερα απομονωμένο μυκοβακτηρίδιο από δερματικές αλλοιώσεις είναι το *M. marinum* (εικόνα 4.10). Οι πιο συχνές πύλες εισόδου είναι τα σημεία συχνών μικροτραυματισμών, όπως τα νύχια ή τα ανοικτά χειρουργικά τραύματα. Επίσης το *M. marinum* είναι η αιτία του «κοκκιώματος

της πισίνας» ή του «κοκκιώματος του ενυδρείου» έπειτα από την επαφή με το νερό κολυμβητικών δεξαμενών και ενυδρείων.



Εικόνα 4.10. Δερματικές λοιμώξεις από *M. marinum*.

(Πηγή: <http://reference.medscape.com/features/slideshow/mycobacteria>).

Έρευνες αναφέρουν την απομόνωση του μικροοργανισμού *M. marinum* από δερματικές αλλοιώσεις ασθενούς και από το νερό ενυδρείου (Barrow and Hewitt 1971). Επίσης, ο Neidecken (1984), αναφέρει δερματοπάθεια με το χαρακτηριστικό όνομα «κοκκίωμα των κολυμβητών». Η νόσος μεταδόθηκε από το *M. marinum*, το οποίο ενδημούσε στο νερό κολυμβητηρίου. Παρόμοια περιγραφή έχει γίνει από τον Havelaar (1985).

Άλλοι ερευνητές έχουν συνδέσει τη νόσο με μολύνσεις που συμβαίνουν συχνότερα στα άκρα (χέρια, γόνατα) κατά την κολυμβητική δραστηριότητα (DuMoulin & Stottmeier 1986). Οι προσβεβλημένες περιοχές συνήθως εμφανίζονται ως βλατίδες εντοπισμένες στους αγκώνες, στα γόνατα και στις

πελματιαίες επιφάνειες των ποδιών και των χεριών, που προοδευτικά μετατρέπονται σε δερματικά έλκη. Η συμμετοχή γειτονικών λεμφαδένων είναι σπάνια. Οι μικροοργανισμοί εισέρχονται στο δέρμα από παλαιότερα σημεία τραυματισμού κατά τη διάρκεια καθαρισμού ψαριών ή από τραύματα ψαριών θαλάσσιου νερού.

Η διάγνωση γίνεται με την ανεύρεση του NTM σε καλλιέργεια του προσβεβλημένου ιστού ή από βιοψία. Όσον αφορά τα μυκοβακτηρίδια *M. ulcerans* και *M. Fortuitum* – *M. chelonae* αποτελούν επίσης αιτιολογικούς παράγοντες μόλυνσεων και σύμφωνα με έρευνες το *M. ulcerans* προκαλεί έλκη σε ασθενείς τροπικών περιοχών (εικόνα 4.11).



Εικόνα 4.11. Δερματικές λοιμώξεις από *M. ulcerans*.

Το σύμπλεγμα *M. fortuitum* – *M. chelonae* έχει απομονωθεί επίσης από ποικίλες περιβαλλοντικές πηγές και έχει βρεθεί ότι προκαλεί αποστήματα μετά από ενέσεις όταν το διαλυτικό της ένεσης έχει ρυπανθεί με αυτό το μυκοβακτηρίδιο (*Jenkins 1991*), (εικόνα 4.12).



Εικόνα 4.12. Δερματική λοίμωξη από *M. Chelonae*.

(Πηγή: <http://reference.medscape.com/features/slideshow/mycobacteria>)

Οι δερματικές παθήσεις με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης, οι οποίες οφείλονται στα παραπάνω μυκοβακτηρίδια αναφέρονται στις τροπικές κυρίως περιοχές (Αφρική, Αυστραλία, Μεξικό και Κορέα), όπου αναλογία προσβολής μεταξύ ανδρών και γυναικών είναι της τάξης δυο προς ένα σύμφωνα με διάφορους ερευνητές (DuMoulin & Stottmeier 1986).

4.2.4 Γενικευμένη Νόσος από NTM σε Ασθενείς με AIDS

Η γενικευμένη νόσος από άτυπα μυκοβακτηρίδια μπορεί να παρατηρηθεί σε ασθενείς με AIDS. Συμβαίνει συνήθως σε οροθετικά (HIV) άτομα με προχωρημένη ανοσοκαταστολή. Άτυπα μυκοβακτηρίδια, που αποτελούν αίτια γενικευμένης νόσου στους οροθετικούς (HIV) ασθενείς, είναι τα *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. malmoense* και *M. avium*. Στις προηγμένες χώρες, πριν την εμφάνιση του AIDS, τα περιστατικά των λοιμώξεων που οφείλονταν σε άτυπα μυκοβακτηρίδια μειώνονταν. Με την εμφάνιση της πανδημίας του AIDS εκτιμάται ότι περίπου το 25%-50% των οροθετικών ασθενών τόσο στην Ευρώπη όσο και στην Αμερική μολύνονται με

άτυπα μυκοβακτηρίδια (*Horsburg 1991*).

Η εξέλιξη της νόσου σε ασθενείς που πάσχουν από AIDS είναι πολύ πιο γρήγορη. Οι πάσχοντες και οι φορείς του AIDS παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα νόσησης λόγω της ανοσοκαταστολής. Οι ασθενείς με πρωτομόλυνση συνήθως μεταπίπτουν σε νόσηση με πολλές ατυπίες. Τα συμπτώματα σε ασθενείς με AIDS είναι ο υψηλός παρατεταμένος πυρετός, ο οποίος συχνά συνοδεύεται και από νυκτερινούς ιδρώτες, η απώλεια βάρους και τα συμπτώματα από το γαστρεντερικό, όπως π.χ. διάρροια και κοιλιακά άλγη. Η αναιμία επίσης είναι το πλέον χαρακτηριστικό εργαστηριακό εύρημα για τους περισσότερους ασθενείς, με αιματοκρίτη μικρότερο από 25%. Η αλκαλική φωσφατάση είναι αυξημένη στο ένα τρίτο των ασθενών και μπορεί να είναι ενδεικτική της ηπατικής προσβολής από το *M. avium*. Επομένως, η διάγνωση της γενικευμένης νόσου από το *M. avium* είναι πολύ πιθανή σε κάθε HIV - θετικό άτομο με ιστορικό εμπύρετου, απώλειας βάρους, αναιμίας, διάρροιας ή αυξημένης αλκαλικής φωσφατάσης, καθώς και ιστορικό άλλων ευκαιριακών λοιμώξεων.

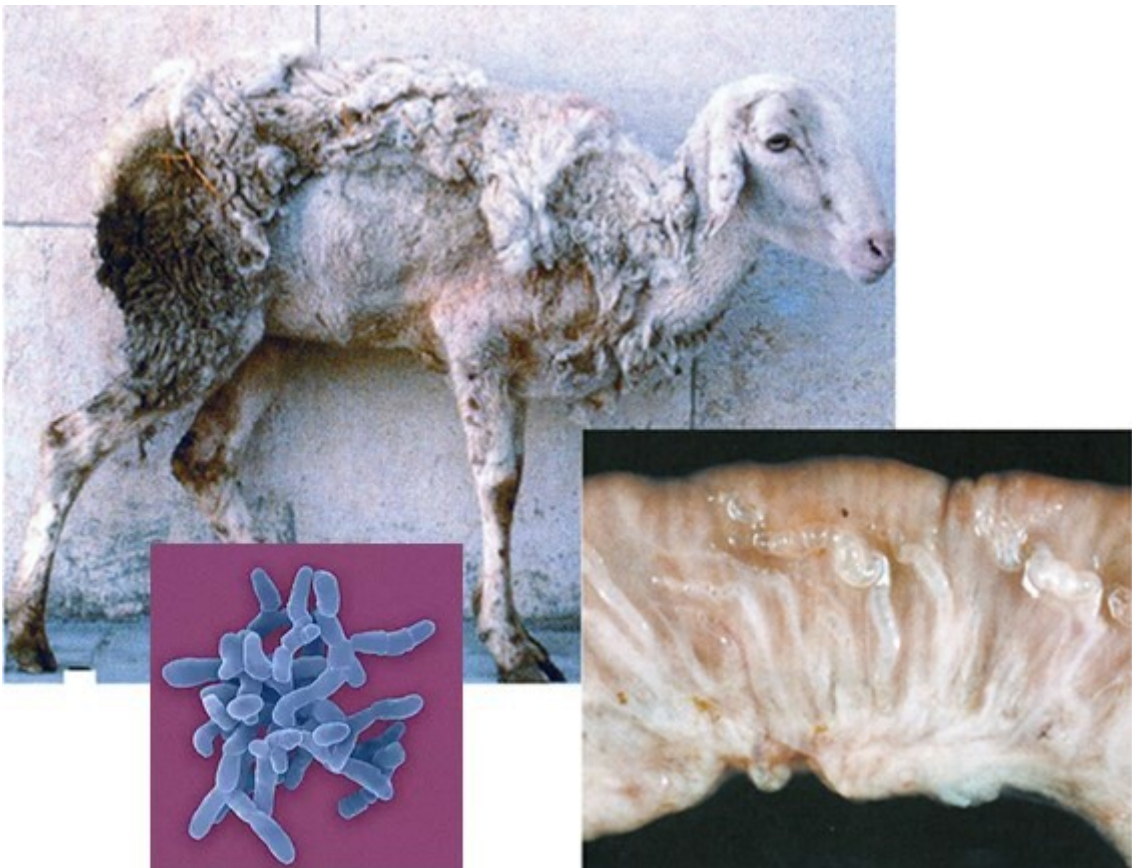
Επίσης τα άτυπα μυκοβακτηρίδια μπορούν να προσβάλλουν άτομα με κάποιο είδος ανοσοκαταστολής, π.χ. λευχαιμία. Τα άτυπα μυκοβακτηρίδια που επικρατούν σε αυτή την κατηγορία είναι το *M. avium complex*, το *M. kansasii*, το *M. chelonae*, το *M. scrofulaceum*, το *M. abscessus* και το *M. haemophilum*. Η νόσος μπορεί να εκδηλωθεί είτε ως πυρετός άγνωστης αιτιολογίας, είτε ως γενικευμένη λεμφαδενοπάθεια που αποδράμει αυτόματα. Η θνητότητα σχετίζεται με το είδος και τη σοβαρότητα της υποκείμενης νόσου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

Κεφάλαιο 5^ο – Παραφυματίωση

5.1 *M. paratuberculosis* Λοιμώξεις

Το *M. paratuberculosis* είναι μέλος του *M. avium*, και θεωρείται ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου του Johne στα βοοειδή και στα αιγοπρόβατα (εικόνα 5.1). Η νόσος του Johne είναι μια αργή, σταδιακή μόλυνση του έντερου σε βοοειδή. Η *M. paratuberculosis* λοίμωξη μπορεί να οδηγήσει σε διάρροια και θάνατο των μολυσμένων ζώων. Η κύρια οδός μόλυνσης στα βοοειδή είναι από τη μητέρα στο μοσχάρι.



Εικόνα 5.1. Παραφυματίωση προβάτου από *M. paratuberculosis*.

Το *M. paratuberculosis* έχει αποδειχθεί ότι είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου του Johne στα βοοειδή, όμως υπάρχουν στοιχεία που συνδέουν τα άτυπα μυκοβακτηρίδια, συμπεριλαμβανομένων του *M.*

patatuberculosis, με τη νόσο του Crohn στους ανθρώπους. Η νόσος του Crohn είναι μια χρόνια φλεγμονώδη του γαστρεντερικού σωλήνα, ενδεχομένως μυκοβακτηριδιακής προέλευσης. Επιδημιολογικές μελέτες για τη συχνότητα και τη γεωγραφική κατανομή της νόσου του Crohn, έχουν προτείνει ότι προκαλείται από μολυσματικό οργανισμό. Η απομόνωση του *M. kansasii* από ιστό ασθενών με νόσο του Crohn έχει επίσης αναφερθεί.

Μια οδός μόλυνσης του ανθρώπου, με αποτέλεσμα την εμφάνιση της νόσου του Crohn, έχει προταθεί σε μελέτες που ομαδοποιούν τις περιπτώσεις της νόσου που έχουν εμφανιστεί κατά μήκος ενός ποταμού. Θεωρείται ότι η παρουσία του *M. patatuberculosis* στο ποτάμι είναι αποτέλεσμα της απόρριψης υλικού από μολυσμένα βοοειδή σε αυτό. Άρα, η λοίμωξη του ανθρώπου θα προκύψει είτε μέσω του πόσιμου ύδατος ή με έκθεσή του σε μολυσμένο νερό. Αποδεικτικά στοιχεία για την παρουσία του *M. patatuberculosis* στο γάλα δείχνει ότι η αιτία της παρουσίας του ήταν η ανεπαρκής παστερίωση, που θα μπορούσε να οδηγήσει σε λοιμώξεις. Οι μελέτες γεωγραφικής ομαδοποίησης των περιπτώσεων εμφάνισης της νόσου του Crohn δείχνουν ότι ένας πρόσθετος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου του Crohn είναι η γεωγραφική τοποθεσία ([Autschbach et al. 2005](#); [Biet and Boschioli 2014](#); [Chacon et al. 2004](#); [Chamberlin and Naser 2006](#); [Feller et al. 2007](#); [Gill et al. 2011](#); [Kaevska and Hruska 2010](#); [Mendoza et al. 2009](#); [Pavlik et al. 2007](#); [Robbe-Austerman et al. 2013](#); [Ryan et al. 2002](#); [Sohal et al. 2008](#); [Thorel et al. 1990](#)).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

Κεφάλαιο 6^ο – Ποιότητα Πόσιμου Ύδατος & Δημόσια Υγεία

Το νερό είναι από τους σπουδαιότερους παράγοντες για την ανάπτυξη και διατήρηση της ζωής, είναι ανανεώσιμος φυσικός πόρος και η βιώσιμη διαχείριση του συμβάλει στην αειφορία του περιβάλλοντος και την προαγωγή της δημόσιας υγείας. Η ποιότητα του νερού σχετίζεται με τις ουσίες που εμφανίζονται σε αυτό, είτε διαλυμένες είτε αιωρούμενες υπό την μορφή μικρών σωματιδίων. Το νερό μπορεί να είναι φορέας παθογόνων μικροοργανισμών που προκαλούν εξασθένηση του ανθρώπινου οργανισμού.

Το νερό είναι ένα αγαθό αναντικατάστατο, συνεχούς, καθημερινής χρήσεως και ευρείας κατανάλωσης. Ως τέτοιο, πρέπει να είναι ακίνδυνο από κάθε πλευρά, να μην είναι μολυσμένο (να μην έχει παθογόνα μικρόβια ή προϊόντα τους) και επίσης να μην περιέχει ρύπους (να μην έχει χημικές ουσίες επικίνδυνες). Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού θα πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ ορισμένων αποδεκτών ορίων, τα οποία έχουν θεσπιστεί νομοθετικά. Στην Ελλάδα, καθορίζονται με την Κοινή Υπουργική Απόφαση Υ2/2600/2001 που αποτελεί συμμόρφωσή της Ελληνικής Νομοθεσίας προς την Ευρωπαϊκή Οδηγία 98/83/ΕΚ.

Η μικροβιολογική εξέταση του υδατίνου περιβάλλοντος είναι πρωταρχικής σημασίας υγειονομική πράξη για την προάσπιση της Δημόσιας Υγείας και αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ομαλή διαβίωση του ατόμου και του κοινωνικού συνόλου. Εάν δεν είναι απαλλαγμένο επικίνδυνων μικροοργανισμών το νερό είναι δυνατό να αποβεί μέσο μεταφοράς, διασποράς και μεταδόσεως παθογόνων ή δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών στον άνθρωπο (*APHA 1989; EU Directive 98/83/EC & 2000/60/EC; EU Directive 2006/118/EU; White & Passmor 1985; WHO 2003 & 2004a*).

Οι υδατογενείς επιδημίες προκαλούνται από τα παθογόνα μικρόβια που έχουν προέλευση την κοπρανώδη μόλυνση του νερού. Επειδή ο έλεγχος όλων των παθογόνων μικροβίων που προέρχονται από το εντερικό περιεχόμενο ζώων και ανθρώπων απαιτεί ποικιλία πολύπλοκων, χρονοβόρων και πολυέξοδων αναλύσεων, χρησιμοποιήθηκε ή ιδέα της ανίχνευσης μικροβίων – δεικτών που να είναι ενδεικτικοί ακόμη και της ενδεχόμενης παρουσίας λυμάτων

στο νερό. Ωστόσο οι γνωστοί δείκτες ρύπανσης του νερού συχνά τίθενται υπό αμφισβήτηση.

Έχει επιχειρηθεί κατά καιρούς να χρησιμοποιηθούν τα μυκοβακτηρίδια ως δείκτης ρύπανσης, αλλά υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις μεταξύ των ερευνητών, επειδή δεν πληρούν τους όρους ενός ιδεώδους δείκτη ρύπανσης και συνεπώς δεν χρησιμοποιούνται ευρέως ως δείκτες ρύπανσης. Σημειώνεται ότι σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (WHO), τα άτυπα μυκοβακτηρίδια αναφέρονται σαν πρόσθετος δείκτης ρύπανσης των νερών ([WHO 2004b](#)).

Τα τελευταία χρόνια εμφανίζεται μια σημαντική αύξηση της συχνότητας των λοιμώξεων, που οφείλονται στα άτυπα μυκοβακτηρίδια, γι' αυτό και η μελέτη της παρουσίας τους στο πόσιμο νερό έχει αποκτήσει αυξανόμενη σημασία. Τα ευρήματα των επιστημονικών ερευνών επιβεβαιώνουν τη μετάδοση των άτυπων μυκοβακτηριδίων στον άνθρωπο και τα ζώα από κοινές περιβαλλοντικές πηγές, όπως το νερό, έδαφος, κα. ([Slosarek et al. 1994](#)).

Η ύπαρξη των NTM στο περιβάλλον έχει συνδεθεί με σοβαρές λοιμώξεις στους ασθενείς με ανοσοκαταστολή ([von Reyn et al. 1994](#)). Σύμφωνα με τις διαθέσιμες έρευνες, ομάδες που είναι ευαίσθητες για να εμφανίσουν λοιμώξεις από NTM είναι συνήθως ασθενείς με AIDS, ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς, άτομα μεγάλης ηλικίας και άτομα που πάσχουν από χρόνιες ασθένειες ([Dantec et al. 2002a,b](#); [Falkinham III 2009 and 2011](#); [Gerogianni et al. 2008](#); [Gill et al. 2011](#); [Gitti et al. 2011](#); [Moore et al. 2010](#); [Griffith et al. 2007](#); [Hilborn et al. 2006](#); [Iseman et al. 2008](#); [Jolobe 2011](#); [Kaevska and Hruska 2010](#); [Kamala et al. 1994a,b](#); [Kankya et al. 2011](#); [Lyu et al. 2011](#); [Maekawa et al. 2011](#)).

Ο άνθρωπος δεν μολύνεται από τα άτυπα μυκοβακτηρίδια κατά την διάρκεια επαφής του με άλλον άνθρωπο. Τα άτυπα μυκοβακτηρίδια βρίσκονται στο περιβάλλον και ο άνθρωπος είναι συνεχώς εκτεθειμένος σε αυτά είτε με την κατάποση, είτε με την κολύμβηση, το ψάρεμα και την εισπνοή αεροσταγονιδίων (aerosol).

Το πόσιμο νερό έχει αποδειχθεί πως αποτελεί σημαντική πηγή διαβίωσης των περιβαλλοντικών μυκοβακτηριδίων ([Du Moulin et al 1988](#)).

Άτυπα μυκοβακτηρίδια έχουν απομονωθεί κατά καιρούς από το πόσιμο νερό (*Collins et al. 1984, Fischer et al. 1991; Scarlata et al. 1985*). Η απομόνωση και ταυτοποίηση αυτών των μυκοβακτηριδίων από το υδάτινο περιβάλλον απαιτεί εξειδικευμένο εργαστήριο και προσωπικό. Όλα τα παραπάνω αποτελούν δυσκολίες στην ανεύρεση των άτυπων μυκοβακτηριδίων στο νερό, με αποτέλεσμα τον μικρό αριθμό εργασιών διεθνώς αλλά και στη χώρα μας, που αναφέρονται στην συχνότητα απομόνωσης των μικροοργανισμών αυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

Κεφάλαιο 7^ο – Μυκοβακτηρίδια & Περιβάλλον

7.1 Πηγές Άτυπων

Η ύπαρξη άτυπων μυκοβακτηριδίων στη φύση είναι πλέον ευρέως διαδεδομένη σύμφωνα με έρευνες. Η κύρια πηγή μόλυνσης από τα άτυπα μυκοβακτηρίδια είναι το περιβάλλον, δηλαδή το νερό, το χώμα και η σκόνη. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι η οικολογία και τη φυσιολογία των NTM είναι σημαντικά διαφορετικές από εκείνες των μυκοβακτηριδίων φυματίωσης. Πολλά NTM διαβιώνουν ελεύθερα σε σαπρόφυτο περιβάλλον, αλλά και σε νερά, έδαφος, σκόνη, και αερολύματα. Εκτός από την παρουσία τους σε φυσικό περιβάλλον, τα NTM έχουν ανακτηθεί από συστήματα διανομής πόσιμου νερού, σε όλον τον κόσμο.

Οι περιβαλλοντικές πηγές από τις οποίες απομονώθηκαν άτυπα μυκοβακτηρίδια περιλαμβάνουν φυσικά και πόσιμα ύδατα καθώς επίσης χώμα, αεροσταγονίδια, βιομεμβράνες, εργαλεία ιατρικού εξοπλισμού. Τα MAC, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum* και *M. chelonae* έχει αποδειχθεί ότι πολλαπλασιάζονται στο νερό. Η αντίσταση των NTM στη διαδικασία απολύμανσης αναμφίβολα συμβάλλει στην ικανότητα των NTM (π.χ. *M. xenopi*, *M. avium*, *M. fortuitum*, και *M. chelonae*) να εξακολουθούν να παραμένουν στα συστήματα διανομής πόσιμου ύδατος. Επιπλέον, η παρουσία των NTM σε συστήματα ύδρευσης νοσοκομείων και η αντοχή τους στα απολυμαντικά έχει οδηγήσει σε εμφάνιση νοσοκομειακών λοιμώξεων, όπως μόλυνση βρογχοσκοπίων με το *M. intracellulare* ή *M. chelonae*.

Η συχνότητα της απομόνωσης και ο αριθμός των οργανισμών MAC συσχετίζεται με ορισμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους (φυσιολογική οικολογία). Οι MAC οργανισμοί ανακτώνται σε μεγαλύτερο αριθμό από τα ύδατα και τα εδάφη με χαμηλό pH, με χαμηλή περιεκτικότητα διαλυμένου οξυγόνου, και με υψηλή περιεκτικότητα οργανικής ύλης (δηλαδή, humic και fulvic οξέα). Οι MAC οργανισμοί σε υψηλή συγκέντρωση, βρίσκονται σε παράκτια όξινα καφέ ύδατα και βάλτους στις νοτιοανατολικές Ηνωμένες. Επιπλέον, ο αριθμός MAC συσχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση ψευδάργυρου. Οι MAC οργανισμοί αναπτύσσονται σε φυσικά γλυκά και υφάλμυρα (δηλαδή, μέχρι 2% σε αλάτι)

ύδατα. Έχει αποδειχθεί εργαστηριακά ότι τα MAC παρουσιάζουν βέλτιστη ανάπτυξη σε pH 5 έως 5,5 αυξάνονται μέχρι θερμοκρασίας 45.0°C, σε αντίθεση με τα στελέχη *M. intracellulare*, που μπορούν να αναπτυχθούν μέχρι θερμοκρασίας 42.0°C. Τα ανωτέρω χαρακτηριστικά, σε συνδυασμό με τη σχετική αντοχή των MAC στο χλώριο, συντελούν στην παρουσία των MAC στα συστήματα διανομής πόσιμου νερού, καθώς και στα νοσοκομειακά συστήματα διανομής ζεστού νερού. Η παρουσία των MAC σε συστήματα διανομής νερού μπορεί να οφείλεται, εν μέρει, στην συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης MAC και της συγκέντρωσης ψευδαργύρου, γιατί πολλά συστήματα διανομής ζεστού και κρύου νερού έχουν γαλβανισμένους σωλήνες (δηλαδή, επικαλυμμένους με ψευδάργυρο).

Η αερομεταφορά των οργανισμών αυτών πιθανόν να αποτελεί έναν επιπλέον μηχανισμό μετάδοσης της νόσου. Ακόμα, ορολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η μεταφορά από τα ζώα στον άνθρωπο δεν είναι αξιόλογη και με πρόσφατες μοριακές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι τα είδη που μολύνουν ανθρώπους και ζώα είναι διαφορετικά. Επομένως, είναι πλέον γενικά αποδεκτό ότι οι φυσικές υδάτινες πηγές αποτελούν την κύρια πηγή μόλυνσης για το *M. avium* complex, ενώ απομονώνεται επίσης στο πόσιμο νερό. Έχει βρεθεί ότι τα άτυπα μυκοβακτηρίδια περιλαμβάνουν έναν μεγάλο αριθμό ειδών που βρίσκονται στη φύση και μάλιστα ποικίλουν σε παθογονικότητα ανάλογα με το είδος τους.

Η ανεύρεση μυκοβακτηριδίων αποτελεί σημαντικό στοιχείο για την αντιμετώπιση μολύνσεων που οφείλονται σε άτυπα μυκοβακτηρίδια. Έτσι άρχισαν συστηματικότερα οι έρευνες για ανεύρεση άτυπων μυκοβακτηριδίων σε δείγματα από το περιβάλλον, που περιλάμβαναν δειγματοληψίες από θάλασσες, δεξαμενές, ποτάμια, λίμνες, πισίνες, εμφιαλωμένα νερά και συστήματα ύδρευσης πόσιμου και οικιακού νερού.

7.2 Επιφανειακά Ύδατα

Τα επιφανειακά νερά (ποτάμια - λίμνες) είναι τα γλυκά νερά που χρησιμοποιούνται ή προορίζονται να χρησιμοποιηθούν μετά την εφαρμογή κατάλληλης επεξεργασίας, για την παραγωγή πόσιμου ύδατος.

Διάφορες μελέτες έχουν γίνει κατά καιρούς οι οποίες αναφέρονται στην

ύπαρξη NTM σε φυσικά ύδατα όπως λίμνες, ποτάμια και ρέματα (*Falkinman et al. 1980, Covert et al. 1999*). Η παρουσία των άτυπων μυκοβακτηριδίων σε νερά δεξαμενών είχε ανακοινωθεί από τον *Eilertsen (1969)*, ενώ ο *Paull (1973)*, απομόνωσε μυκοβακτηρίδια και από ποτάμια, λίμνες και δεξαμενές συλλογής βρόχινου νερού στην Νότια Ουαλία. Οι *Viallier & Viallier (1973)*, απομόνωσαν μυκοβακτηρίδια σε υψηλό ποσοστό από διάφορα δείγματα λιμνών, ποταμών και πηγαδιών. Ένα είδος το οποίο συχνά απομονώνονταν ήταν το *M. gordonae*, ενώ δεν ανευρέθηκαν τα *M. marinum*, *M. kansasii* και *M. xenopi*. Οι *Showalter & Wolinsky (1974)* και οι *Goslee & Wolinsky (1976)* απομόνωσαν το *M. gordonae* από λίμνες και ρυάκια της Αμερικής. Οι *Tuffley και Holbeche (1980)*, απομόνωσαν το *M. avium - M. intracellulare - M. scrofulaceum complex* από δεξαμενές συλλογής βρόχινου νερού στην Αυστραλία. Την ίδια χρονιά βρέθηκαν μυκοβακτηρίδια κυρίως MAIS σε δείγματα του νερού και σε δείγματα εδάφους κατά μήκος του ποταμού της Virginia (*Wendt et al. 1980*). Στην Ευρώπη οι *Engel et al. (1980)* απομόνωσαν *M. kansasii* από μια δεξαμενή κοντά στο Rotterdam. *M. gordonae* απομονώθηκε από τον *Bionde (1982)* σε πηγάδια της Ιταλίας. Οι *Lévy-Frébault (1983)*, ανακοίνωσαν την απομόνωση ενός νέου μυκοβακτηριδίου του *M. fallax* από λίμνες και ποτάμια της Γαλλίας. Επίσης, έχουν καταγραφεί άτυπα μυκοβακτηρίδια σε ύδατα που παρουσιάζουν ευτροφισμό λόγω της περιορισμένης ποσότητας σε διαλυμένο οξυγόνο. Τα ύδατα αυτά έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε οργανικά υλικά γεγονός ιδιαίτερα επιβαρυντικό για την ποιότητά τους (*Falkinham et al. 1980*).

Γενικότερα τα ύδατα τα οποία είναι στάσιμα, βαλτώδη είναι ιδιαίτερα όξινα, αποτελούν ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών όπως τα άτυπα μυκοβακτηρίδια.

7.3 Υφάλμυρα Ύδατα & Θαλασσινό Νερό

Δεδομένου ότι από παλιά είχαν απομονωθεί μυκοβακτηρίδια από θαλάσσιους οργανισμούς, η ύπαρξη τους στο θαλασσινό νερό θεωρούνταν σχεδόν βέβαιη. Σε υφάλμυρα ύδατα έχουν κατά καιρούς ανιχνευτεί άτυπα μυκοβακτηρίδια, ωστόσο η παρουσία των NTM στο θαλασσινό νερό θεωρείται

σπάνια γιατί οι μικροοργανισμοί αυτοί δυσκολεύονται να αναπτυχθούν σε συνθήκες μεγάλης αλατότητας (George et al. 1980).

Παρόλα αυτά προσπάθειες του Viallier (1973a,b, 1974, 1982) για απομόνωση NTM από τις ακτές της Γαλλίας, οδήγησαν στην απομόνωση αποκλειστικά των *M. avium* - *M. Intracellulare* - *M. scrofulaceum* (MAIS), ενώ δεν κατέστη δυνατή η απομόνωση *M. kansasii* και *M. xenopi*.

7.4 Κολυμβητικές Δεξαμενές

Η παρουσία των NTM στο πόσιμο νερό σύμφωνα με έρευνες δείχνει ότι όταν αυτό χρησιμοποιείται και για άλλες χρήσεις, τότε θα περιέχει και εκεί μεγάλο αριθμό NTM.

Η παρουσία NTM σε κολυμβητικές δεξαμενές έχει συνδεθεί με μολύνσεις ατόμων που έχουν εκτεθεί σε νερό με άτυπα μυκοβακτηρίδια. Οι σχετικές έρευνες αναφέρουν ότι το *M. marinum* είναι η αιτία του «κοκκιώματος της πισίνας» ή του «κοκκιώματος του ενυδρείου», μια δερματοπάθεια η οποία αποδόθηκε στο *M. marinum*, το οποίο ενδημούσε στο νερό του κολυμβητηρίου. Επίσης NTM έχουν βρεθεί κατά καιρούς σε spa, καθώς και θερμά λουτρά (Havelaar et al. 1985, Kahana et al. 1997). Επίσης, οι Havelaar et al. (1985) έλεγξαν δείγματα νερού από πισίνες καθώς και δείγματα νερού από το αντίστοιχο δίκτυο ύδρευσης που τροφοδοτούσε τις πισίνες και απομόνωσαν NTM, με επικρατέστερο στέλεχος το *M. gordonae*.

7.5 Πόσιμο Νερό

Το νερό είτε στην φυσική του κατάσταση είτε μετά από επεξεργασία που χρησιμοποιείται για ανθρώπινη κατανάλωση και ανεξαρτήτως από την πηγή προέλευσής του (δίκτυο διανομής, βυτία, φιάλες) χαρακτηρίζεται ως πόσιμο. Το νερό που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση πρέπει να είναι αβλαβές για την υγεία των ανθρώπων, οργανοληπτικά άμεμπτο, απολύτως καθαρό και απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς και ουσίες σε αριθμούς και συγκεντρώσεις που αποτελούν κίνδυνο για την δημόσια υγεία.

Σύμφωνα με έρευνες παρατηρείται ότι κατά τις τελευταίες δεκαετίες η φυσική ποιότητα των υδατικών πόρων υποβαθμίστηκε εξ' αιτίας των διαφόρων

ανθρωπίνων δραστηριοτήτων και χρήσεων του νερού.

Το πόσιμο νερό αποτελεί μια από τις σημαντικότερες πηγές διαβίωσης περιβαλλοντικών μυκοβακτηριδίων (*Glover et al. 1994, Ristola et al. 1999, Falkinhal et al. 2001*), με συχνότερα είδη τα *M. avium*, *M. chelonae*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. gordonae* και *M. xenopi*. Επίσης NTM έχουν βρεθεί και σε πολύπλοκα συστήματα νερού, όπως σε νοσοκομεία (*Vantarakis et al. 1998*). Μελέτες έδειξαν ότι τα παραπάνω συστήματα συχνά αποτελούν σημαντικές πηγές διαβίωσης των NTM. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία NTM έχουν βρεθεί και σε δημόσια συστήματα παροχής πόσιμου νερού.

Μέχρι τις μέρες μας έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 125 είδη άτυπων μυκοβακτηριδίων εκ των οποίων τα 33 έχουν βρεθεί σε συστήματα ύδρευσης. Μια πρώτη προσέγγιση για απομόνωση NTM από συστήματα ύδρευσης έγινε από τους ερευνητές *Kubica et al. (1963a,b)* και *Paull (1973)*, οι οποίοι απομόνωσαν οξεάντοχους μικροοργανισμούς από πόσιμο νερό. Αργότερα απομονώθηκε το *M. xenopi* από πόσιμο νερό της Αμερικής (*Bailey et al. 1970 & 1983*). Μια άλλη μελέτη αναφέρει μεγάλο αριθμό μολύνσεων από *M. kansasii* σε μια περιοχή του βόρειου Λονδίνου η οποία οφείλονταν στην ύπαρξη NTM στο πόσιμο νερό της περιοχής (*Mc Swiggan, Collins, 1974*).

Τα άτυπα μυκοβακτηρίδια στην περίπτωση που εισχωρήσουν στο σύστημα ύδρευσης μπορούν υπό συγκεκριμένες συνθήκες οι οποίες ευνοούν την ανάπτυξή τους να παραμείνουν εκεί. Η επίδραση της θερμοκρασίας, του χλωρίου, του pH, του οργανικού υποστρώματος και διαφόρων άλλων παραμέτρων αποτελούν παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη ορισμένων ειδών μυκοβακτηριδίων στα υδάτινα συστήματα. Οι παραπάνω παράγοντες ευνοούν την ανάπτυξη των NTM, τα οποία μπορούν και επιβιώνουν σε χαμηλές θρεπτικές συγκεντρώσεις και αλληλεπιδρούν με πρωτόζωα που βρίσκονται στις σωληνώσεις, σχηματίζοντας βιομεμβράνες.

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των NTM παρουσιάζει διαφορές από είδος σε είδος. Η πλειοψηφία των ερευνητών υποστηρίζει ως βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους (30-37)°C, (*Fischeder et al. 1991*).

Τα NTM, σε σχέση με άλλα βακτηριδιακά είδη, είναι πολύ ανθεκτικά στην απολύμανση με χημικά μέσα όπως το χλωρίο, γι' αυτό και πολλές φορές έπεται από χημική επεξεργασία στις εγκαταστάσεις ύδρευσης εξακολουθούν να βρίσκονται NTM, που καταλήγουν στο νερό της βρύσης (*Carson et al. 1978, Dantec et al. 2002a,b, Taylor et al. 2000*). Η ανεύρεση των δυνητικά παθογόνων μυκοβακτηριδίων σε χλωριωμένα νερά αποδεικνύει την μη αποτελεσματική χρήση του χλωρίου ως μέσο απολύμανσης του πόσιμου ύδατος. Η επίδραση του χλωρίου σε ορισμένα είδη μελετήθηκε από τον Eyres (1978) ο οποίος πρόσθεσε τα *M. xenopi* και *M. kansasii* σε νερό με διαδοχικές συγκεντρώσεις χλωρίου 0.1 - 1.0 mg/lit και μετά από το χρονικό διάστημα των επτά ημερών διαπίστωσε την επιβίωση τους. Οι *Bailey (1970)* και *Chapman (1971)* επισημαίνουν επίσης την αντίσταση των NTM στην χλωρίωση και ο Engelbrecht (1974) αναφέρει μείωση κατά 65% του αριθμού των μυκοβακτηριδίων μετά την έκθεσή τους για 5 λεπτά σε χλωριωμένο νερό συγκέντρωσης 1.1 mg/lit, pH = 7 και θερμοκρασίας 23°C.

Επιπρόσθετα έχει βρεθεί ότι τα είδη των NTM μπορεί να είναι είτε θερμόφιλα είτε μεσόφιλα, γεγονός που σημαίνει ότι μπορούν και επιβιώνουν σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως αυτές που υπάρχουν στις σωληνώσεις παροχής του ζεστού νερού, π.χ. βρύσες και ντους (*Schulze-Robbecke et al. 1992; Du Moulin 1988*).

7.6 Άλλες Πηγές

NTM έχουν βρεθεί στις σωληνώσεις των δικτύων ύδρευσης, όπου, σε κατάλληλες θρεπτικές συνθήκες, μπορούν όχι μόνο να επιζήσουν αλλά και να πολλαπλασιαστούν. Λόγω της παλαιότητας και της κακής συντήρησης των δικτύων ύδρευσης, τα NTM σχηματίζουν σε αυτά βιομεμβράνες, οι οποίες αποτελούν άριστο περιβάλλον ανάπτυξης τους, σε συνδυασμό με την κατάλληλη θερμοκρασία και γενικότερα την κατάσταση του νερού στο δίκτυο ύδρευσης (*Falkinham III et al. 2001, Schulze-Robbecke et al. 1992a,b*).

Άλλες βιβλιογραφικές πηγές αναφέρουν την ύπαρξη NTM σε χώμα, αεροζόλ ακόμα και σε σκόνη (*Falkinham et al. 2002*), ενώ άλλοι ερευνητές αναφέρουν την ύπαρξη τους σε εργαλεία ιατρικού εξοπλισμού (*Gangadharan &*

Jekins 1998). Τα NTM είναι εξαιρετικά ανθεκτικά στα διάφορα χημικά μέσα απολύμανσης, οπότε η παρουσία τους στο περιβάλλον ολοένα και αυξάνει, αυξάνοντας και το ενδιαφέρον των ερευνητών για αυτά (*Hale et al. 2001; Kamala et al. 1994a,b; Kubica et al. 1963b; Schulze-Robbecke et al. 1991; Thomson et al. 2008*).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο

Κεφάλαιο 8^ο – Άτυπα Μυκοβακτηρίδια – Μέτρα Πρόληψης

8.1 Μέτρα Πρόληψης

Η ύπαρξη των άτυπων μυκοβακτηριδίων στο πόσιμο νερό αποτελεί πρόβλημα που χρήζει αντιμετώπισης. Είναι γενικά αποδεκτή η άποψη ότι το θέμα αυτό πρέπει να αντιμετωπιστεί γιατί είναι μεγάλης σημασίας για τη δημόσια υγεία και ειδικότερα για συγκεκριμένες ομάδες του πληθυσμού.

Λόγω της πολυπλοκότητας του δικτύου ύδρευσης, η παρουσία NTM σε αυτό δεν μπορεί να αποκλειστεί και αυτό επειδή τα περισσότερα δίκτυα ύδρευσης είναι παλαιά, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό βιομεμβρανών, που θεωρούνται άριστο περιβάλλον για την ανάπτυξη των NTM.

Ο καθαρισμός των σωληνώσεων και η αντικατάσταση όσων έχουν αλλοιωθεί, καθώς επίσης και ο έλεγχος των θρεπτικών στοιχείων, μπορεί να αποτρέψουν τον σχηματισμό των βιομεμβρανών και άρα την ανάπτυξη NTM. Η σωστή χλωρίωση του πόσιμου ύδατος είναι καθοριστική στην απολύμανση του δικτύου ύδρευσης αν και αυτό φαίνεται ότι δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των NTM, δεδομένου ότι πολλά από τα NTM που διαβιούν στα συστήματα παροχής πόσιμου νερού είναι ανθεκτικά στη χλωρίωση.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 9^ο – Ειδικό Μέρος

9.1 Σκοπός της Μελέτης

Στο γενικό μέρος παρουσιάστηκαν τα στοιχεία που καταδεικνύουν ότι τα άτυπα μυκοβακτηρίδια αποτελούν αιτίες νόσησης των ανθρώπων, ενώ για μεγάλο χρονικό διάστημα η σημασία τους ως περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου εμφάνισης λοιμώξεων στους ανθρώπους δεν είχε επαρκώς μελετηθεί, επισκιαζόμενη από τα μυκοβακτηρίδια της φυματίωσης.

Καθώς πλέον έχει γίνει αντιληπτό ότι τα NTM αποτελούν αίτιο για την εμφάνιση πολλών λοιμώξεων στους ανθρώπους, η διεθνής επιστημονική κοινότητα αρχίζει να μελετά πιο συστηματικά τον ρόλο τους, καθώς και τον τρόπο μετάδοσής τους στον άνθρωπο.

Λαμβάνοντας υπόψη τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα, που σημειωτέον είναι ακόμη αποσπασματικά, ένας πιθανός τρόπος διάδοσης των PEM στον άνθρωπο είναι μέσω του νερού.

Η Ελληνική και η ευρωπαϊκή νομοθεσία δεν περιλαμβάνει στον έλεγχο της μικροβιολογικής ποιότητας του πόσιμου ύδατος τον προσδιορισμό των άτυπων μυκοβακτηριδίων. Έτσι, ένας από τους σκοπούς της παρούσας μελέτης, είναι να συνεισφέρει και αυτή με περισσότερα στοιχεία, ώστε να γίνει καλύτερα κατανοητός ο ρόλος των NTM ως δυνητικών παθογόνων μικροοργανισμών για τον άνθρωπο.

Στην εν λόγω εργασία καταγράφηκαν τα άτυπα μυκοβακτηρίδια που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από ασθενείς που νοσηλεύθηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας για το χρονικό διάστημα 2003 – 2013, και μελετήθηκαν δείγματα πόσιμου ύδατος από τις περιοχές που ήταν μόνιμες κατοικίες των θετικών σε άτυπα μυκοβακτηρίδια ασθενών, για την περίοδο 2010 - 2013. Επιπρόσθετα, στα δείγματα ύδατος προσδιορίστηκε η φυσικοχημική και η μικροβιολογική ποιότητά τους, σύμφωνα με την ευρωπαϊκή οδηγία 98/83.

Ακολούθως, διερευνήθηκε η συσχέτιση μεταξύ των NTM που απομονώθηκαν από τους ασθενείς και αυτών που βρέθηκαν στα δείγματα πόσιμου ύδατος, ώστε να ελεγχθεί εάν ισχύει η άποψη πως μία πιθανή οδός

μετάδοσης των NTM στο άνθρωπο είναι το πόσιμο νερό. Επιπρόσθετα, διερευνήθηκε η συσχέτιση των PEM που βρέθηκαν στο πόσιμο νερό με τις υπόλοιπες φυσικοχημικές και μικροβιολογικές παραμέτρους ποιότητας, ώστε να ελεγχθεί εάν η ύπαρξη NTM στο πόσιμο νερό συσχετίζεται με κάποιες από αυτές.

9.2 Υλικά & Μέθοδοι

9.2.1 Κλινικά Δείγματα

9.2.1.1 Γενικά Στοιχεία

Η απομόνωση και ταυτοποίηση άτυπων μυκοβακτηριδίων σε ασθενείς του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας (ΠΝΛ), πραγματοποιείται στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του νοσοκομείου.

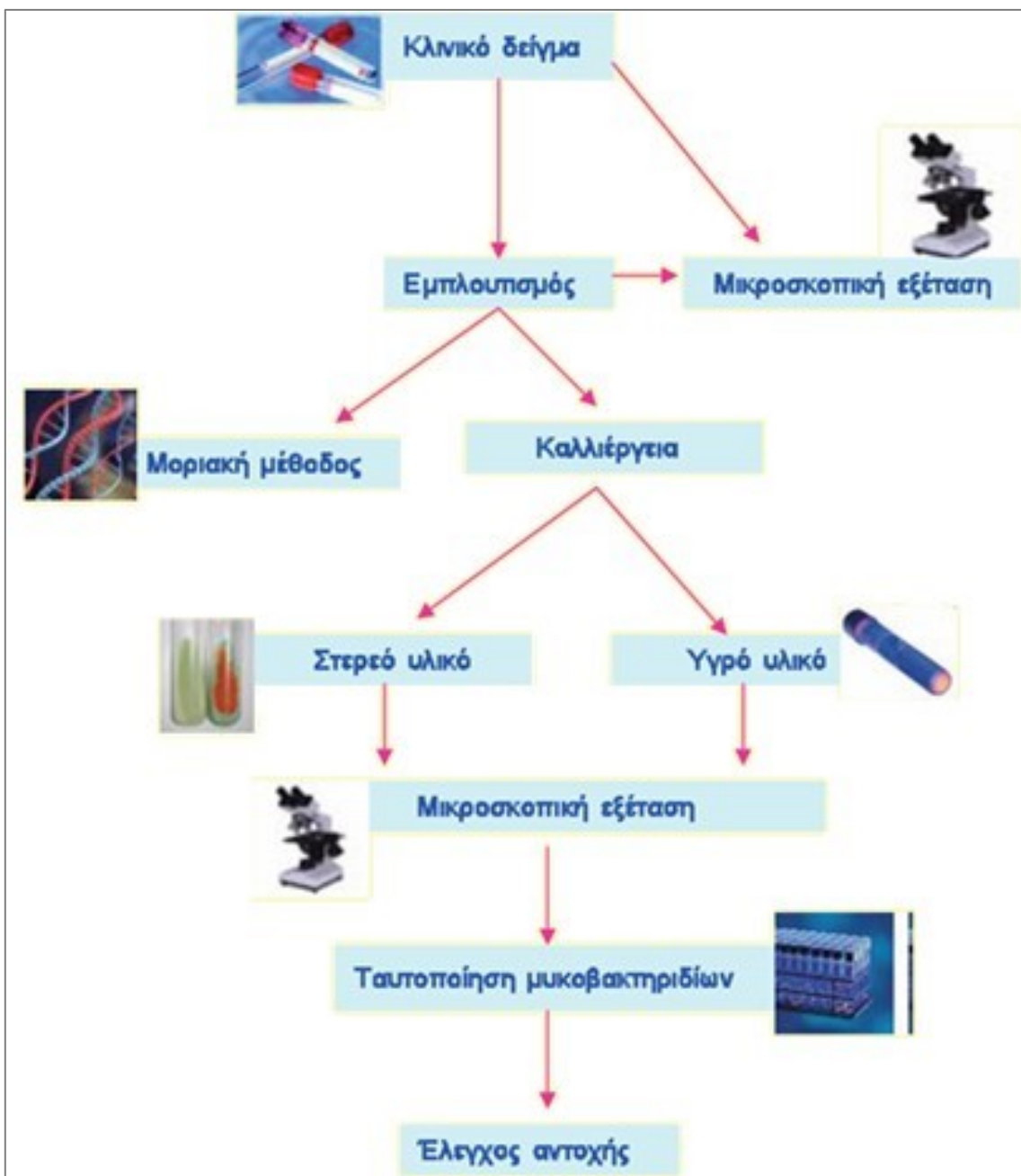
Στην παρούσα μελέτη, κατά την χρονική περίοδο 2003-2013, βρέθηκαν θετικοί σε NTM 365 ασθενείς του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Για την απομόνωση των μυκοβακτηριδίων σε κλινικά δείγματα, όπως αυτή πραγματοποιείται στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του ΠΝΛ, ακολουθείται η διαδικασία που παρουσιάζεται στην εικόνα 9.1. Σύμφωνα με αυτή, στα κλινικά δείγματα πριν αυτά εμβολιαστούν στα θρεπτικά υλικά:

- ✚ Πραγματοποιείται ένα στάδιο εμπλουτισμού τους με σκοπό την καλύτερη δυνατή ανίχνευση των μυκοβακτηριδίων και την αποφυγή επιμολύνσεων.
- ✚ Ακολουθεί έλεγχος με ειδική χρώση για την ύπαρξη ή όχι οξεάντοχων βακτηρίων και καλλιέργεια σε ειδικά θρεπτικά υλικά.
- ✚ Η ταυτοποίηση γίνεται με το πρωτόκολλο LIFESCIENCE (GenoType Mycobacterium CM kit, VER 1.0, Hain Lifescience, Germany).

Η ταυτοποίηση σύμφωνα με το πρωτόκολλο LIFESCIENCE είναι μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει τρία στάδια:

- ✚ Την απομόνωση DNA από τα κύτταρα
- ✚ Την ενίσχυση του γενετικού υλικού με πολλαπλή αντίδραση (multiplex PCR)
- ✚ Τον αντίστροφο υβριδισμό



Εικόνα 9.1. Διαδικασία απομόνωσης και ταυτοποίησης των άτυπων μυκοβακτηριδίων από κλινικά δείγματα ασθενών.

9.2.1.2 Δειγματοληψία

Τα βιολογικά δείγματα που συλλέγονται για απομόνωση NTM συνήθως είναι:

- ✚ Πτύελα, 3 πρωινά δείγματα ή 3 δείγματα που απέχουν μεταξύ τους 8 ώρες
- ✚ Βρογχικά εκπλύματα

- ✚ Δείγματα από ιστούς ή από πληγές
- ✚ Δείγμα εγκεφαλονωτιαίου υγρού ή αποστειρωμένων υγρών του σώματος
- ✚ Δείγμα ούρων, 3-5 δείγματα πρωινών ούρων
- ✚ Δείγμα κοπράνων, μόνο για το *M. avium*
- ✚ Δείγμα γαστρικού υγρού, για παιδιά, το οποίο θα πρέπει να ουδετεροποιηθεί (ουδέτερο pH), ώστε να επιζήσουν τα βακτήρια
- ✚ Δείγμα αίματος, σε περίπτωση γενικευμένης νόσου, για καλλιέργεια

9.2.1.3 Παραλαβή & Επεξεργασία των Δειγμάτων

Η παραλαβή και προετοιμασία των κλινικών δειγμάτων, όπως αυτή γίνεται στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του ΠΝΛ, είναι η εξής:

- ✚ Ετοιμάζεται ένα πλακάκι
- ✚ Ετοιμάζεται ένας ουροσυλλέκτης, ο οποίος περιέχει 40ml φωσφορικά
- ✚ Ετοιμάζεται 1 σωλήνας MGIT
- ✚ Ετοιμάζεται 1 σωλήνας για καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό L-J
- ✚ Ετοιμάζεται 1 FALCON 50ml, το οποίο χρησιμοποιείται για την μεταφορά των υλικών
- ✚ Τέλος, κρατείται 1 μικρό λευκό μπουκαλάκι για φύλαξη

Στα ανωτέρω, αναγράφονται η ημερομηνία, το είδος του δείγματος και ένας κωδικός (για την ταυτοποίηση του δείγματος).

9.2.1.4 Εμπλουτισμός Δειγμάτων

Τα περισσότερα κλινικά δείγματα που αποστέλλονται στο εργαστήριο για καλλιέργεια μυκοβακτηριδίων συνήθως επιμολύνονται από την φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα, επομένως πρέπει να απομακρυνθούν αυτοί οι μικροοργανισμοί ώστε να αναπτυχθούν τα μυκοβακτηρίδια.

Η επιτυχία της καλλιέργειας στηρίζεται στην καταλληλότητα του δείγματος γι' αυτό πριν τον εμβολιασμό των δειγμάτων στα θρεπτικά υλικά πραγματοποιείται ένα στάδιο εμπλουτισμού τους για καλύτερη ανίχνευση και μείωση των επιμολύνσεων.

Η διαδικασία εμπλουτισμού των δειγμάτων είναι η παρακάτω :

1. Μεταφορά 1 σταγόνας του υλικού στα σωληνάκια FALKON, με πουάρ για τα υγρά ή κρίκου για τα βλεννώδη
2. Όταν το δείγμα έχει όγκο μεγαλύτερο των 10ml τότε φυγοκεντρείται, απορρίπτεται το υπερκείμενο και τοποθετείται μια σταγόνα από το εναπομείναν υλικό στο πλακάκι. Εάν το δείγμα έχει όγκο μικρότερο από 5ml, τότε προστίθεται νερό κατάλληλης ποιότητας (π.χ. Water HPLC grade), μέχρις όγκου 5ml.
3. Προσθήκη στο δείγμα μιας αμπούλας κυστεΐνης στο φιαλίδιο με 2% NaOH για διάλυση και απολύμανση των κοινών μικροβίων που τυχόν υπάρχουν στα δείγματα (decontamination). Αρχικά, αφαιρείται από την αμπούλα ο αέρας και ακολούθως προσθέτουμε 20-25 ml από αυτή σε κάθε δείγμα. Πραγματοποιείται επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με περιοδική απαλή ανάδευση.
4. Προσθέτουμε στο δείγμα στείρο ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα μέχρις όγκου 50ml και ακολουθεί φυγοκέντρισή του (15 λεπτά στις 4200 rpm, στους 20°C).
5. Απορρίπτεται το υπερκείμενο με προσοχή.
6. Ανακατεύουμε το εναπομείναν δείγμα με το πουάρ και βάζουμε δεύτερη σταγόνα στο πλακάκι.
7. Στο δείγμα προσθέτουμε 2ml πενικιλίνη με στείρα πιπέτα για επαναδιάλυση του ιζήματος.

Από αυτό το δείγμα γίνονται τα παρασκευάσματα, ο εμβολιασμός, τα υλικά για καλλιέργεια και η PCR .

Το βήμα 3 της ανωτέρω διαδικασίας είναι καθοριστικό για την επιτυχή απομόνωση των NTM. Εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι τα NTM είναι ανθεκτικότερα στα όξινα ή βασικά διαλύματα σε σχέση με τα υπόλοιπα βακτήρια που τυχόν υπάρχουν στο δείγμα. Με αυτό τον τρόπο εξοντώνονται τα ανταγωνιστικά προς τα NTM βακτήρια, ώστε να μην παραχθούν ψευδώς θετικά

αποτελέσματα με τις καλλιέργειες. Για το λόγω αυτό επεξεργάζεται το δείγμα πτυέλων με αλκαλικά / όξινα διαλύματα και βλεννολυτικά αντιδραστήρια, όπως το διάλυμα 4% NaOH και η L-acetyl-L-cysteine.

Για την απολύμανση και χώνευση των βιολογικών δειγμάτων συνηθέστερα χρησιμοποιούνται:

- ✚ Διάλυμα 4% NaOH για την απολύμανση
- ✚ Διάλυμα L-acetyl-L-cysteine για τη ρευστοποίηση του δείγματος

Ο χρόνος παραμονής του δείγματος είναι 15 λεπτά περίπου.

Σε ειδικές περιπτώσεις, κυρίως σε δείγματα πτυέλων από ασθενείς με κυστική ίνωση, χρησιμοποιείται οξαλικό οξύ.

Σημειώνεται ότι τα ανωτέρω διαλύματα εξοντώνουν και NTM, συνεπώς θα πρέπει να αποφεύγεται η παραμονή του δείγματος σε αυτά πέραν των 15 λεπτών.

9.2.2 Καλλιέργεια των Δειγμάτων

Οι καλλιέργειες των δειγμάτων πραγματοποιούνται σύμφωνα με τις παρακάτω μεθόδους:

9.2.2.1 Καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υλικό Lowenstein - Jensen

Ο εμβολιασμός, ο οποίος έπεται του εμπλουτισμού των δειγμάτων, γίνεται σε σωληνάρια του στερεού θρεπτικού υλικού για άτυπα μυκοβακτηρίδια Lowenstein - Jensen (L-J BioMerieux, SA Lyon, France), το οποίο έχει ως βάση το αυγό (εικόνα 9.2), ως εξής:

- ✚ Υπό άσηπτες συνθήκες προστίθενται 5 σταγόνες δείγματος στα σωληνάρια με το L-J.
- ✚ Τα σωληνάρια τοποθετούνται σε λοξή θέση για την καλύτερη κατανομή του δείγματος με χαλαρωμένο το πώμα για μια εβδομάδα και μετά κλείνουν για την αποφυγή ξήρανσης του υλικού.



Εικόνα 9.2. Θρεπτικό υλικό Lowenstein – Jensen (πράσινο λόγω της παρουσίας της ουσίας πράσινο του μαλαχίτη).

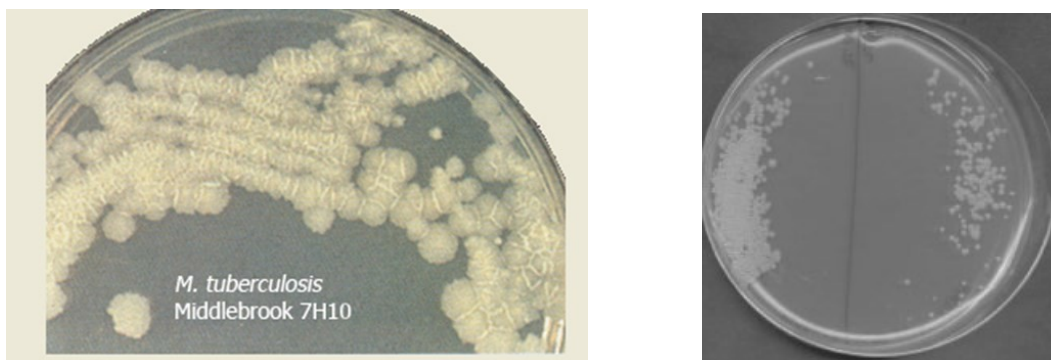
Ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροβίων είναι αργός και οι αποικίες που σχηματίζονται είναι ξηρές, κηρώδης και έχουν χρώμα λευκοκίτρινο.

Η επώαση γίνεται στους 37°C και σε ατμόσφαιρα CO₂ 5% έως 10%. Το CO₂ δεν κρίνεται απαραίτητο αλλά χρησιμοποιείται γιατί βοηθά στην ταχύτερη ανάπτυξη των μυκοβακτηριδίων.

Ο έλεγχος για την ανάπτυξη των αποικιών γίνεται κάθε εβδομάδα για χρονικό διάστημα περίπου 2 μηνών.

9.2.2.2 Καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό Middlebrook

Ο εμβολιασμός, ο οποίος έπεται του εμπλουτισμού των δειγμάτων, γίνεται σε σωληνάρια του υγρού θρεπτικού υλικού για άτυπα μυκοβακτηρίδια Middlebrook, με βάση την αгарόζη, στο οποίο προστίθενται χημικά θρεπτικά υλικά για βελτίωση της ανάπτυξης των NTM (εικόνα 9.3).



Εικόνα 9.3. Δεξιά: Αποικίες *M. tuberculosis* και αριστερά: Αποικίες *M. smegmatis*, σε θρεπτικό υλικό Middlebrook 7H10.

9.2.2.3 Καλλιέργεια σε σωληνάρια με το MGIT

Είναι μία πατενταρισμένη μέθοδος (που χρησιμοποιείται και για τη διάγνωση της φυματίωσης), κατά την οποία προστίθεται διάλυμα 800μl Supplement (MGIT OADC) για την ενεργοποίηση και των εμπλουτισμό των σωλήνων και στη συνέχεια προστίθενται 10 σταγόνες από το κάθε δείγμα στα σωληνάρια (εικόνα 9.4).



Εικόνα 9.4. Αντιδραστήρια της μεθόδου BD MGIT OADC.

Ακολουθεί η επώαση των δειγμάτων (στους 37°C για 6 εβδομάδες), π.χ. στο BACTEC MGIT 960 system. Βάσει αυτής της μεθόδου, τα NTM αναπτύσσονται σε σωληνάκια που περιέχουν κατάλληλο θρεπτικό υλικό (π.χ. Middlebrook), με αποτέλεσμα να παράγεται διοξείδιο του άνθρακα και να μειώνεται το διαθέσιμο οξυγόνο. Η ελάττωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου στο σωληνάκι έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ανιχνευτή φθορισμού. Ακολούθως, ελέγχονται τα δείγματα με λάμπες UV (εικόνα 9.5).



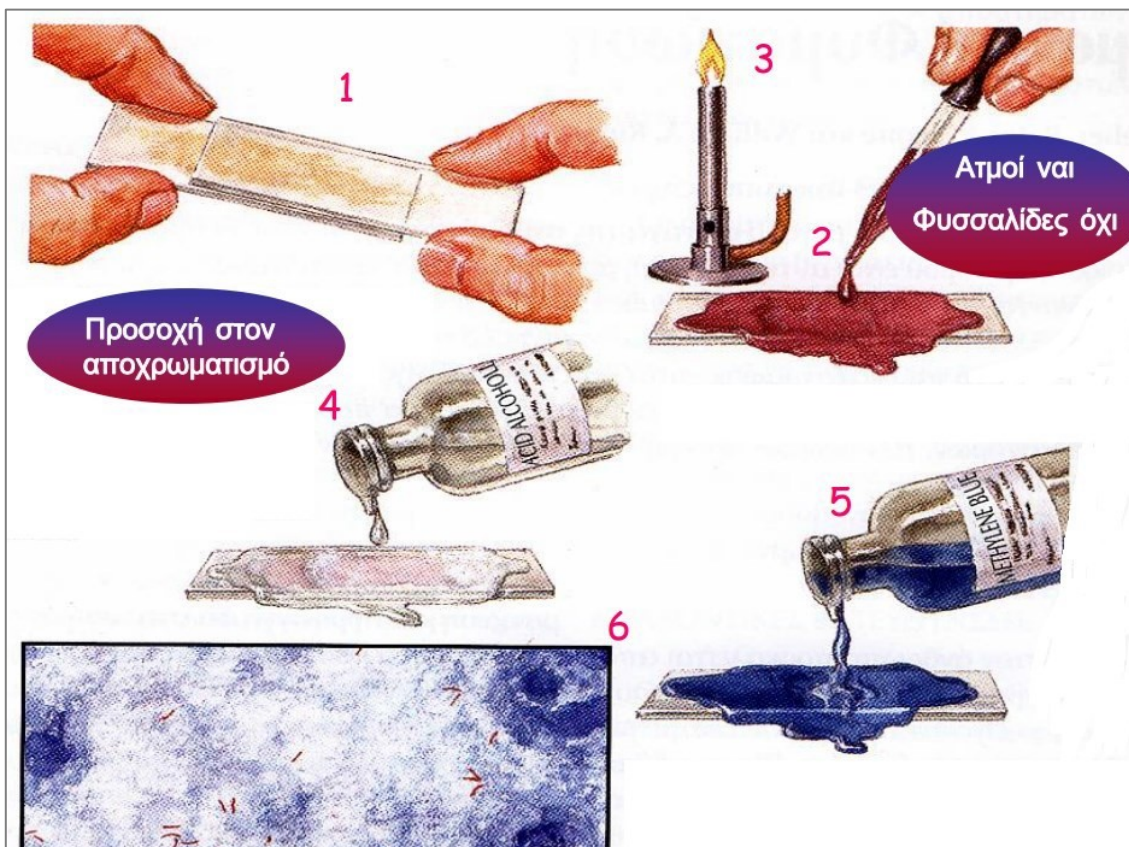
Εικόνα 9.5. Έλεγχος των σωληναρίων μετά την ολοκλήρωση της μεθόδου MGIT. Τα θετικά σε NTM σωληνάκια φθορίζουν στο UV.

(Πηγή: <http://patentsforhumanity.devpost.com/submissions/11132-becton-dickinson-bd-mgit-technology> & <http://www.bd.com/ds/productCenter/245113.asp>).

Τέλος, αποθηκεύεται ποσότητα 1-1.5 ml από το δείγμα στο άσπρο μπουκαλάκι και μπαίνει μέσα στον καταψύκτη για φύλαξη.

9.3 Οξεάντοχη χρώση Ziehl - Nielsen

Πριν από την καλλιέργεια των δειγμάτων πραγματοποιείται ειδική οξεάντοχη χρώση (Ziehl-Nielsen), όπως φαίνεται στην εικόνα 9.6.



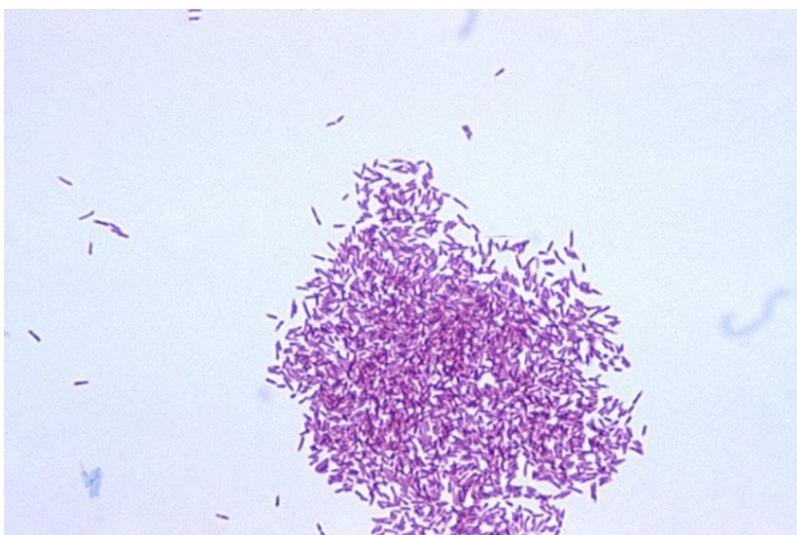
Εικόνα 9.6. Οξεάντοχη χρώση (Ziehl-Nielsen).

Η χρωστική η οποία χρησιμοποιείται είναι η φαινικούχος φουξίνη για 5 λεπτά. Τα δείγματα θερμαίνονται και μόλις αρχίσουν να αχνίζουν αρχίζει να μετράει ο χρόνος. Στη συνέχεια ξεπλένονται με νερό και στραγγίζονται, προστίθεται οξυνισμένο οινόπνευμα για 5 λεπτά. Κατά την διάρκεια του χρόνου τα πλακάκια ξεπλένονται με το οινόπνευμα, σπρώχνοντας να φύγει η χρώση. Ακολουθεί ξέπλυμα με νερό. Ακολούθως προστίθεται κυανούν του μεθυλενίου για 2 λεπτά.

Η οξεάντοχη χρώση Ziehl-Nielsen γίνεται και μετά την επώαση σε κάθε θετική καλλιέργεια ώστε να επιβεβαιωθεί αν πρόκειται για οξεάντοχο βακτήριο. Τα οξεάντοχα βακτήρια βάφονται λόγω της φουξίνης έντονα ερυθρά (εικόνα 9.7).

Η διαδικασία είναι η εξής:

- ✚ Στρώνεται ένα πλακάκι από το ίζημα και βάφεται.
- ✚ Για τα στελέχη που βρέθηκαν άτυπα - οξεάντοχα γίνεται ανακαλλιέργεια σε 2 σωλήνες MGIT και 1 σε Lowenstein-Jensen.
- ✚ Στη συνέχεια τα δείγματα αναλύονται για ταυτοποίηση.



Σχήμα 9.7. Χρώση Ziehl-Nielsen του *M. gordonae*.

(Πηγή: <http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/photo2detail.php?id=187>).

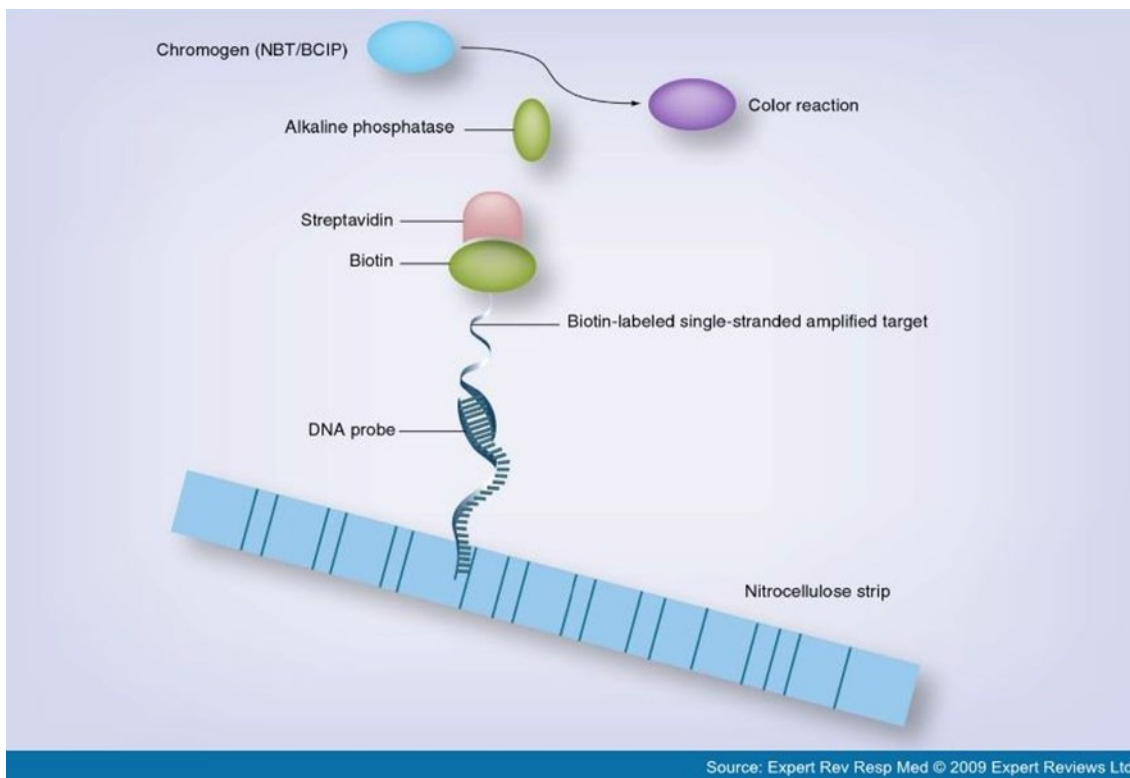
9.4 Ταυτοποίηση Άτυπων Μυκοβακτηριδίων

Η ταυτοποίηση των άτυπων μυκοβακτηριδίων γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας HAIN LIFESCIENCE GenoType Mycobacterium CM (VER 1.0, Hain Lifescience, Germany).

9.4.1 Μέθοδος GenoType Mycobacterium CM / AS της εταιρείας HAIN LIFESCIENCE

Η μέθοδος διακρίνει τα παθογόνα μυκοβακτηρίδια της φυματίωσης και τα NTM. Βοηθά στη διάγνωση ασθενών με θετική καλλιέργεια μυκοβακτηριδίων. Εάν υπάρχει η υποψία ότι ο ασθενής πάσχει από φυματίωση ή από λοιμώξεις λόγω NTM, ο προσδιορισμός των συγκεκριμένων ειδών θα βοηθήσει τον θεράποντα ιατρό για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας.

Η μέθοδος διατίθεται σε δύο επιλογές (GenoType Mycobacterium CM / AS), ως δύο συστήματα δοκιμών που πωλούνται ξεχωριστά. Και οι δύο επιλογές έχουν την ίδια πρώτη ύλη (στερεά ή υγρή καλλιέργεια) και ο υβριδισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί με το ίδιο προϊόν PCR (εικόνα 9.8).

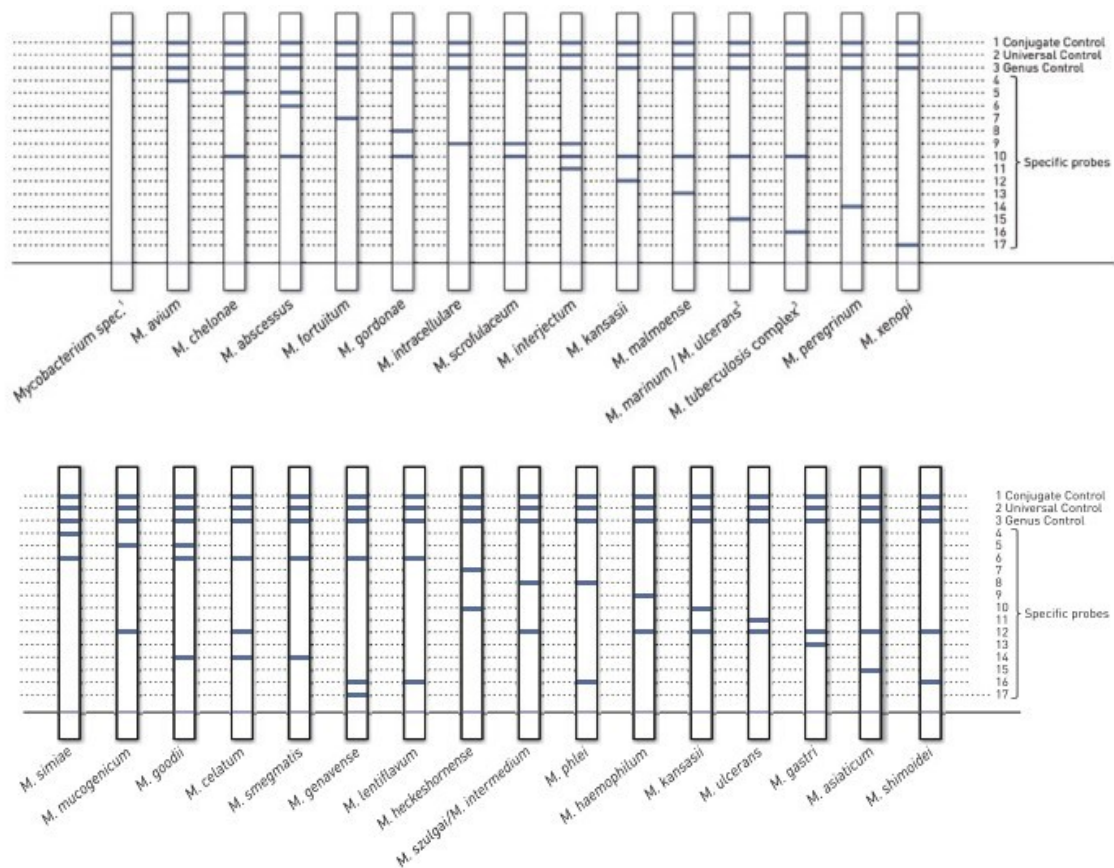


Εικόνα 9.8. Αρχή της μεθόδου GenoType Mycobacterium CM της εταιρείας Hain Lifescience, Germany.

Η επιλογή της μεθόδου GenoType Mycobacterium CM επιτρέπει την ταυτόχρονη μοριακή γενετική ταυτοποίηση των εξής μυκοβακτηριδίων:

- ✚ Το σύμπλεγμα του *M. tuberculosis*
- ✚ 24 από τα πιο κοινά είδη NTM

ενώ η επιλογή της μεθόδου GenoType Mycobacterium AS επιτρέπει την ταυτόχρονη μοριακή γενετική ταυτοποίηση επιπλέον 19 ειδών NTM (εικόνα 9.9).

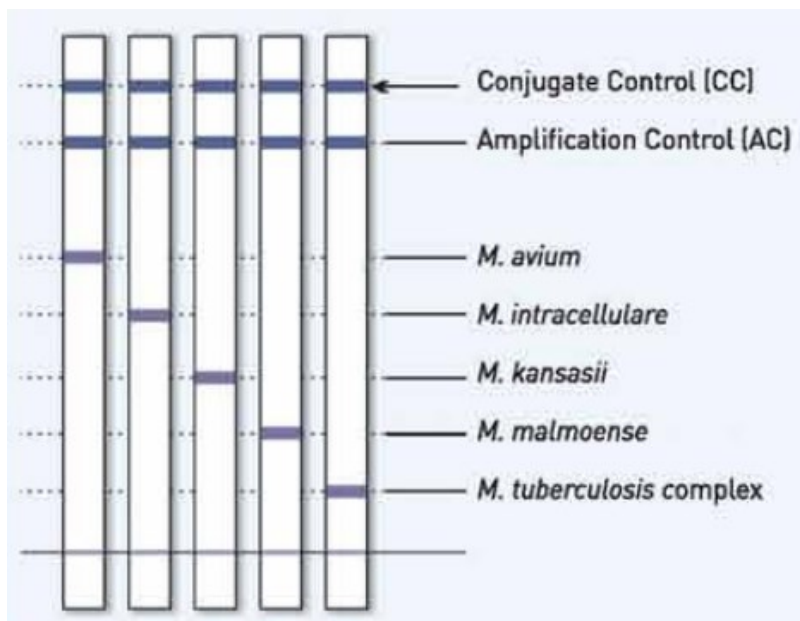


Εικόνα 9.9. Είδη NTM που ταυτοποιούνται με τη μέθοδο GenoType Mycobacterium CM / AS.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου GenoType Mycobacterium CM / AS συνοψίζονται στα παρακάτω:

- ✚ Μπορεί να εκτελεστεί από τα δείγματα NTM σε στερεό ή υγρό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.
- ✚ Με μία αντίδραση PCR και ακολούθως με δύο υβριδισμούς, είναι δυνατή η ανίχνευση και η διαφοροποίηση των *M. tuberculosis complex* και 40 άλλων διαφορετικών ειδών NTM.
- ✚ Επιτρέπει την ανίχνευση ακόμα και από ασθενείς θετικές καλλιέργειες, καθώς και από μεικτές καλλιέργειες ταχείας και βραδείας ανάπτυξης NTM.
- ✚ Τα αποτελέσματα εμφανίζονται εντός 5 ωρών, χρονικό διάστημα σημαντικά μικρότερο όταν συγκρίνεται με τις αρκετές εβδομάδες που απαιτούνται με τις συμβατικές μεθόδους.

Επιπρόσθετα, υπάρχει και μία γρήγορη, άμεση μοριακή μέθοδος που επιτρέπει την ταυτοποίηση 5 ειδών NTM (εικόνα 9.10).



Εικόνα 9.10. Είδη NTM που ταυτοποιούνται με τη μέθοδο Genotype mycobacteria Direct.

9.4.1.1 Στάδια της μεθόδου

Είναι μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει τρία στάδια, την απομόνωση DNA από τα κύτταρα, την ενίσχυση του γενετικού υλικού με πολλαπλή αντίδραση (multiplex PCR) και τον αντίστροφο υβριδισμό. Η παραπάνω μέθοδος είναι μια μοριακή μέθοδος ανιχνευτών (probes) γραμμικής διάταξης βασισμένη στην αρχή του ανάστροφου υβριδισμού μετά από πολλαπλασιασμό (PCR) από υγρή ή στερεή καλλιέργεια.

Η GenoType Mycobacteria δοκιμασία επιτρέπει την ταυτοποίηση διαφορετικών άτυπων μυκοβακτηριδίων. Το απομονωμένο DNA από το υλικό της καλλιέργειας ενισχύεται με PCR εκκινητές και τα ενισχυμένα τμήματα του DNA ακολούθως χρησιμοποιούνται για την δοκιμασία του ανάστροφου υβριδισμού. Η μέθοδος του αντίστροφου υβριδισμού αρχίζει με την αποδιάταξη του προϊόντος της PCR. Έπειτα προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού (Hybridization Buffer) και μια ταινία επικαλυμμένη με δύο γραμμές ελέγχου και έναν αριθμό ανιχνευτών ειδικών των διαφόρων ειδών μυκοβακτηριδίων.

Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του γενετικού υλικού των μυκοβακτηριδίων λαμβάνεται μια μικρή ποσότητα αποικιών από το στερεό υλικό Lowenstein-Jensen η οποία διαλύεται σε 300-500 μl αποστειρωμένο νερό. Από την υγρή καλλιέργεια MGT λαμβάνεται απευθείας ποσότητα 300-500μl, η οποία τοποθετείται σε σωληνάρια Eppendorf. Έπεται βρασμός των δειγμάτων για 1 ώρα στους 95⁰C και επώαση για 15 λεπτά, ενώ στο τέλος τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 5 λεπτά στις 1300rpm και απομακρύνεται το υπερκείμενο.

Πολλαπλασιασμός του DNA

Για κάθε αντίδραση προετοιμάζεται 45μl του διαλύματος του PCR, η σύνθεση του οποίου αποτελείται από :

- ✚ 35 μl PNM (primer nucleotide mix)
- ✚ 5 μl buffer (polymerase incubation buffer)
- ✚ 3 μl MgCl₂
- ✚ 0.4 μl Tag polymerase
- ✚ 1.6 μl νερό.

Ο κάθε σωλήνας αντίδρασης της PCR περιέχει συνολικά 45 μl μίγματος και 5 μl από το δείγμα. Ακολουθεί η ρύθμιση του κυκλοποιητή.

Υβριδισμός

Ο αντίστροφος υβριδισμός είναι μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- ✚ Χημική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- ✚ Υβριδισμό της μονόκλωνης αλυσίδας
- ✚ Σύνδεση με ειδικούς ανιχνευτές DNA σε ειδικές ταινίες
- ✚ Αντίδραση φθορισμού η οποία βασίζεται στην αλκαλική φωσφατάση

Αναλυτικά η παραπάνω διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Προθέρμανση στους 37⁰C των αντιδραστηρίων HYB (Hybridization buffer) και STR (Stringent Wash Solution).

2. Προετοιμασία ανακινούμενου υδατόλουτρο στους 45°C .
3. Τοποθέτηση σε ειδικά αυλάκια 20 μl από το προϊόν της PCR
4. Τοποθέτηση 20μl από το υγρό μετουσίωσης DEN (Denaturation Solution) σε κάθε αυλάκι και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
5. Τοποθέτηση μιας ειδικής ταινίας (trip) σε κάθε αυλάκι
6. Προσθήκη 1ml διαλύματος HYB (Hybridization Buffer) και επώαση για 30 λεπτά στους 45°C σε ανακινούμενο υδατόλουτρο.
7. Μετά την επώαση αφαιρούνται τα αντιδραστήρια και προστίθεται στις ταινίες 1ml διάλυμα STR (Stringent solution) και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά στους 45°C .
8. Ξέπλυμα των ταινιών με διάλυμα RIN για 1 λεπτό.
9. Προσθήκη 1ml διαλύματος CON (Conjugate Buffer) και επώαση για 30 λεπτά στους 20-25°C.
10. Ξέπλυμα με 1ml RIN και 1ml αποσταγμένο νερό.
11. Προσθήκη σε κάθε αυλάκι 1ml διαλύματος SUB (Substrate Buffer) και επώαση στο σκοτάδι ,σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς ανακίνηση.
12. Προσθήκη αποσταγμένου νερού για διακοπή της αντίδρασης.
13. Αφαίρεση των ταινιών και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Αξιολόγηση

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και ταυτοποίηση των NTM.

9.5 Δείγματα Πόσιμου Ύδατος

Στα δείγματα νερού πραγματοποιήθηκε απομόνωση άτυπων μυκοβακτηριδίων με μέθοδο παρόμοια με αυτή που χρησιμοποιείται για την απομόνωσή τους από κλινικά δείγματα, καθώς και με χρήση σωλήνων MGIT της εταιρείας Becton-Dickinson.

Για τη συλλογή και ανάλυση των δειγμάτων πόσιμου ύδατος ακολουθήθηκαν τα παρακάτω στάδια:

9.5.1 Δειγματοληψία

Τα δείγματα πόσιμου ύδατος που μελετήθηκαν προέρχονται από τις περιοχές μόνιμης κατοικίας των ασθενών που νοσηλεύτηκαν στο ΠΝΛ και βρέθηκαν θετικοί σε άτυπα μυκοβακτηρίδια.

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε από:

- ✚ Κεντρικές δεξαμενές ύδατος
- ✚ Το δίκτυο ύδρευσης
- ✚ Το δίκτυο ύδρευσης σε νοσοκομεία, σχολεία και άλλους κρατικούς φορείς από την περιοχή της Θεσσαλίας.

Από κάθε σημείο δειγματοληψίας συλλέγονταν δύο δείγματα για προσδιορισμό των φυσικοχημικών παραμέτρων ποιότητας και δύο δείγματα για τον προσδιορισμό των μικροβιολογικών παραμέτρων του πόσιμου ύδατος, σύμφωνα με την ευρωπαϊκή οδηγία 98/83, η οποία έχει ενσωματωθεί στην εθνική νομοθεσία.

Η διαδικασία της δειγματοληψίας ήταν σύμφωνη με τα διεθνή πρότυπα (σήμανση των δειγμάτων, αποστείρωση της βρύσης, κα.). Για τη συλλογή των δειγμάτων για τις φυσικοχημικές παραμέτρους χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες φιάλες πολυαιθυλενίου, ενώ για τις μικροβιολογικές παραμέτρους σκουρόχρωμες γυάλινες αποστειρωμένες φιάλες, στις οποίες είχε προστεθεί $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (αναγωγική ουσία), λόγω της παρουσίας χλωρίου. Τα δείγματα τοποθετούνταν αμέσως σε ειδικά φορητά ψυγεία και μεταφέρονταν άμεσα στο εργαστήριο, όπου και αναλύονταν αμέσως (εντός 24 ωρών).

Για τη λήψη νερού από βρύσες του δικτύου ύδρευσης χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένες γυάλινες φιάλες όγκου 1L με εσφυρισμένο πώμα. Προκειμένου να εξουδετερωθούν οι απολυμαντικές ουσίες του νερού (π.χ. χλώριο), είχε προστεθεί στις φιάλες δειγματοληψίας του 1L, πριν την αποστείρωσή τους, 1 ml διαλύματος θειοθειικού νατρίου 10% w/v (Διάλυμα $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10% w/v), το οποίο δεν καταστρέφεται με την αποστείρωση.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την λήψη των δειγμάτων περιλάμβανε τα παρακάτω στάδια:

- ✚ Απομάκρυνση από την βρύση οποιωνδήποτε προσαρτημένων συσκευών (π.χ. φίλτρα, γάζες),
- ✚ Κάψιμο του ρύγχους της βρύσης με φλόγιστρο,
- ✚ Άνοιγμα της βρύσης με έντονη ροή για 2 λεπτά, μείωση της ροής, συλλογή του νερού, πωματισμός της φιάλης και κάλυψη του πώματος με αλουμινόχαρτο.

Στο πεδίο (επί τόπου) μετρήθηκαν οι παρακάτω παράμετροι:

- ✚ Θερμοκρασία των δειγμάτων
- ✚ pH
- ✚ Υπολειμματικού χλωρίου

Στη συνέχεια οι φιάλες τοποθετούνταν σε ισόθερμο δοχείο με παγοκύστες ή σε φορητό ψυγείο (4-8°C), και μεταφέρονται σε ψυγείο στο εργαστήριο. Ο χρόνος που μεσολαβούσε μεταξύ της δειγματοληψίας και της εργαστηριακής ανάλυσης ήταν όσο το δυνατό μικρότερος (6-24 ώρες).

9.5.2 Καλλιέργεια NTM - Μέθοδος Διήθησης Μέσω Μεμβράνης

Περιλαμβάνει τα στάδια:

- ✚ **Μείωση της μη-μυκοβακτηριδιακής χλωρίδας**
- ✚ **Συμπύκνωση**
- ✚ **Καλλιέργεια σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο**

Μείωση της μη-μυκοβακτηριδιακής μικροβιακής χλωρίδας

Σε 500 ml δείγματος νερού προστίθεται η απολυμαντική ουσία CPC (Cetylpyridinium chloride) μέχρι να γίνει η συγκέντρωσή του 0.005%, ανάδευση για 30sec, παραμονή για 30min και άμεση διήθηση (βλ. στάδιο 1ο παρακάτω).

Συμπύκνωση - Μέθοδος Διήθησης μέσω Μεμβράνης (Τεχνική MF: membrane filtration)

- 1ο. Τα ανωτέρω δείγματα νερού όγκου 500 ml, μετά τα 30 min, διηθούνται αμέσως από ειδικά αποστειρωμένα φίλτρα (π.χ. Millipore S.A.S 67120), με διάμετρο πόρων 0.45 μm.

- 2ο. Μετά τη διήθηση των δειγμάτων ακολουθεί έκπλυση με 300ml αποσταγμένο νερό προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσια του CPC και να ξεπλυθούν τα φίλτρα.
- 3ο. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες μεταφέρονται με αποστειρωμένη λαβίδα σε αποστειρωμένα πλαστικά φυγοκεντρικά σωληνάρια FALCON που περιέχουν 15 ml αποσταγμένο νερό.
- 4ο. Ακολουθεί έντονη ανάδευση σε vortex για λίγα λεπτά προκειμένου να αποκολληθούν τα μικρόβια από τις μεμβράνες μέσα στο υδατικό διάλυμα. Τελικά, μετά την ανάδευση οι μεμβράνες απομακρύνονται από τα σωληνάρια και ακολουθεί οι επεξεργασίες των διαλυμάτων που περιέχουν το μικροβιακό φορτίο.

Καλλιέργεια σε υλικό Middlebrook 7H10 OADC agar

Μετά τον εμπλουτισμό των δειγμάτων ακολουθεί ο εμβολιασμός τους σε σωληνάρια στερεού θρεπτικού υλικού Middlebrook 7H10 OADC agar.

- 5ο. Υπό άσηπτες συνθήκες προστίθενται με στείρα πιπέτα 5 σταγόνες από κάθε δείγμα (στάδιο 4) σε σωληνάρια Middlebrook 7H10 OADC agar.
- 6ο. Οι σωλήνες, αφού πρώτα καθαριστούν με ειδικό απολυμαντικό (STERANIOS 2% ECS), επωάζονται στους 30°C και στους 37°C σε επίπεδη θέση τουλάχιστον για μια εβδομάδα ώστε να γίνει καλή κατανομή του δείγματος. Στο χρονικό αυτό διάστημα τα καπάκια των σωλήνων παρέμεναν χαλαρωμένα ούτως ώστε να διεισδύσει το CO₂ ενώ στη συνέχεια βιδώθηκαν σφιχτά ώστε να αποφευχθεί η ξήρανση του υλικού. Η επώαση έγινε σε επωαστικό κλίβανο και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ και 92% αέρα.
- 7ο. Οι σωλήνες ελέγχονταν κάθε 7 μέρες για διάστημα 3 μηνών ώστε να διαπιστωθεί η ανάπτυξη των μυκοβακτηριδίων.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Στην αρχή της επώασης θα πρέπει ο πωματισμός των σωλήνων να είναι λίγο χαλαρός ώστε να απομακρυνθούν τα σχηματιζόμενα αέρια και στη συνέχεια να γίνει σφιχτός ώστε να μην εξατμιστεί το υλικό.

Η σύσταση ανά λίτρο του υλικού Middlebrook 7H10 agar (Difco) είναι η ακόλουθη:

- + Θειικό αμμώνιο, 0.5 gr
- + Δισόξινο φωσφορικό κάλιο, 1.5 gr
- + Όξινο φωσφορικό νάτριο, 1.5 gr
- + Κιτρικό νάτριο, 0.4 gr
- + Θειικό μαγνήσιο, 0.025 gr
- + Χλωριούχο ασβέστιο, 0.0005 gr
- + Θειικός ψευδάργυρος, 0.001 gr
- + Θειικός χαλκός, 0.001 gr
- + Μετανατρίου άλας του L-γλουταμινικού οξέος, 0.04 gr
- + Κιτρικό αμμώνιο τρισθενούς σιδήρου, 0.04 gr
- + Υδροχλωρική πυριδοξίνη, 0.001 gr
- + Βιοτίνη, 0.0005 gr
- + Πράσινο του Μαλαχίτη, 0.00025 gr
- + Αγαρόζη, 15 gr

Η παρασκευή του υλικού γίνεται ως εξής:

- + Διαλύονται 19 gr του υλικού σε 900 gr αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό, με βρασμό.
- + Στη συνέχεια πραγματοποιείται αποστείρωση για 10 λεπτά στους 121⁰C.
- + Το μείγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία 50-55 °C.
- + Τέλος, προστίθενται 100ml υλικού Middlebrook OADC (Oleic Acid – Albumin – Dextrose – Catalase)

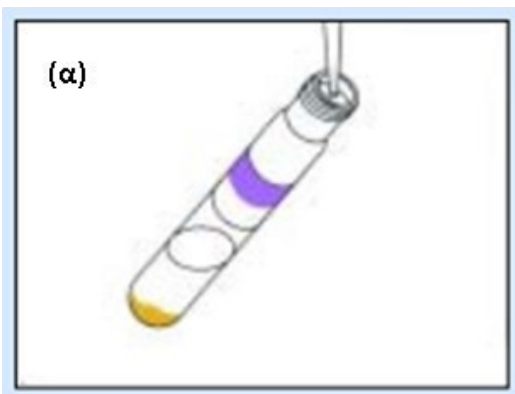
Το υλικό που προκύπτει διαμοιράζεται σε τρυβλία petri.

9.5.3 Καλλιέργεια NTM - Μέθοδος MGIT OADC - Επώαση των δειγμάτων σε σωλήνες MGIT (MYCOBACTERIA GROWTH INDICATOR TUBE)

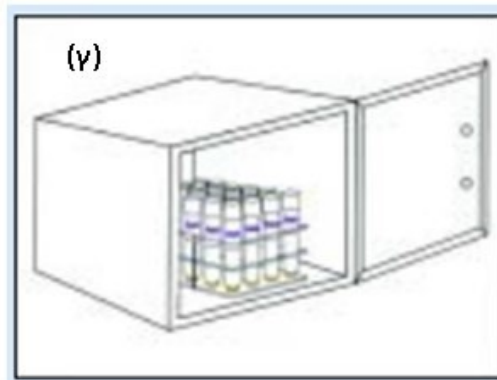
Πρόκειται για μια μη- ραδιομετρική μέθοδο ανίχνευσης μυκοβακτηριδίων. Οι σωλήνες αυτοί περιέχουν 7ml τροποποιημένου υγρού καλλιέργειας Middlebrook 7H9 με γλυκερίνη και στον πυθμένα τους σιλικόνη διαποτισμένη με ένα σύμπλοκο του ρουθηνίου, το οποίο είναι ευαίσθητο στην παρουσία του οξυγόνου που υπάρχει στο υλικό της καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, το οξυγόνο εμποδίζει την εκπομπή φθορισμού από το σύμπλοκο αυτό όταν ο σωλήνας ακτινοβοληθεί με υπεριώδη ακτινοβολία (365 nm), ενώ η κατανάλωση του οδηγεί σε αύξηση του φθορισμού. Έτσι, καθώς τα ενεργά αναπτυσσόμενα μυκοβακτηρίδια καταναλώνουν το διαλυμένο οξυγόνο, ο ευαίσθητος αισθητήρας φθορισμού ανιχνεύει το σήμα υποδεικνύοντας την ανάπτυξη τους (εικόνα 9.11).

1^ο Στάδιο - Διαδικασία εμπλουτισμού των δειγμάτων

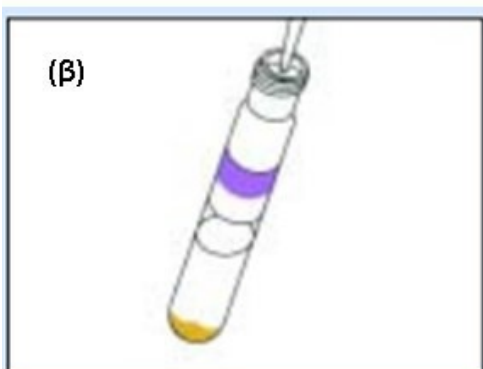
- ✚ Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 15 λεπτά, στις 4200 στροφές, στους 20°C.
- ✚ Από τον αρχικό όγκο των 15 ml αφαιρούνται τα 5 ml και προστίθενται 10 ml διαλύματος κυστεΐνης / NaOH [BBL™ MycoPrep™ Reagent, Becton, Dickinson and Company, USA.]
- ✚ Τα δείγματα αφήνονται να επωαστούν υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) για 15 λεπτά. Αύξηση του χρόνου επώασης οδηγεί σε μείωση της παραλαβής των μυκοβακτηριδίων.
- ✚ Στη συνέχεια, μετά το πέρας των 15 λεπτών συμπληρώνουμε έως τα 50 ml με στείρο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6.8.
- ✚ Ακολουθεί φυγοκέντριση των δειγμάτων για 15λεπτά, στις 4200 στροφές, στους 20°C και προσεκτική απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- ✚ Στη συνέχεια, προστίθενται σε κάθε δείγμα 2 ml διαλύματος θειικού οξέος πενικιλίνης και πραγματοποιείται επαναδιάλυση του ιζήματος με στείρα πιπέτα.



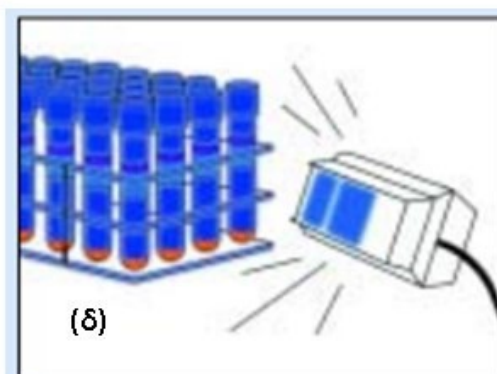
(α)
Προσθήκη BD MGIT OADC και
BD MGIT PANTA



(γ)
Επώαση στους 37°C



(β)
Προσθήκη του κατεργασμένου δείγματος



(δ)
Καθημερινός έλεγχος με λάμπα UV

Εικόνα 9.11. Στάδια της μεθόδου MGIT.

Όλοι οι χειρισμοί των δειγμάτων έγιναν μέσα σε εστία κάθετης νηματικής ροής, λαμβάνοντας υπόψη όλα τα προβλεπόμενα μέτρα ασφαλείας.

2^ο Στάδιο - Καλλιέργεια σε σωληνάρια MGIT

Πριν χρησιμοποιηθούν τα φιαλίδια MGIT (BD BBL™ MGIT™ mycobacteria growth indicator tubes, Becton, Dickinson and Company, USA), προστίθενται κάθε φορά σε κάθε έναν από αυτούς 0.8 ml διαλύματος MGIT OADC (Antibiotic mixture and growth supplement, BD BACTEC™ MGIT™ 960).

Το διάλυμα αυτό που χρησιμοποιείται για την ενεργοποίηση και τον εμπλουτισμό των σωληνών MGIT περιέχει 15ml υλικό εμπλουτισμού Middlebrook με ολεϊκό οξύ, αλβουμίνη, δεξτρόζη και καταλάση και διατηρείται στο σκοτάδι στους 2-8°C.

Υπό άσηπτες συνθήκες προστίθενται με αποστειρωμένη πιπέτα 10 σταγόνες από κάθε δείγμα σε έναν σωλήνα MGIT και αφού καθαριστούν με ειδικό απολυμαντικό επωάζονται στο BACTEC MGIT 960 system έως ότου να ανιχνευθεί θετική καλλιέργεια.

3^ο Στάδιο – Ανάγνωση του αποτελέσματος

Ελέγχεται, με λάμπα UV, ποια σωληνάρια φθορίζουν, οπότε αυτά θεωρούνται θετικά σε NTM.

9.5.4 Βιοχημικά Τεστ για την Ταυτοποίηση των NTM

Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες βιοχημικές δοκιμασίες ([Jenkins et al. 1992](#)) είναι οι ακόλουθες:

- ✚ Της Αναγωγής των νιτρικών
- ✚ Της Υδρόλυσης του TWEEN 80
- ✚ Της καταλάσης
- ✚ Της αναγωγής των τελουριούχων
- ✚ Της παραγωγής αρυλοσουλφατάσης

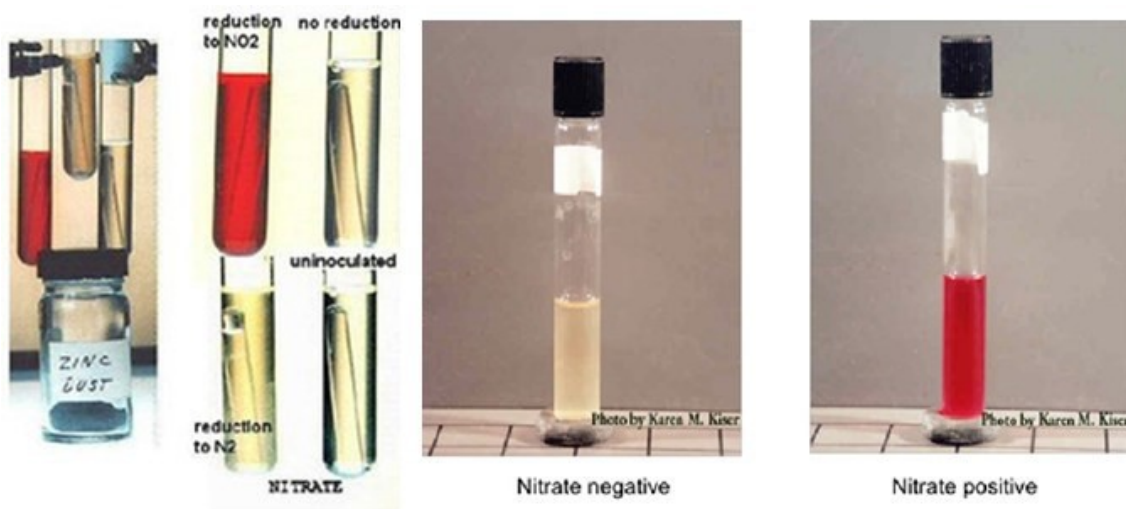
9.5.4.1 Δοκιμή Αναγωγής των Νιτρικών

Με τη δοκιμή αυτή εξετάζεται αν το μυκοβακτηρίδιο ανάγει τα νιτρικά σε νιτρώδη.

Εμβολιάζονται 2ml του Middlebrook 7H9 broth και επωάζονται. Κατόπιν προστίθενται δύο σταγόνες διαλύματος νιτρικού καλίου 4% (w/v) και επωάζονται στους 37°C για 4ώρες. Ακολουθούν οι παρακάτω προσθήκες: 3 σταγόνες διαλύματος HCl 1M, 2 σταγόνες 01% (w/v) υδατικού διαλύματος διυδροχλωρικής N-1-ναφθυλεδιεθυλενοδιαμίνης. Η εμφάνιση κόκκινου χρώματος δείχνει την αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη.

Σε περίπτωση υποψίας ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος, ακολουθεί επιβεβαιωτική δοκιμή με τη προσθήκη ψευδαργύρου, η οποία προκαλεί

αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη και αλλαγή του κόκκινου χρώματος (εικόνα 9.12).



Εικόνα 9.12. Δοκιμασία αναγωγής νιτρικών ιόντων.

9.5.4.2 Δοκιμασία Υδρόλυσης του TWEEN 80

Για την δοκιμασία της υδρόλυσης του tween 80 απαιτούνται τα παρακάτω διαλύματα:

- ✚ Διάλυμα A: 22.88 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ διαλύονται σε 1 lt αποστειρωμένο νερό
- ✚ Διάλυμα B: 9.07gr KH_2PO_4 διαλύονται σε 1 lt αποστειρωμένο νερό.

Αναμιγνύονται 61.1ml από το διάλυμα A με 38.9ml από το διάλυμα B Ακολουθεί η προσθήκη 0.5ml διαλύματος του TWEEN 80 και 2.0 ml υδατικού διαλύματος 0.1% (w/v) neutral red. Το πιο πάνω διάλυμα μοιράζεται σε μπουκάλια στην ποσότητα των 2 ml και αποστειρώνονται

Για την εκτέλεση της δοκιμασίας εμβολιάζεται το παραπάνω μπουκάλι και επωάζεται στους 37°C. παρακολουθείται για 7-14 ημέρες.

Η υδρόλυση καθίσταται ορατή από την αλλαγή του χρώματος, που από ελαφρώς πορτοκαλί μετατρέπεται σε κόκκινο (εικόνα 9.13).



Εικόνα 9.13. Δοκιμασία Υδρόλυσης του TWEEN 80.

(Πηγή: <http://casereports.bmj.com/content/2013/bcr-2013-009159.full.pdf>).

9.5.4.3 Δοκιμή Παραγωγής Καταλάσης

Για την εκτέλεση της δοκιμασίας της παραγωγής καταλάσης πρέπει να αναμείξουμε ίσες ποσότητες υδατικού διαλύματος 0.5% (v/v) TWEEN 80 και 30% (v/v) υπεροξειδίου του υδρογόνου

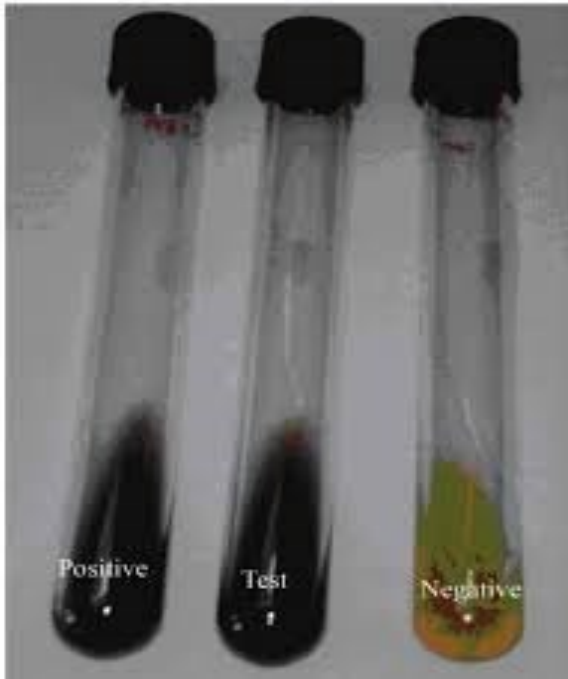
Παίρνουμε 1ml από το παραπάνω διάλυμα και το προσθέτουμε στο καλλιεργημένο μυκοβακτηρίδιο, σε υλικό Lowenstein-Jensen και το αφήνουμε 5 λεπτά. Η παραγωγή φυσαλίδων δίνει θετικό αποτέλεσμα (εικόνα 9.14).



Εικόνα 9.14. Θετικό τεστ καταλάσης, παραγωγή φυσαλίδων οξυγόνου.

9.5.4.4 Δοκιμή Αναγωγής Τελουρικών

Για την εκτέλεση της δοκιμασίας της αναγωγής των τελουρικών ενοφθαλμίζονται 2ml υλικού Middlebrook 7H9 και επωάζονται μέχρι να δημιουργηθεί μεγάλη ανάπτυξη των μικροοργανισμών (3 ημέρες για τα ταχέως αναπτυσσόμενα μυκοβακτηρίδια και 14 ημέρες για τα βραδέως). Στη συνέχεια, προστίθενται 4 σταγόνες 0.4% υδατικού διαλύματος τελουρικού καλίου και το μείγμα επωάζεται εκ νέου. Σε περίπτωση θετικής αντίδρασης παρουσιάζεται μαύρο χρώμα εντός μιας εβδομάδας (εικόνα 9.15).



Εικόνα 9.15. Δοκιμή Αναγωγής Τελουρικών.

9.5.4.5 Δοκιμασία Παραγωγής Αρυλοσουλφατάσης

Με τη δοκιμή αυτή εξετάζεται η διάσπαση της θειικής τρικαλιούχου φαινοφθαλεΐνης και η απελευθέρωση φαινοφθαλεΐνης.

Για την παραπάνω δοκιμή απαιτείται το Sulphatase medium του οποίου η παρασκευή γίνεται ως εξής:

- ✚ Παρασκευάζουμε στείρο υδατικό διάλυμα 6.4gr/lit της θειικής τρικαλιούχου φαινοφθαλεΐνης, Αναμιγνύονται 20ml από το πιο πάνω διάλυμα και 20ml του OADC enrichment (oleic acid-albumin-dextrose-catalase) και προστίθενται σε 180ml υλικού Middlebrook 7H9. Το παρασκευασθέν διάλυμα φυλάγεται στο ψυγείο. Το Middlebrook 7H9 υλικό και το OADC enrichment είναι εμπορικώς διαθέσιμα.
- ✚ Η απελευθέρωση της φαινοφθαλεΐνης διαπιστώνεται με τον εμβολισμό του Sulphatase medium, το οποίο επωάζεται στους 37°C για 3-10 ημέρες.
- ✚ Στη συνέχεια προστίθενται λίγες σταγόνες αμμωνίας. Η παρουσία κόκκινου χρώματος αποτελεί ένδειξη θετικού αποτελέσματος (εικόνα 9.16).



Εικόνα 9.16. Δοκιμασία Παραγωγής Αρυλοσουλφατάσης.

(Πηγή: <http://casereports.bmj.com/content/2013/bcr-2013-009159.full.pdf>).

Οι αντιδράσεις κλειδιά μεταξύ των φωτοχρωμογόνων NTM είναι η αντίδραση στη νιασίνη, η δοκιμασία αναγωγής νιτρικών και η υδρόλυση του TWEEN 80. Για την ταυτοποίηση των σκοτοχρωμογόνων ειδών NTM, ειδικές είναι οι δοκιμασίες αναγωγής νιτρικών, καταλάσης, υδρόλυσης του tween 80 και η δοκιμασία αρυλοσουλφατάσης. Για τα μη σκοτοχρωμόνα, ειδικές είναι οι δοκιμασίες αναγωγής νιτρικών, καταλάσης, υδρόλυσης του tween 80 και η αντοχή σε διάλυμα NaCl 5%. Τα ταχέως αυξανόμενα είδη δεν παράγουν χρωστική αλλά είναι θετικά στη δοκιμασία αρυλοσουλφατάσης και αναπτύσσονται σε άγαρ McConkey.

9.6 Μέθοδοι Προσδιορισμού Φυσικοχημικών Παραμέτρων στο Πόσιμο Νερό

Οι μέθοδοι προσδιορισμού των φυσικών και χημικών παραμέτρων είναι σύμφωνες με τα κριτήρια που θέτει η οδηγία 98/83 της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Οι φυσικές παράμετροι και οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν είναι οι παρακάτω:

- ✚ Προσδιορισμός Χρώματος – φωτομετρία
- ✚ Προσδιορισμός Οσμής και Γεύσης - υποκειμενικά κριτήρια
- ✚ Προσδιορισμός Θολερότητας – νεφελομετρία
- ✚ Προσδιορισμός Θερμοκρασίας - θερμομετρία
- ✚ Προσδιορισμός Αγωγιμότητας, TDS – ηλεκτρομετρία
- ✚ Προσδιορισμός Ολικής Σκληρότητας - συμπλοκομετρία
- ✚ Προσδιορισμός pH – ηλεκτρομετρία

Ο προσδιορισμός των χημικών & βιολογικών παραμέτρων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις παρακάτω μεθόδους:

- ✚ Προσδιορισμός νιτρικών, νιτρωδών, αμμωνίου, θειικών – φασματοφωτομετρία
- ✚ Προσδιορισμός ιόντων καλίου, νατρίου ασβεστίου, μαγνησίου – ατομική απορρόφηση, ιοντική χρωματογραφία
- ✚ Προσδιορισμός σιδήρου, μαγγανίου, μόλυβδου, χρωμίου, αρσενικού – ατομική απορρόφηση, φασματοφωτομετρία

Οι προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν στα Εργαστήρια Ποιοτικού Ελέγχου Πόσιμου Ύδατος της ΔΕΥΑ Λάρισας.

9.6.1 Μέθοδος προσδιορισμού Χρώματος (εναλλακτική μέθοδος HACH)

Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η χρωματομετρική μέθοδος πλατίνας – κοβαλτίου εφαρμόζεται για την μέτρηση χρώματος σε νερά που ο χρωματισμός τους οφείλεται σε φυσικά προϊόντα π.χ. σε φυτικά κατάλοιπα όπως φύλλα, φλοιό, ρίζες, χούμο και τύρφη. Η μέθοδος δεν εφαρμόζεται σε βιομηχανικά απόβλητα πολύ χρωματισμένα.

Αρχή μεθόδου

Το χρώμα μετράται με τη χρήση του χρωματόμετρου HACH. Μία μονάδα χρώματος αντιστοιχεί σε 1 mg/l λευκόχρυσου με τη μορφή ιόντος λευκόχρυσου. Η μέθοδος προσδιορίζει από 0 έως 500 μονάδες χρώματος.

Όργανα – Σκεύη

- ✚ Χρωματόμετρο HACH DR/2010
- ✚ Συσκευή διήθησης κενού
- ✚ Ηθμοί 0.45μm
- ✚ Συνηθισμένος εξοπλισμός εργαστηρίου

Έκφραση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες χρώματος (απευθείας ή ένδειξη της συσκευής).

9.6.2 Μέθοδος Προσδιορισμού Θολερότητας (εναλλακτική μέθοδος HACH)

Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η νεφελομετρική μέθοδος προσδιορισμού της θολότητας εφαρμόζεται στα πόσιμα, επιφανειακά και θαλασσινά νερά .

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην σύγκριση της έντασης του φωτός που σκεδάζεται από το δείγμα, με την ένταση του φωτός που σκεδάζεται από ένα πρότυπο αιώρημα αναφοράς. Όσο ψηλότερη είναι η ένταση του φωτός που σκεδάζεται τόσο μεγαλύτερη είναι η θολότητα. Οι μετρήσεις σε μονάδες NTU γίνονται σύμφωνα με το θολερόμετρο HACH. Για τη ρύθμιση του οργάνου χρησιμοποιούνται έτοιμα πρότυπα διαλύματα HACH θολερότητας: 1000, 100, 10 και 0.61 NTU.

Όργανα - Σκεύη

- Θολερόμετρο HACH 2100 A.
- Συνηθισμένος εξοπλισμός εργαστηρίου

Έκφραση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες θολότητας NTU.

9.6.3 Μέθοδος Προσδιορισμού Θερμοκρασίας (εναλλακτική μέθοδος HACH, CRISON, WTW)

Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Με την κάτωθι περιγραφόμενη διαδικασία πραγματοποιείται η μέτρηση της θερμοκρασίας των δειγμάτων νερού.

Αρχή μεθόδου

Η θερμοκρασία μετρείται με τη χρήση αγωγιμόμετρου ή πεχάμετρου, τα οποία διαθέτουν αισθητήρα θερμοκρασίας.

Όργανα - Σκεύη

- ✚ Φορητό αγωγιμόμετρο HACH CO 150 (εύρος θερμοκρασίας 0 έως 80°C)
- ✚ Φορητό πεχάμετρο WTW PH-320 (εύρος θερμοκρασίας -5 έως 80°C)
- ✚ Αγωγιμόμετρο CRISON micro CM 2100 (εύρος θερμοκρασίας -10 έως 110°C)
- ✚ Πεχάμετρο CRISON micro PH 2002 (εύρος θερμοκρασίας 0 έως 80°C)
- ✚ Ποτήρι ζέσεως

Έκφραση αποτελεσμάτων

Η έκφραση των αποτελεσμάτων δίνεται σε βαθμούς της κλίμακας CELSIUS (°C)

Μέθοδος Προσδιορισμού Ειδικής Αγωγιμότητας (εναλλακτική HACH, CRISON)

Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος που παρατίθεται αφορά τον προσδιορισμό της ειδικής αντίστασης (ή του αντιστρόφου της ειδικής αγωγιμότητας) σε φυσικά νερά με ειδική αντίσταση

ίση ή μικρότερη από 50.000 Ω.

Αρχή μεθόδου

Η ειδική αγωγιμότητα μετράται με τη χρήση είτε φορητού αγωγιμόμετρου HACH CO 150 (με εύρος θερμοκρασίας 0 έως 80°C), είτε αγωγιμόμετρου CRISON micro CM 2100 (με εύρος θερμοκρασίας –10 έως 110°C). Η ειδική αγωγιμότητα ή η ειδική αντίσταση εξαρτάται από τη θερμοκρασία και δίνεται συνήθως στους 25°C.

Έκφραση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες ειδικής αγωγιμότητας, **μS/cm**, στους 25°C.

9.6.4 Μέθοδος Προσδιορισμού pH (εναλλακτική μέθοδος WTW, CRISON)




Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος περιγράφει τον προσδιορισμό του pH (αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης των κατιόντων υδρογόνου) στα πόσιμα και επιφανειακά νερά.

Αρχή μεθόδου

Πραγματοποιείται απευθείας μέτρηση του pH με εμβάπτιση ηλεκτροδίου πεχάμετρου WTW ή CRISON τα οποία φέρουν αισθητήριο θερμοκρασίας (το pH εξαρτάται από τη θερμοκρασία και η τιμή του δίνεται στους 25°C)

Όργανα - Σκεύη

-  Πεχάμετρο CRISON micro PH 2002 με αισθητήριο θερμοκρασίας εύρους 0 έως 80°C
-  Φορητό πεχάμετρο WTW PH-320 με αισθητήριο θερμοκρασίας εύρους – 5 έως 80°C
-  Μαγνητική ανάδευση (για το πεχάμετρο CRISON micro PH 2002)

Έκφραση αποτελεσμάτων

Η ένδειξη του οργάνου είναι απευθείας σε κλίμακα pH από 0 έως 14, στους 25°C.

9.6.5 Μέθοδος προσδιορισμού των ανιόντων (Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-}) και των κατιόντων (Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) με ιοντική χρωματογραφία

Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Προσδιορισμός των ανιόντων (Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-}) και των κατιόντων (Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}), σε δείγματα πόσιμου και επιφανειακού νερού.

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στη διέλευση του δείγματος μέσα από στήλη ιοντικής χρωματογραφίας με εκλουστικό ρυθμιστικό διάλυμα, του οποίου τα ιόντα έχουν τη μέγιστη δυνατή διαφορά αγωγιμότητας από τα ιόντα του δείγματος. Ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα είναι ιονανταλλαγή και τα ιόντα διαχωρίζονται με βάση τους χρόνους συγκράτησης στη στήλη.

Όργανα

Ιοντική χρωματογραφία ανιόντων και κατιόντων DIONEX DX 100 με δυο Δειγματολήπτες (auto - samplers) METHROHM 698.

9.6.6 Μέθοδος προσδιορισμού ολικά διαλυμένων στερεών (εναλλακτική μέθοδος)

Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος που περιγράφεται προσδιορίζει τα διαλυμένα στερεά σε πόσιμα και επιφανειακά νερά. Τα ολικά διαλυμένα στερεά (TDS), είναι όλα τα σωματίδια διαλυμένα ή κολλοειδή, που περνούν από φίλτρο με γυάλινες ίνες και παραμένουν μετά από εξάτμιση και ξήρανση στους 180°C .

Αρχή μεθόδου

Τα TDS προσδιορίζονται μέσω της τιμής της αγωγιμότητας του δείγματος νερού με τη βοήθεια πίνακα, που ανάγει την αγωγιμότητα σε TDS (ppm CaCO_3).

Έκφραση αποτελεσμάτων

Η διαδικασία υπολογισμού των TDS είναι η εξής:

- ✚ Αν βρεθεί η αγωγιμότητα του δείγματος νερού 5μS τότε, από βιβλιογραφικό πίνακα, η τιμή των TDS θα είναι 3 ppm CaCO₃.
- ✚ Αν βρεθεί 10μS τότε τα TDS θα είναι 6 ppm CaCO₃ κ.ο.κ.
- ✚ Αν όμως η αγωγιμότητα είναι 7,5μS τότε η τιμή των TDS υπολογίζεται με την απλή μέθοδο των τριών, δηλαδή:

Τα 5μS	αντιστοιχούν σε	3 ppm CaCO ₃
Τα 7,5μS	αντιστοιχούν σε	X; ppm CaCO ₃
<hr/>		
$X = 3 \cdot 7,5 / 5 = 4,5 \text{ ppm CaCO}_3$		

9.6.7 Μέθοδος Προσδιορισμού Ασβεστίου

Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος που παρατίθεται προορίζεται για τον προσδιορισμό του ασβεστίου σε νερά που έχουν περιεκτικότητα σε ασβέστιο από 2 mg/L ως 100 mg/L. Το δείγμα αραιώνεται αν έχει περιεκτικότητα σε ασβέστιο μεγαλύτερη από 100 mg/L.

Αρχή μεθόδου

Τα ιόντα ασβεστίου τιτλοδοτούνται με διάλυμα του μετα-νατρίου άλατος του αιθυλενοδιαμινοτετραοξεικού οξέος (EDTA), σε τιμή pH μεταξύ 12 και 13. Ως δείκτης χρησιμοποιείται calcon- καρβοξυλικό οξύ, που σχηματίζει κόκκινο σύμπλοκο με το ασβέστιο. Το μαγνήσιο καταβυθίζεται ως υδροξείδιο και δεν επηρεάζει τον προσδιορισμό. (Αν δεν υπάρχουν ιόντα μαγνησίου, τότε προστίθεται μια ποσότητα μαγνησίου για να γίνει πιο ευδιάκριτη η αλλαγή του χρώματος. Κατά την τιτλοδότηση τα ιόντα ασβεστίου αντιδρούν με το EDTA, τα ελεύθερα ιόντα πρώτα και έπειτα αυτά που είναι συνδεδεμένα με το δείκτη, οπότε τότε αλλάζει το χρώμα του δείκτη από κόκκινο σε ζυηρό μπλε.

Έκφραση αποτελεσμάτων

Η περιεκτικότητα του ασβεστίου υπολογίζεται με του τύπο:

$$X = 1000 \cdot 40.08 \cdot V \cdot C / 50$$

Όπου:

- ✚ X είναι η περιεκτικότητα ασβεστίου στο δείγμα mg/L
- ✚ V είναι ο όγκος του διαλύματος EDTA που καταναλώθηκε
- ✚ C είναι η συγκέντρωση του διαλύματος EDTA σε mol/L

9.6.8 Μέθοδος Προσδιορισμού Μαγνησίου

Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος που ακολουθεί περιγράφει τον προσδιορισμό του μαγνησίου σε πόσιμα και επιφανειακά νερά.

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ασβεστίου και ολικής σκληρότητας στο δείγμα νερού και η συγκέντρωση σε μαγνήσιο βρίσκεται με βάση μια κατάλληλη σχέση.

Έκφραση αποτελεσμάτων

Η συγκέντρωση του μαγνησίου βρίσκεται από τη σχέση:

$$\text{Συγκέντρωση Ca} / 0,4 + \text{Συγκέντρωση Mg} / 0,243 = \text{Σκληρότητα ως CaCO}_3$$

Όπου:

- ✚ Συγκέντρωση Ca είναι η συγκέντρωση Ca σε mg/L
- ✚ Συγκέντρωση Mg είναι η συγκέντρωση Mg σε mg/L
- ✚ Σκληρότητα ως CaCO₃ σε mg/L

9.6.9 Μέθοδος Προσδιορισμού Χλωριούχων Ιόντων

Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος εφαρμόζεται σε σχετικά διαυγή και χωρίς χρώμα νερά που περιέχουν 0,15 έως 10 mg Cl⁻ στην ογκομετρούμενη ποσότητα δείγματος.

Αρχή μεθόδου

Σε ουδέτερο ή ελαφρά αλκαλικό διάλυμα, με χρωμικό κάλιο ως δείκτη για τον ογκομετρικό προσδιορισμό με AgNO₃. Ο νιτρικός άργυρος έχει καταβυθιστεί ποσοτικά όταν αρχίσει να εμφανίζεται το κόκκινο χρώμα του χρωμικού αργύρου.

Έκφραση αποτελεσμάτων

Συγκέντρωση χλωριούχων ιόντων (mg/L Cl⁻) = (A - B) - N - 35,450

Όπου :

- ✚ A mL δείγματος που καταναλώθηκαν για το δείγμα
- ✚ B mL διαλύματος που καταναλώθηκαν για το λευκό
- ✚ N κανονικότητα του διαλύματος νιτρικού αργύρου.

9.7 Μέθοδοι Προσδιορισμού Μικροβιολογικών Παραμέτρων στο Πόσιμο Νερό

Οι μέθοδοι προσδιορισμού των μικροβιολογικών παραμέτρων είναι σύμφωνες με τα κριτήρια που θέτει η *ευρωπαϊκή οδηγία 98/83/EK* και σύμφωνα με τα *ISO 6222:1999(E)*, *ISO 6461-2:2002*, *ISO 7899-2:2000(E)* και *ISO 9308-1:2000*.

Ο προσδιορισμός των μικροβιολογικών παραμέτρων πραγματοποιήθηκαν με μεθόδους όπως:

- α) μέθοδοι απευθείας μέτρησης και
- β) μέθοδοι μεμβρανών.

9.7.1 Καταμέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας στους 37°C και 22°C

Γενικά

Η αρίθμηση της ΟΜΧ (ετερότροφων βακτηριδίων) περιλαμβάνει αερόβια και προαιρετικά αναερόβια βακτήρια που βρίσκονται στο νερό και μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν απλά οργανικά στοιχεία (αμινοξέα, πεπτιδία και κυρίως υδατάνθρακες), μετά από επώαση σε ορισμένη θερμοκρασία και για καθορισμένο χρονικό διάστημα. Είναι μια εμπειρική μέτρηση γιατί τα βακτήρια εμφανίζονται μεμονωμένα ή κατά ζεύγη ή αλυσίδες ή κατά ομάδες. Άρα ο αριθμός των αποικιών είναι σαφώς μικρότερος από τον πραγματικό αριθμό των ζωντανών παρόντων οργανισμών.

Οι αποικίες αποτελούνται από βακτήρια, μύκητες και ζύμες ικανές να αναπτυχθούν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες επώασης. Η μέθοδος είναι μέθοδος καταμέτρησης των αερόβιων και προαιρετικά αναερόβιων ετερότροφων μικροβίων, που αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 37°C επί 48 ώρες και σε θερμοκρασία 22°C επί 72 ώρες. Η θερμοκρασία των 37°C δίνει την

ευκαιρία στα ετερότροφα βακτήρια, τα οποία πολλαπλασιάζονται ταχέως, να αναπτυχθούν, ενώ στους 22°C πολλαπλασιάζονται τα βραδέως αναπτυσσόμενα (αυτόχθονα) βακτήρια. Η μέθοδος εφαρμόζεται σε όλα τα νερά και ειδικότερα στα πόσιμα.

Η μικροβιακή καταλληλότητα του πόσιμου νερού ελέγχεται με την καταμέτρηση των μικροβιακών δεικτών. Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι δείκτες είναι τα ολικά κολοβακτηριοειδή, τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή και οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι.

Έκφραση αποτελεσμάτων

Αριθμός αποικιών ανά ml δείγματος.

9.7.2 Μέθοδοι Μέτρησης Κολοβακτηριδίων

Γενικά

Στην ομάδα των κολοβακτηριοειδών περιλαμβάνονται όλα τα αερόβια και προαιρετικά αναερόβια μη σπορογόνα Gram-αρνητικά βακτήρια, τα οποία ζυμώνουν τη λακτόζη με παραγωγή αερίου σε 48 ώρες στους 36±1°C.

Για τον έλεγχο ρουτίνας των αλλόχθονων μικροοργανισμών - δεικτών χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι:

- A.** Μέθοδος Πολλαπλών Σωλήνων (MPN - ΠΑΚ)
- B.** Μέθοδος Διήθησης δια Μεμβράνης.

9.7.3 Κολοβακτηριοειδή Κοπράνων – *E. coli*

Γενικά

Τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή (faecal coliforms) έχουν τις ίδιες ιδιότητες με τα κολοβακτηριοειδή αλλά μπορούν να πολλαπλασιαστούν στους 44,0 ± 0,2°C μετά από επώαση 24 ωρών. Η *E. coli* είναι το πιο τυπικό

είδος της ομάδας των κοπρανωδών κολοβακτηριοειδών και παράγει ινδόλη από την τρυπτοφάνη στους $44,0 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

Τόσο τα κολοβακτηριοειδή κοπράνων όσο και οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι βρίσκονται στο γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των άλλων θερμόαιμων ζώων και η παρουσία τους στο νερό υποδεικνύει ρύπανση κοπρανώδους προέλευσης και πιθανή παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών. Η επιβίωσή τους στο νερό ποικίλλει από ώρες μέχρι εβδομάδες.

Για τον έλεγχο ρουτίνας χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι:

A. Μέθοδος Πολλαπλών Σωλήνων (MPN - ΠΑΚ)

B. Μέθοδος Διήθησης δια Μembrάνης.

9.7.4 Στρεπτόκοκκοι Κοπράνων

Γενικά

Οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι (faecal streptococci) είναι Gram-θετικοί, καταλάση-αρνητικοί κόκκοι που απαντούν ανά ζεύγη ή μικρές αλυσίδες. Αποτελούνται από ορισμένα είδη του γένους *Streptococcus* (*S.faecalis*, *S.faecium*, *S.avium*, *S.bovis*, *S.equinus*, *S.gallinarum*). Διαθέτουν το Group D αντιγόνο κατά Lancefield. Ορισμένα είδη όπως *S.faecalis*, *S.faecium*, απαντώνται συχνότερα στα κόπρανα του ανθρώπου ενώ άλλα είδη στα κόπρανα των ζώων.

Η ομάδα των εντεροκόκκων είναι υποομάδα των κοπρανωδών στρεπτόκοκκων και περιλαμβάνουν τα είδη *S.faecalis*, *S.faecium*, *S. gallinarum*, *S.avium*. Στα συνήθη θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των κοπρανωδών στρεπτοκόκκων υπάρχουν ενδείξεις ότι αναπτύσσονται μόνο τα είδη που περιλαμβάνονται στην υποομάδα των εντεροκόκκων.

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος που περιγράφεται στη συνέχεια είναι η μέθοδος διήθησης ορισμένου όγκου δείγματος διά μέσου μεμβράνης με μέγεθος πόρων $0,45 \mu\text{m}$ ικανό να

συγκρατεί τα μικρόβια.

Έκφραση αποτελεσμάτων

Αριθμός αποικιών ανά 100ml δείγματος.

9.7.5 Θειοαναγωγικά Κλωστρίδια (*Cl. perfringens*)

Γενικά

Οι σπόροι των θειοαναγωγικών αναερόβιων μικροβίων (κλωστηριδίων) είναι ευρέως διαδεδομένοι στο περιβάλλον. Υπάρχουν στα κόπρανα ανθρώπων και ζώων καθώς και στα απόβλητα και το χώμα. Αντίθετα με τα κολοβακτηριοειδή και την *Escherichia coli*, οι σπόροι επιζούν στο νερό για μεγάλα χρονικά διαστήματα γιατί είναι περισσότερο ανθεκτικοί από τις βλαστικές μορφές στην επίδραση διαφόρων χημικών και φυσικών παραγόντων.

Η παρουσία τους αποτελεί δείκτη παλαιάς ή διαλείπουσας ρύπανσης. Μπορεί, επίσης, να είναι ανθεκτικοί και στη χλωρίωση στα επίπεδα που συνήθως αυτή χρησιμοποιείται για την κατεργασία του νερού και επομένως έτσι η ανίχνευση των σπόρων να χρησιμεύει και για έλεγχο της.

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος που περιγράφεται στη συνέχεια είναι μέθοδος ανίχνευσης και αρίθμησης των σπόρων θειοαναγωγικών κλωστηριδίων με διήθηση ορισμένου όγκου δείγματος διά μέσου μεμβράνης με μέγεθος πόρων ικανό να συγκρατεί τα μικρόβια. Η μεμβράνη τοποθετείται σε στερεό εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα και επωάζεται σε αναερόβιες συνθήκες.

Η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί σε όλους τους τύπους νερού, εκτός εκείνων με σημαντική πυκνότητα σωματιδίων, που μπορεί να κατακρατηθούν από τη μεμβράνη (χρησιμοποιούνται κατάλληλες αραιώσεις).

Έκφραση αποτελεσμάτων

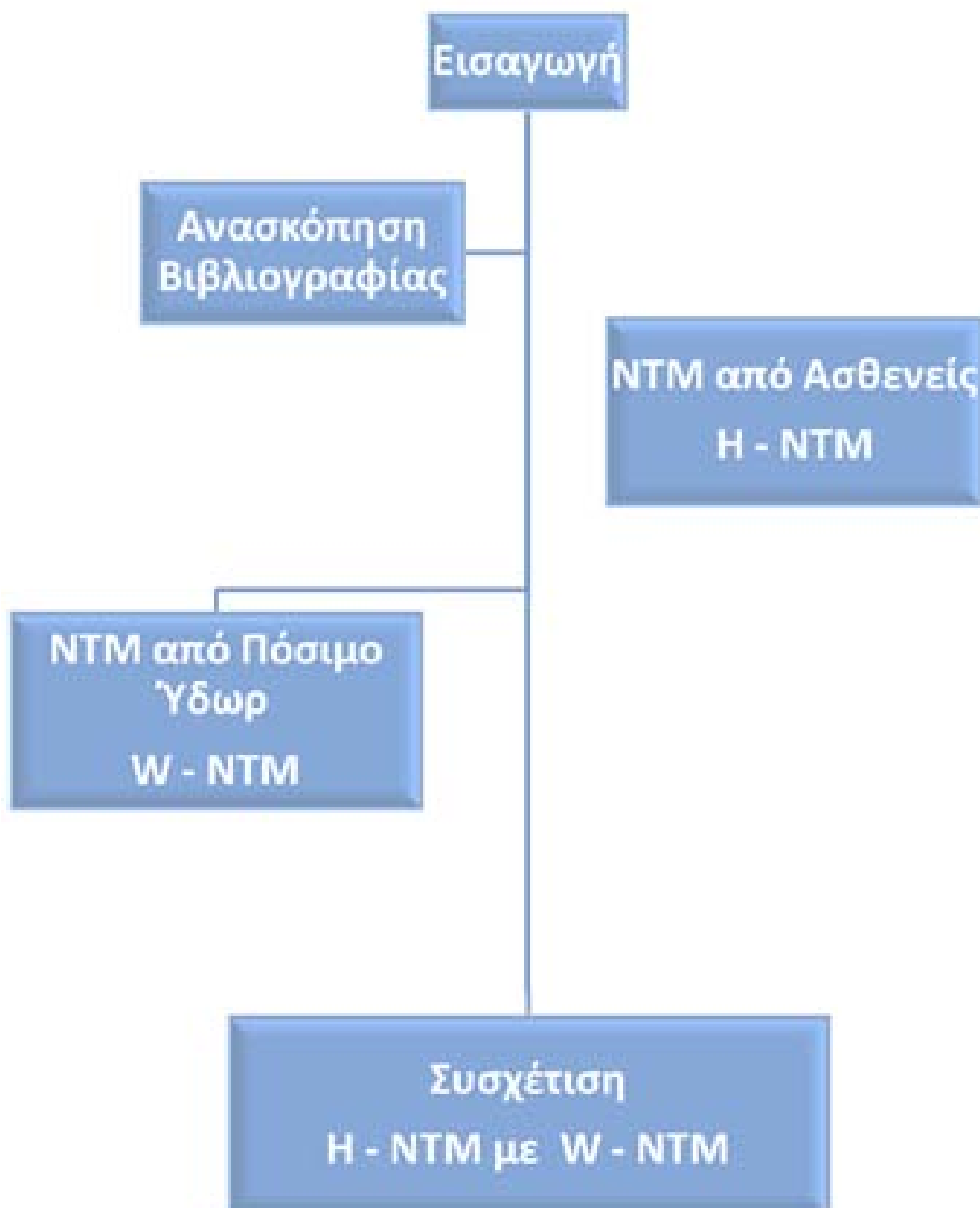
Αριθμός αποικιών ανά ml δείγματος.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κεφάλαιο 10^ο – Αποτελέσματα

10.1 Επιμέρους Στάδια Κεντρικού Στόχου της Διατριβής

Στην εικόνα 10.1 παρουσιάζονται τα επιμέρους στάδια της παρούσας διατριβής, κατά σειρά υλοποίησης.



Εικόνα 10.1. Στάδια κεντρικού στόχου της διατριβής κατά σειρά υλοποίησης.

10.2 Δημιουργία Βάσης Δεδομένων με τους Θετικούς σε NTM Ασθενείς του ΠΝΛ

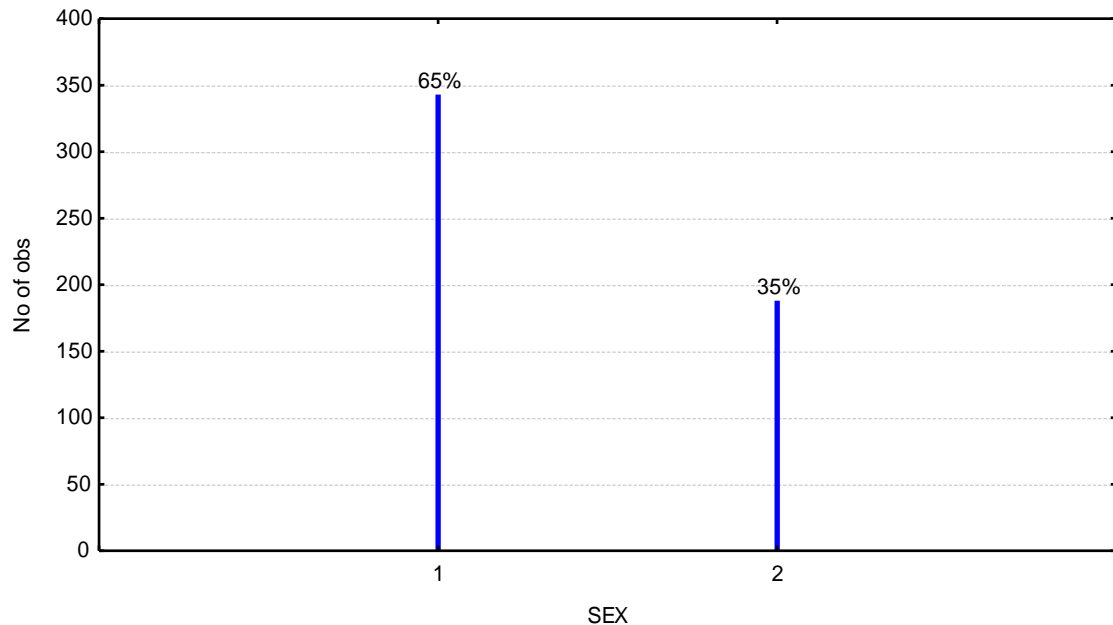
Η πρώτη φάση υλοποίησης της παρούσας διατριβής περιελάμβανε τη δημιουργία ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων με τους ασθενείς της ευρύτερης περιοχής Θεσσαλίας, από τους οποίους πραγματοποιήθηκε απομόνωση άτυπων μυκοβακτηριδίων κατά το διάστημα 2003 – 2011.

Οι θετικοί σε NTM ασθενείς βρέθηκαν από το αρχείο του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του ΠΝΛ, το οποίο ασχολείται με την απομόνωση των NTM από βιολογικά δείγματα ασθενών. Στο αρχείο αυτό μας δόθηκε πρόσβαση από τη Διευθύντριά του, κ. Έφη Πετεινάκη.

Στην αρχή δημιουργήθηκε μία βάση δεδομένων, στην οποία καταχωρήθηκαν οι θετικοί ασθενείς και το είδος των άτυπων μυκοβακτηριδίων που απομονώθηκαν από αυτούς. Βρέθηκε ότι κατά το ανωτέρω χρονικό διάστημα στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του ΠΝΛ είχαν απομονωθεί NTM από 718 ασθενείς του, οι οποίοι ως επί των πλείστων διέμεναν στην ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας.

10.3 Εκατοστιαία αναλογία φύλου θετικών σε NTM ασθενών από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας

Το ποσοστό των θετικών σε NTM αρρένων ασθενών από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας ήταν 65% και των θήλυ 35% (εικόνα 10.2).

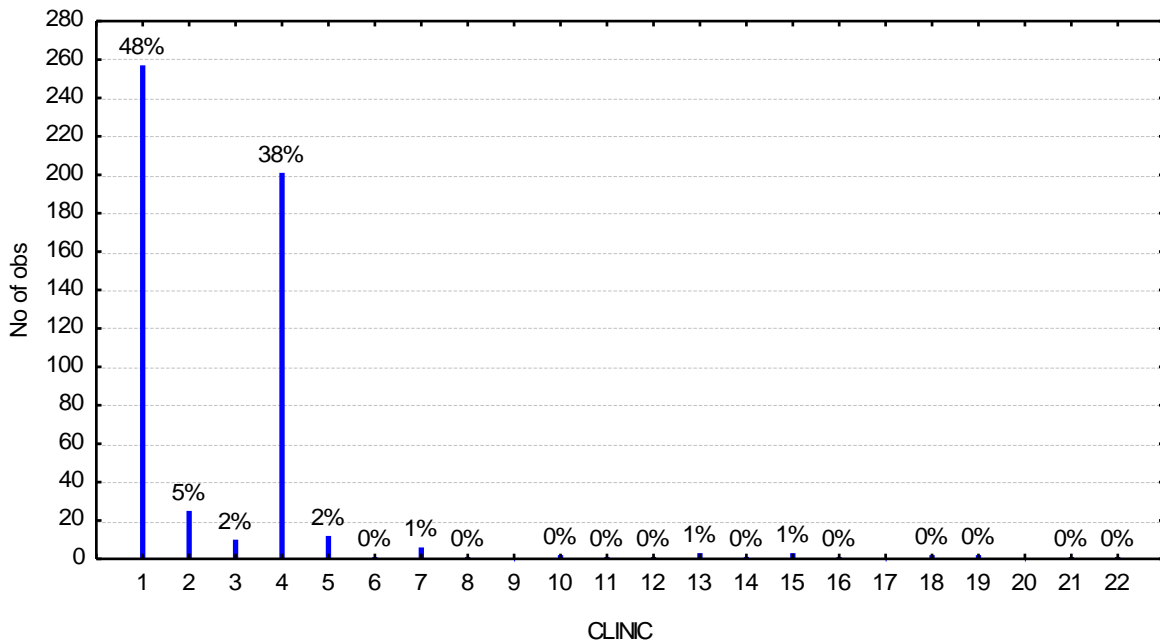


Εικόνα 10.2. Εκατοστιαία αναλογία αρρένων και θήλυ ασθενών θετικών σε NTM από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας (κόκκινο = άρρεν, 65% και πράσινο = θήλυ, 35%).

Όπως φαίνεται στην *εικόνα 10.2*, η πλειοψηφία των θετικών σε NTM ασθενών από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας ήταν άρρενες (65%).

10.4 Κλινικές του ΠΝΛ από τις οποίες προήλθαν τα θετικά σε NTM δείγματα ασθενών από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας

Στην εικόνα 10.3 παρουσιάζονται οι κλινικές του ΠΝΛ από τις οποίες προήλθαν τα θετικά σε NTM βιολογικά δείγματα.

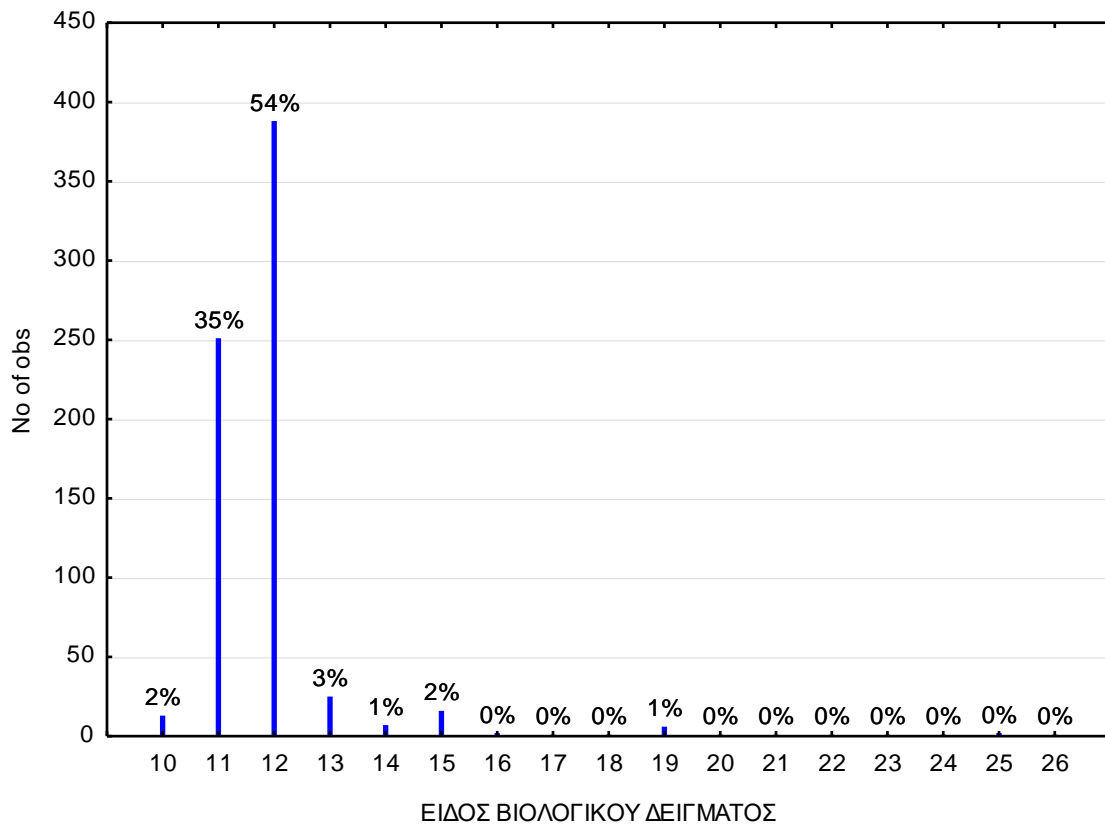


Εικόνα 10.3. Κλινικές (%) του ΠΝΛ από τις οποίες προήλθαν τα θετικά σε NTM δείγματα ασθενών από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας (1 = Πνευμονολογική κλινική, 2 = Αντιφυματικό ιατρείο, 3 = Γαστρεντερολογική κλινική, 4 = Παθολογική κλινική, 5 = Ρευματολογική κλινική και 6-22 = άλλες κλινικές).

Από την εικόνα 10.3 προκύπτει ότι τα βιολογικά δείγματα των θετικών σε άτυπα ασθενών προήλθαν στη συντριπτική τους πλειοψηφία από πέντε κλινικές του ΠΝΛ, και κυρίως από την πνευμονολογική κλινική του.

10.5 Είδη βιολογικού δείγματος από το οποίο απομονώθηκαν NTM, από ασθενείς από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας

Το είδος των βιολογικών υλικών, από τα οποία απομονώθηκαν NTM σε ασθενείς από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας και η εκατοστιαία αναλογία τους παρουσιάζεται στην *εικόνα 10.4*.

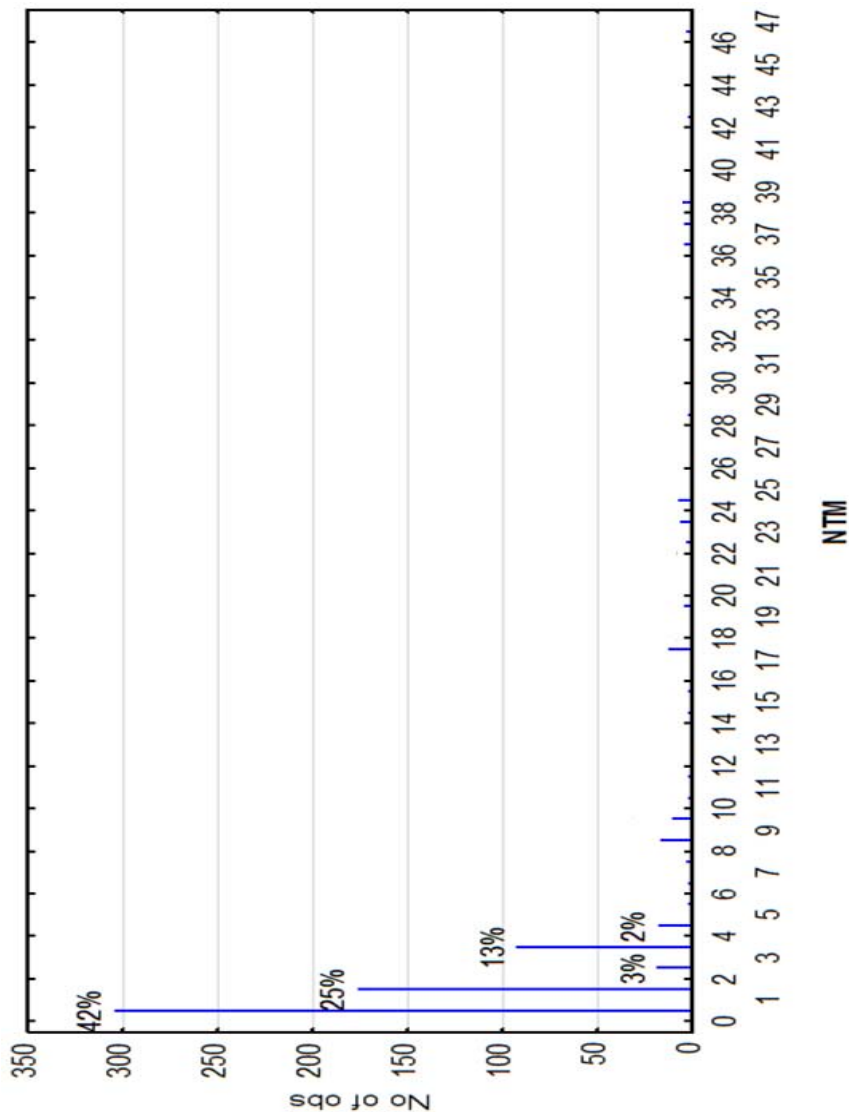


Εικόνα 10.4. Είδη βιολογικού δείγματος (%) από το οποίο απομονώθηκαν NTM [11, 12 = πτύελα, 10, 13-26) = διάφορα βιολογικά δείγματα]

Η πλειονότητα των μελετώμενων βιολογικών δειγμάτων που βρέθηκαν θετικά σε NTM ήταν πτύελα, όπως φαίνεται στην *εικόνα 10.4*.

10.6 Είδη NTM που απομονώθηκαν από ασθενείς από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας

Τα είδη των NTM που απομονώθηκαν από ασθενείς από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας και το εκατοστιαίο ποσοστό τους, παρουσιάζονται στην εικόνα 10.5.



Εικόνα 10.5. Διαφορετικά είδων NTM (%) που απομονώθηκαν από ασθενείς από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας.

Από την εικόνα 10.5 παρατηρούμε ότι κυρίως οκτώ είδη NTM απομονώθηκαν από τους θετικούς σε NTM ασθενείς, από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας (*M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *Mη ταυτοποίησιμα*, *M. intracellulare*, *M. chelonae*, *M. xenopi* και *M. scrofulaceum*).

10.7 Προσδιορισμός μόνιμης κατοικίας των θετικών σε NTM ασθενών

Από τους συνολικά 718 θετικούς σε NTM ασθενείς, ταυτοποιήθηκαν οι 367 από το αρχείο του νοσοκομείου. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δεδομένων για τους 367 θετικούς σε NTM ασθενείς της ανωτέρω βάσης δεδομένων.

Σε πρώτη φάση, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της περιοχής της μόνιμης κατοικίας των ασθενών αυτών με τη βοήθεια του αρχείου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Για το σκοπό αυτό αναζητήθηκαν στοιχεία των θετικών σε NTM ασθενών κατά το ανωτέρω χρονικό διάστημα από το ιστορικό τους που ήταν αποθηκευμένο στο αρχείο του ΠΝΛ.

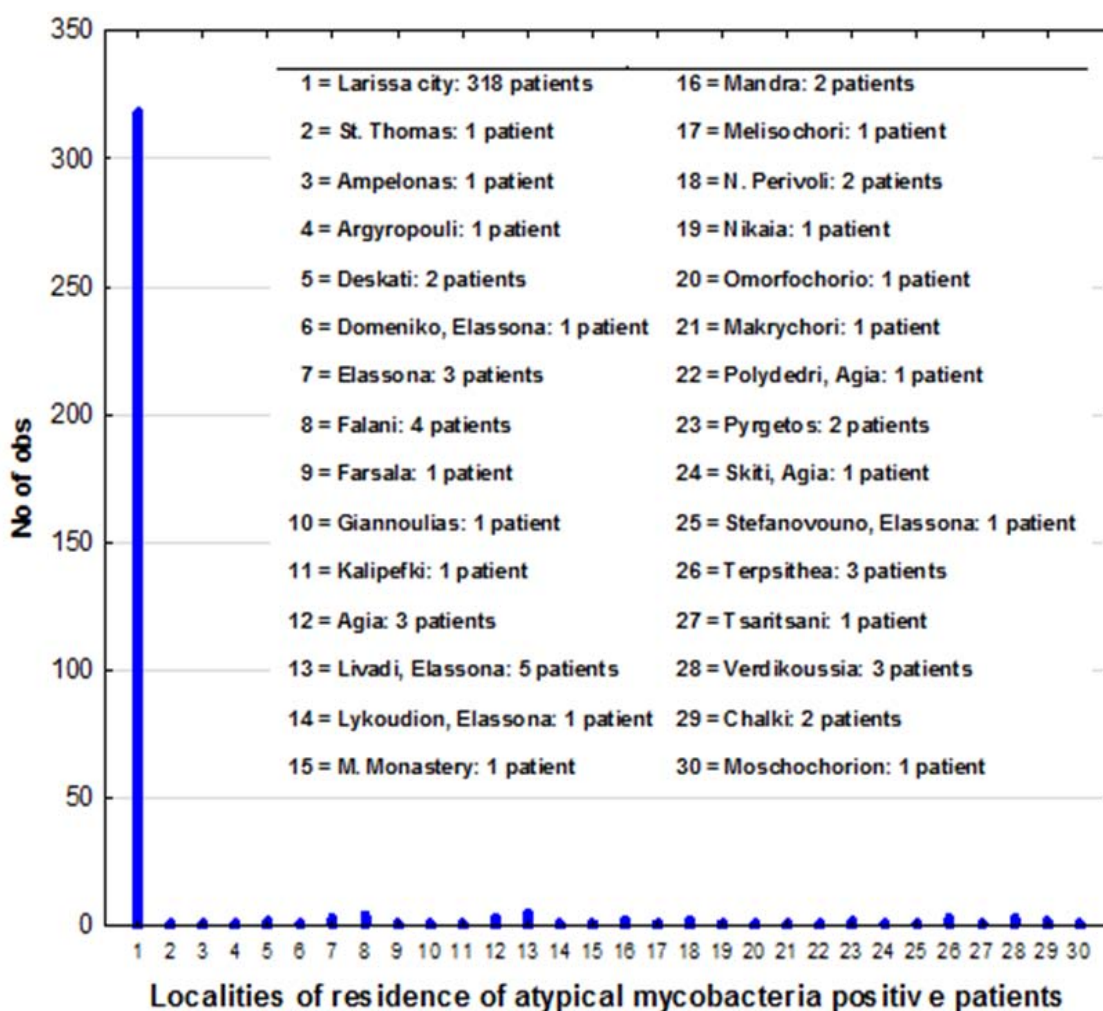
Με βάση τα στοιχεία του αρχείου ασθενών του ΠΝΛ, δημιουργήθηκε μία ηλεκτρονική βάση με τους θετικούς σε NTM ασθενείς που η περιοχή μόνιμης κατοικίας τους ήταν η ευρύτερη περιοχή του νομαρχιακού διαμερίσματος της Λάρισας. Η βάση που δημιουργήθηκε, μεταξύ άλλων, περιλαμβάνει το φύλο του ασθενούς, τη κλινική από την οποία πάρθηκε το βιολογικό δείγμα, την περιοχή διαμονής του ασθενούς και τα είδη των άτυπων μυκοβακτηριδίων που απομονώθηκαν από τους ασθενείς.

Ο εντοπισμός της περιοχής μόνιμης κατοικίας των θετικών σε NTM ασθενών ήταν ένα απαραίτητο και επίμονο εγχείρημα για την επιτυχή υλοποίηση της διατριβής. Διότι, με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα, μία πιθανή οδός μετάδοσης των άτυπων μυκοβακτηριδίων στον άνθρωπο είναι το πόσιμο ύδωρ. Συνεπώς, ήταν καθοριστικής σημασίας να εντοπιστούν οι περιοχές μόνιμης κατοικίας των θετικών σε NTM ασθενών.

10.7.1 Σημεία Δειγματοληψίας Πόσιμου Ύδατος

Η δεύτερη φάση αφορούσε στη διερεύνηση της παραπάνω αναφερόμενης βιβλιογραφικής άποψης. Για να διερευνηθεί το εν λόγω ζήτημα συλλέχθηκαν δείγματα πόσιμου νερού από περιοχές που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς από τους οποίους απομονώθηκαν άτυπα μυκοβακτηρίδια.

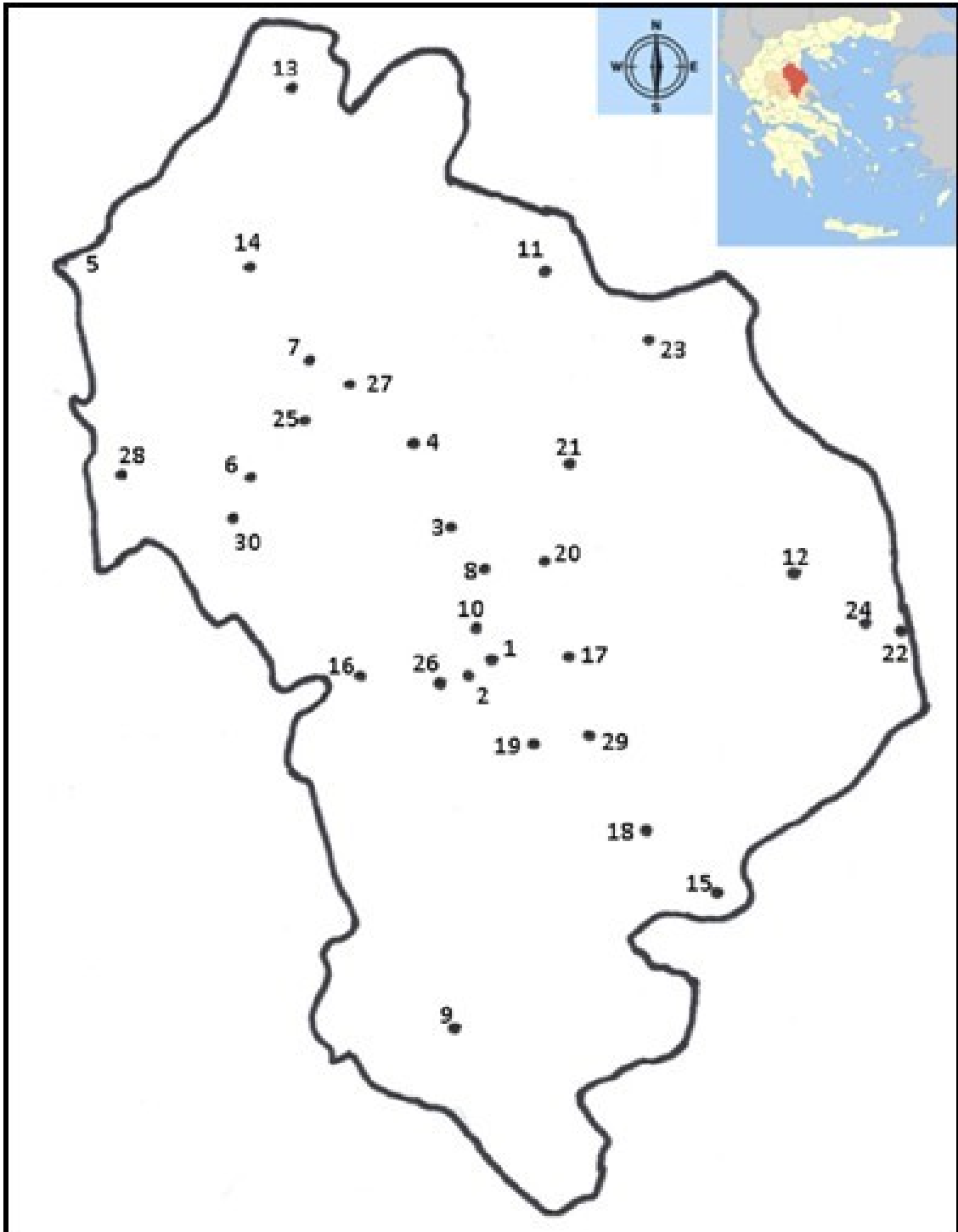
Με ανάλυση των δεδομένων της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων, εντοπίστηκαν οι περιοχές στις οποίες διέμεναν οι ασθενείς από τους οποίους απομονώθηκαν άτυπα μυκοβακτηρίδια (εικόνα 10.6).



Εικόνα 10.6. Περιοχές Μόνιμης κατοικίας ασθενών θετικών σε NTM.

Στη συνέχεια επιλέχθηκαν οι περιοχές αυτές από την περιοχή της πόλης της Λάρισας και από την ευρύτερη περιοχή του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας, από τις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες πόσιμου ύδατος.

Στην *εικόνα 10.7* παρουσιάζονται στον χάρτη οι εν λόγω περιοχές, από όπου φαίνεται η μεγάλη γεωγραφική διασπορά των σημείων δειγματοληψίας.

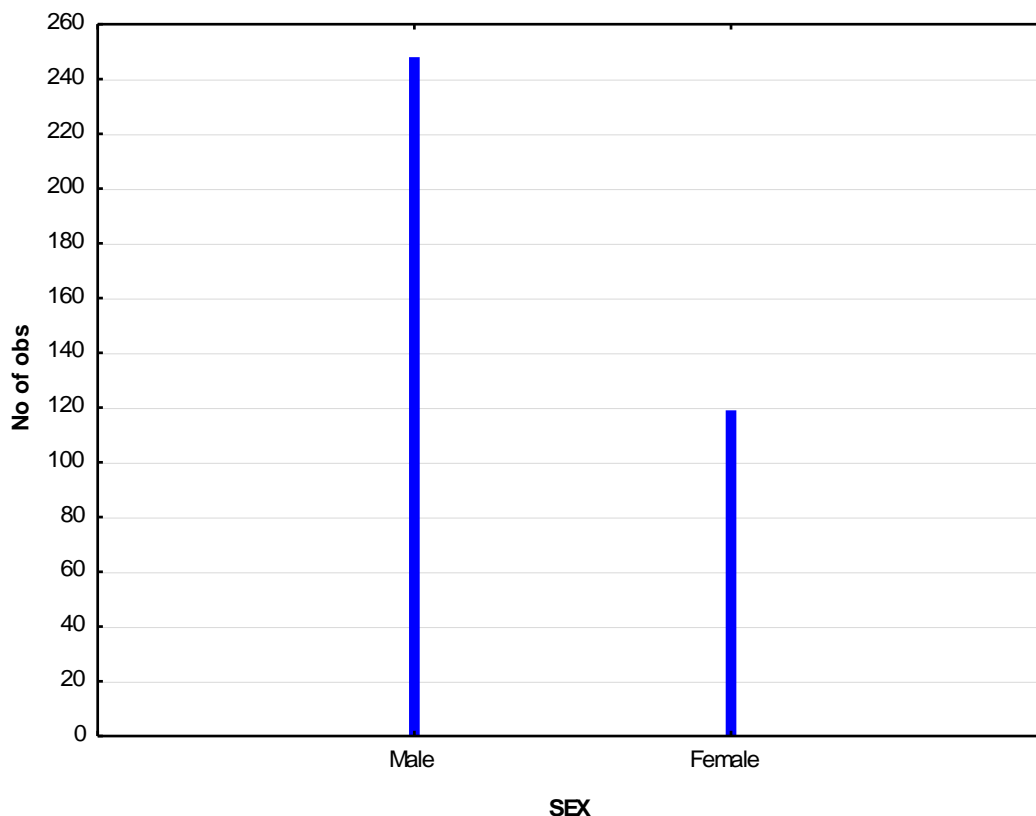


Εικόνα 10.7. Χάρτης του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισσας με τις περιοχές δειγματοληψίας πόσιμου ύδατος.

(1 = πόλη της Λάρισσας, 2 = Άγιος Θωμάς, 3 = Αμπελώνας, 4 = Αργυροπούλιο, 5 = Δεσκάτη, 6 = Δομένικο, 7 = Ελασσόνα, 8 = Φαλάνη, 9 = Φάρσαλα, 10 = Γιάννουλη, 11 = Καλλιπεύκη, 12 = Αγιά, 13 = Λιβάδι, 14 = Λυκούδιον, 15 = Μεγάλο Μοναστήρι, 16 = Μάνδρα, 17 = Μελισσοχώρι, 18 = Νέο Περιβόλι, 19 = Νίκαια, 20 = Ομορφοχώρι, 21 = Μακρυχώρι, 22 = Πολυδένδρι, 23 = Πυργετός, 24 = Σκήτη, 25 = Στεφανόβουνο, 26 = Τερψιθέα, 27 = Τσαριτσάνη, 28 = Βερδικούσια, 29 = Χάλκη και 30 = Μοσχοχώρι).

10.8 Εκατοστιαία αναλογία φύλου θετικών σε NTM ασθενών από την ευρύτερη περιοχή του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας

Το ποσοστό των θετικών σε NTM αρρένων ασθενών από την περιοχή του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας, ήταν 67.6% και των θήλυ 32.4% (εικόνα 10.8).

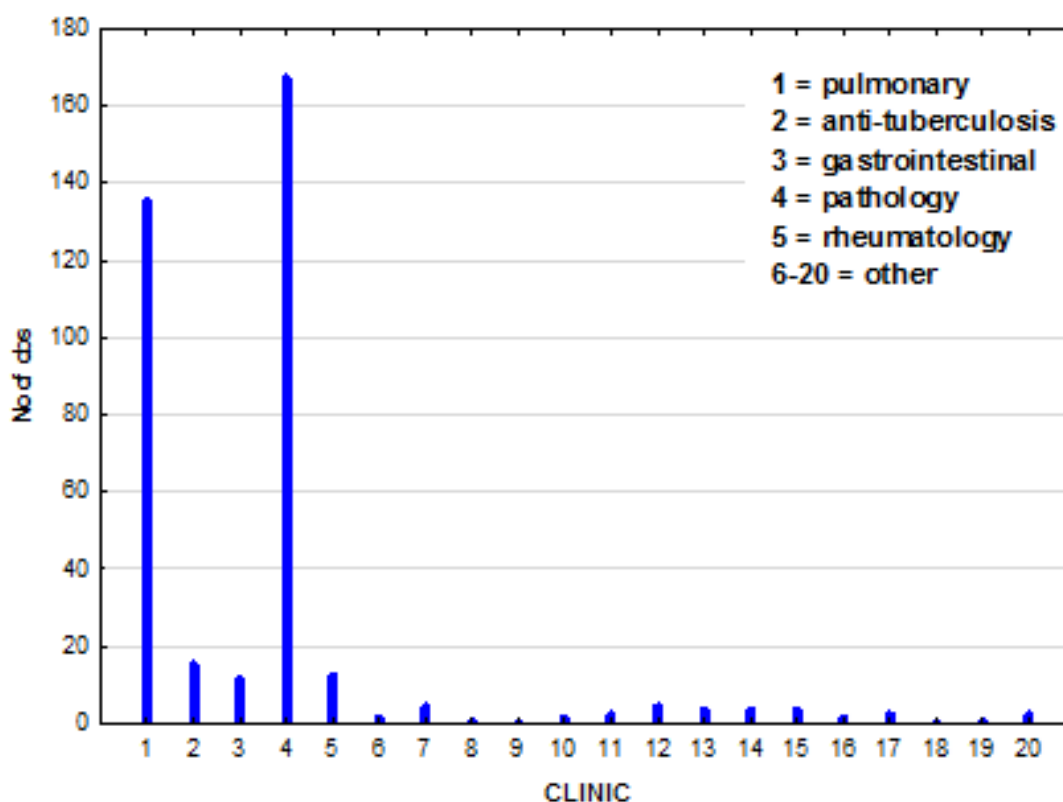


Εικόνα 10.8. Κατανομή φύλου των θετικών σε NTM ασθενών από την περιοχή του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας [άρρεν (n=248 ασθενείς, 67.6%) και θήλυ (n=119 ασθενείς, 32.4%)].

Από την *εικόνα 10.8* παρατηρούμε ότι η πλειοψηφία των θετικών σε NTM ασθενών από την περιοχή της Λάρισας ήταν άρρενες (67.6%), ποσοστό που είναι περίπου ίδιο με αυτό όλων των μελετώμενων θετικών σε NTM ασθενών από την ευρύτερη περιοχή της Θεσσαλίας, άρα αντιπροσωπευτικού αυτού.

10.9 Προέλευση των βιολογικών δειγμάτων από τα οποία απομονώθηκαν NTM, από ασθενείς από την ευρύτερη περιοχή του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας

Στην εικόνα 10.9 παρουσιάζονται οι κλινικές του ΠΝΛ από τις οποίες προήλθε το θετικό σε NTM βιολογικό δείγμα, ασθενών με περιοχή μόνιμης κατοικίας την ευρύτερη περιοχή του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας.

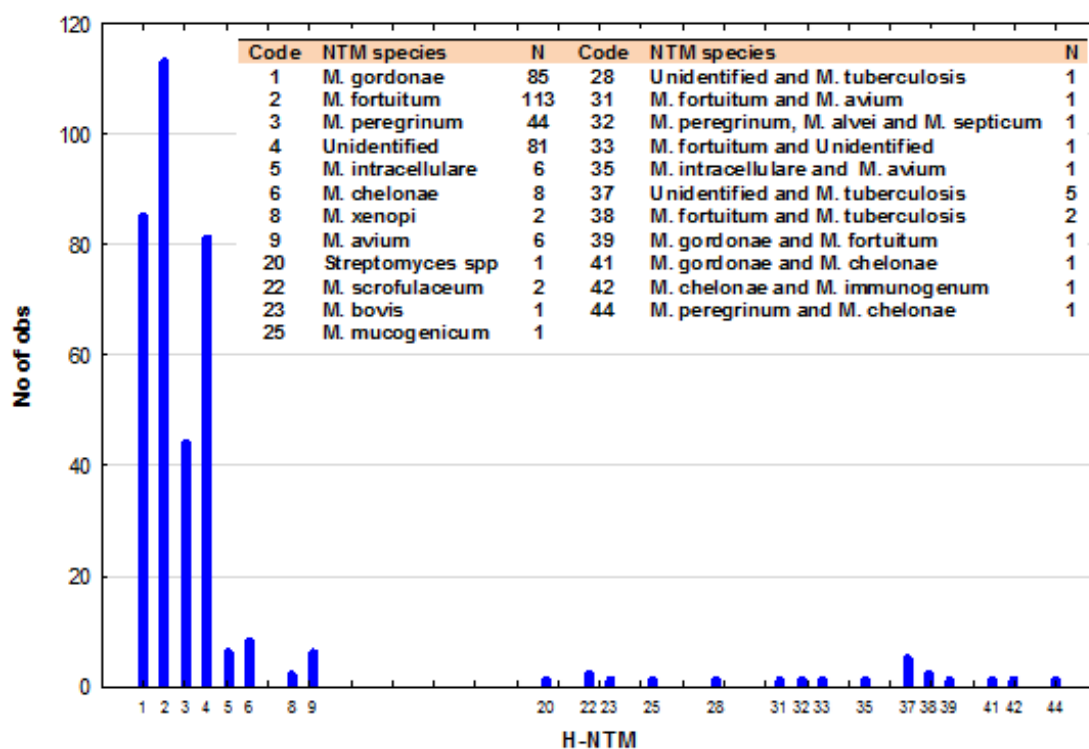


Εικόνα 10.9. Προέλευση βιολογικών δειγμάτων που βρέθηκαν θετικά σε NTM ανά κλινική του ΠΝΛ, από ασθενείς της ευρύτερης περιοχής του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας.

Στην εικόνα 10.9 φαίνεται η προέλευση των βιολογικών δειγμάτων που βρέθηκαν θετικά σε NTM, από ασθενείς του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας. Η πλειοψηφία αυτών προήλθε από την πνευμονολογική και αντιφυματικό ιατρείο, την γαστρεντερολογική κλινική, την παθολογική κλινική και την ρευματολογική κλινική.

10.10 Είδη των NTM που απομονώθηκαν από ασθενείς από την ευρύτερη περιοχή του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας

Τα διαφορετικά είδη NTM που απομονώθηκαν από βιολογικό δείγμα ασθενών από την ευρύτερη περιοχή του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας παρουσιάζονται στην *εικόνα 10.10*.

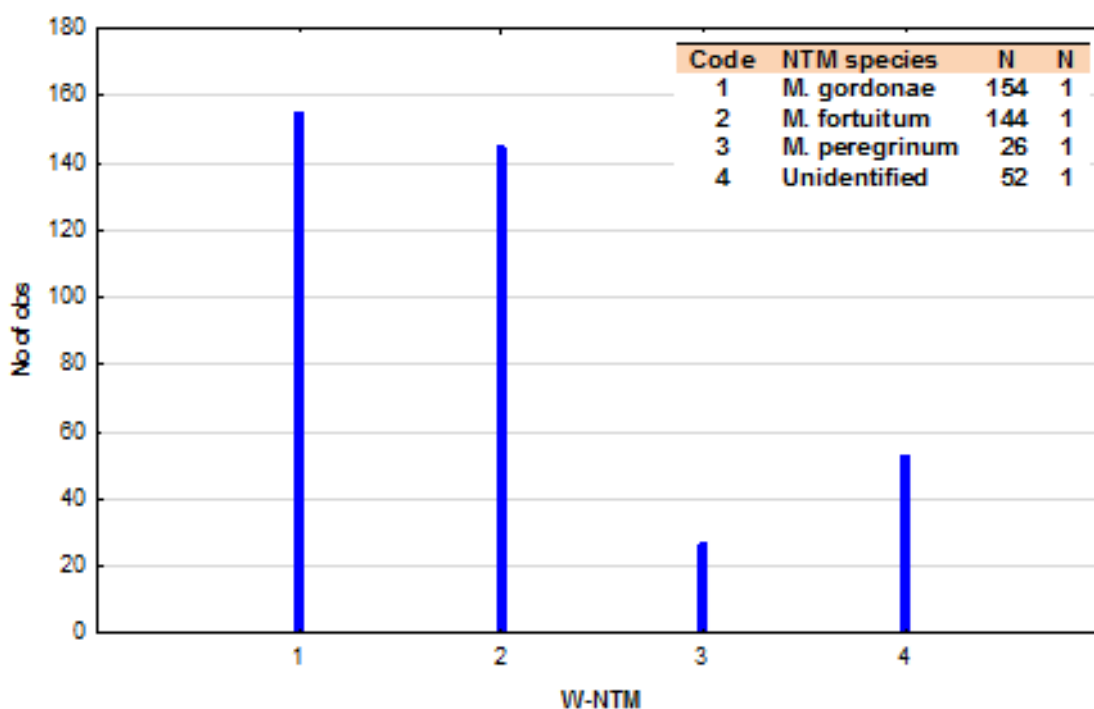


Εικόνα 10.10. Είδη των NTM που απομονώθηκαν από ασθενείς από την ευρύτερη περιοχή του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας.

Όπως φαίνεται στην *εικόνα 10.10*, τα συχνότερα απομονωμένα είδη NTM από τους ασθενείς του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας ήταν τα *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. intracellulare*, *M. chelonae*, *M. xenopi*, *M. avium*, ενώ ένας σημαντικός αριθμός αυτών δεν ταυτοποιήθηκε.

10.11 Είδη των NTM που απομονώθηκαν από δείγματα πόσιμου ύδατος

Τα είδη των NTM που απομονώθηκαν από δείγματα πόσιμου ύδατος, τα οποία συλλέχθηκαν από τις περιοχές μόνιμης κατοικίας των θετικών σε NTM ασθενών της ευρύτερης περιοχής του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας, παρουσιάζονται στην *εικόνα 10.11*.



Εικόνα 10.11. Συχνότητα των ειδών NTM που απομονώθηκαν από τα δείγματα πόσιμου ύδατος, από τις περιοχές μόνιμης κατοικίας των θετικών σε NTM ασθενών.

10.12 Φυσικοχημικός & Βιολογικός Έλεγχος Ποιότητας Πόσιμου Ύδατος

Στα μελετώμενα δείγματα πόσιμου ύδατος προσδιορίστηκαν οι εξής παράμετροι:

- ✚ Ηλεκτρική Αγωγιμότητα (EC, $\mu\text{S}/\text{cm } 20^\circ\text{C}$)
- ✚ Χρώμα (Color, Units PtCo)
- ✚ pH (πε – χα)
- ✚ Θολερότητα TUM, NTU)
- ✚ Ολική Σκληρότητα (TH, $\text{mg}/\text{L CaCO}_3$)
- ✚ Ολικά Διαλυμένα Στερεά (TDS, mg/L)
- ✚ Ιόντα Αμμωνίου (NH_4^+ , mg/L)
- ✚ Νιτρικά Ιόντα (NO_3^- , mg/L)
- ✚ Νιτρώδη Ιόντα NO_2^- , mg/L)
- ✚ Φωσφορικά Ιόντα (PO_4^{-3} , mg/L)
- ✚ Κάλιο (K, mg/L)
- ✚ Νάτριο Na, mg/L)
- ✚ Ασβέστιο (Ca, mg/L)
- ✚ Μαγνήσιο (Mg, mg/L)
- ✚ Μαγγάνιο (Mn, mg/L)
- ✚ Σίδηρος (Fe, mg/L)
- ✚ Χλωριόντα (Cl^- , mg/L)
- ✚ Θειικά ιόντα (SO_4^{-2} , mg/L)
- ✚ Ολικός Οργανικός Άνθρακας (TOC, mg/L)
- ✚ Ανόργανος Άνθρακας (IC, mg/L)
- ✚ Οξειδωσιμότητα OXID, $\text{mg}/\text{L O}_2$)
- ✚ Αλκαλικότητα (ALK, mg/L)

Τα αποτελέσματα του φυσικοχημικού και βιολογικού ελέγχου ποιότητας των δειγμάτων πόσιμου ύδατος παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.1.

Πίνακας 10.1. Αποτελέσματα των προσδιοριζόμενων φυσικοχημικών, βιολογικών και χημικών παραμέτρων ποιότητας πόσιμου ύδατος (*Mean* = Μέση τιμή, *SE* = τυπικό λάθος και *SD* = τυπική απόκλιση).

Παράμετρος	Μέγεθος	Τιμή	Παράμετρος	Μέγεθος	Τιμή
<u>Φυσικοί Παράμετροι Ποιότητας</u>					
EC ($\mu\text{S/cm } 20^{\circ}\text{C}$)	Mean	472.8	Color (Units PtCo)	Mean	1.04
	SE	5.2		SE	0.09
	SD	47.8		SD	0.83
pH	Mean	7.71	TUR (NTU)	Mean	1.75
	SE	0.02		SE	0.07
	SD	0.14		SD	0.64
TH (mg/L CaCO_3)	Mean	188.1	TDS (mg/L)	Mean	239.2
	SE	4.0		SE	6.3
	SD	36.8		SD	57.8
<u>Βιολογικοί Παράμετροι Ποιότητας</u>					
NH_4^+ (mg/L)	Mean	0.030	NO_3^- (mg/L)	Mean	8.2
	SE	0.004		SE	0.6
	SD	0.037		SD	5.6
NO_2^- (mg/L)	Mean	0.006	PO_4^{3-} (mg/L)	Mean	33.4
	SE	0.001		SE	5.0
	SD	0.010		SD	45.7
<u>Χημικοί Παράμετροι Ποιότητας</u>					
K (mg/L)	Mean	2.42	Ca (mg/L)	Mean	43.5
	SE	0.15		SE	0.8
	SD	1.35		SD	7.6
Na (mg/L)	Mean	23.6	Mg (mg/L)	Mean	20.47
	SE	0.4		SE	0.58
	SD	3.2		SD	5.29

Fe ($\mu\text{g/L}$)	Mean	16.5	Mn ($\mu\text{g/L}$)	Mean	9.09
	SE	1.8		SE	0.53
	SD	16.4		SD	4.82
Cl (mg/L)	Mean	12.73	SO₄⁻² (mg/L)	Mean	57.3
	SE	0.50		SE	2.4
	SD	4.57		SD	22.3
TOC (mg/L)	Mean	0.828	OXID (mg/L O_2)	Mean	0.639
	SE	0.029		SE	0.049
	SD	0.265		SD	0.449
IC (mg/L)	Mean	34.4	ALK (mg/L)	Mean	187.2
	SE	0.42		SE	3.0
	SD	3.84		SD	27.00

10.13 Μικροβιολογικός Έλεγχος Ποιότητας Πόσιμου Ύδατος

Για τη μελέτη της μικροβιολογικής ποιότητας των δειγμάτων πόσιμου ύδατος προσδιορίστηκαν οι παρακάτω μικροβιολογικοί παράμετροι:

- ✚ Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα στους 22°C (TBF 22°C)
- ✚ Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα στους 37°C (TBF 37°C)
- ✚ Ολικά Κολοβακτηριοειδή (Total coliforms)
- ✚ *Escherichia coli* (*E. coli*)
- ✚ Στρεπτόκοκκοι Κοπράνων (Enterococci Spp.)
- ✚ Θειοαναγωγικά Κλωστρίδια (*Cl. Perfringens*)

Τα αποτελέσματα του μικροβιολογικού ελέγχου ποιότητας των δειγμάτων πόσιμου ύδατος παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.2.

Πίνακας 10.2. Αποτελέσματα των προσδιοριζόμενων μικροβιολογικών παραμέτρων ποιότητας πόσιμου ύδατος [Επιτρεπόμενα όρια: (cfu/ml): TBF 22°C (100), TBF 37°C (20), (cfu/100ml): Total coliforms (0), *E. coli* (0), Enterococci Spp. (0), και *Cl. perfrigen* (0)]

Παράμετρος	Mean	Median
TBF 22°C	89	44
TBF 37°C	13	9
<i>Total coliforms</i>	0	0
<i>E. coli</i>	0	0
<i>Enterococci Spp.</i>	0	0
<i>Cl. perfringens</i>	0	0

Σημειώνεται ότι σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, όταν σε ένα δείγμα πόσιμου ύδατος καταμετρηθούν έως 8 αποικίες τότε το αποτέλεσμα θεωρείται μηδενικό, αρχή που ίσχυσε και στην παρούσα μελέτη.

10.14 Πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση

Η διερεύνηση της ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ των NTM που απομονώθηκαν από βιολογικό δείγμα (H-NTM) και αυτών που απομονώθηκαν από δείγματα πόσιμου ύδατος (W-NTM) πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια δύο χημειομετρικών μεθόδων ανάλυσης, της Cluster Analysis και της Factor Analysis.

Οι Cluster Analysis (CA) και η Factor Analysis (FA) επιτρέπουν την ανάλυση όλων των μελετώμενων παραμέτρων μαζί, ώστε να διερευνηθεί η ύπαρξη σχέσεων μεταξύ τους, κάτι που δεν μπορεί να κάνουν οι περιγραφικές στατιστικές μέθοδοι ανάλυσης (*Massart and Kaufman 1983; Ness et al. 2005; Papaioannou et al. 2009 & 2010; Dovrki et al. 2016; Papaioannou et al. 2009a,b; and 2010a,b; Poupard et al. 2002; Singh et al. 2005; Vanderginste et al. 1998; Vogt and Nagel 1992*).

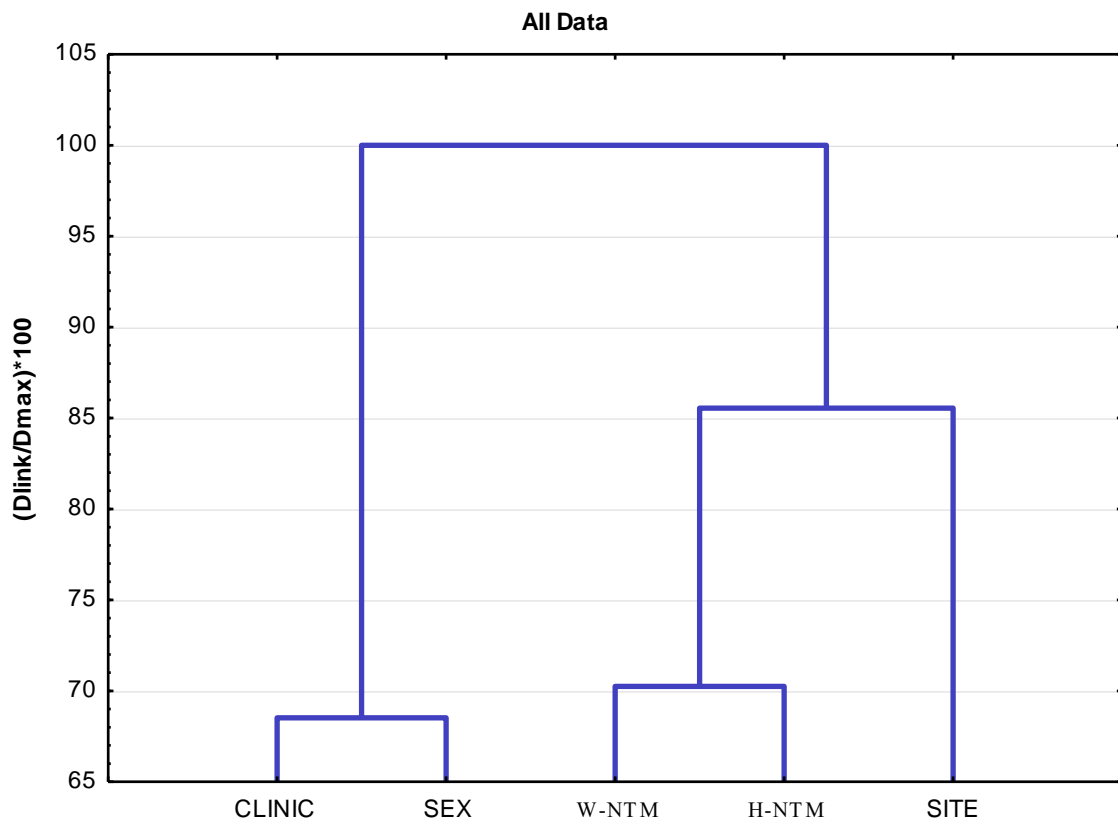
Επιπρόσθετα, λαμβάνοντας υπόψη τη βιβλιογραφία και τα διαθέσιμα αποτελέσματα της έρευνάς μας, δεν έχει υπάρξει μέχρι σήμερα κάποια άλλη εργασία που να αντιμετωπίζει με αυτό τον τρόπο τη διερεύνηση ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ H-NTM και W-NTM.

Με την εφαρμογή των δύο ανωτέρω αναφερόμενων πολυπαραγοντικών μεθόδων ανάλυσης (CA και FA), αναλύθηκαν τα δεδομένα που προέκυψαν από την μελέτη των θετικών σε NTM ασθενών από το νομαρχιακό διαμέρισμα Λάρισας και από τα δείγματα πόσιμου ύδατος που συλλέχτηκαν από τις περιοχές μόνιμης κατοικίας των θετικών σε NTM ασθενών, για να διερευνηθεί η ύπαρξη συσχετίσεων μεταξύ των μελετώμενων παραμέτρων. Από την ανάλυση προέκυψε ότι δεν υπάρχει καμία συσχέτιση μεταξύ των NTM (H-NTM και W-NTM) με τις φυσικοχημικές, βιολογικές και μικροβιολογικές παραμέτρους ποιότητας που προσδιορίστηκαν στο πόσιμο ύδωρ.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ H-NTM και W-NTM, με ανάλυση της βάσης δεδομένων που περιελάμβανε τις εξής παραμέτρους: «Περιοχή μόνιμης κατοικίας (SITE)», «Κλινική του ΠΝΛ από την οποία προήλθε το θετικό σε NTM βιολογικό δείγμα (CLINIC)», «το φύλο των θετικών σε NTM ασθενών (SEX)», «το είδος των NTM που απομονώθηκαν από ασθενείς (H-NTM)» και «το είδος των NTM που απομονώθηκαν από δείγματα πόσιμου ύδατος (W-NTM)».

10.14.1 Εφαρμογή της Cluster Analysis

Στην εικόνα 10.12 παρουσιάζεται το δενδρόγραμμα που παράγεται με εφαρμογή της Cluster Analysis στη βάση δεδομένων, η οποία περιέχει στοιχεία για την περιοχή μόνιμης κατοικίας (SITE), για την κλινική του ΠΝΛ από την οποία προήλθε το θετικό σε NTM βιολογικό δείγμα (CLINIC), το φύλο των θετικών σε NTM ασθενών (SEX), το είδος των NTM που απομονώθηκαν από ασθενείς (H-NTM) και το είδος των NTM που απομονώθηκαν από δείγματα πόσιμου ύδατος (W-NTM).



Εικόνα 10.12. Δενδρόγραμμα που παράγεται με εφαρμογή της Cluster Analysis (CLINIC = κλινική του ΠΝΛ από την οποία προήλθε το θετικό σε NTM βιολογικό δείγμα, SEX= φύλο των θετικών σε NTM ασθενών, W-NTM= είδος των NTM που απομονώθηκαν από δείγματα πόσιμου ύδατος, H-NTM= είδος των NTM που απομονώθηκαν από ασθενείς, SITE= περιοχή μόνιμης κατοικίας θετικών σε NTM ασθενών).

Από το δενδρόγραμμα της *εικόνας 10.12* παρατηρούμε ότι τα NTM που απομονώθηκαν από τους μελετώμενους ασθενείς (H-NTM) ομαδοποιούνται με τα NTM που βρέθηκαν στα δείγματα πόσιμου ύδατος (W-NTM) από τις περιοχές μόνιμης κατοικίας των θετικών σε NTM ασθενών. Αυτό σημαίνει ότι οι δύο αυτοί παράμετροι συσχετίζονται μεταξύ τους.

Όπως επίσης φαίνεται στο ίδιο δενδρόγραμμα, τα NTM που απομονώθηκαν από τους μελετώμενους ασθενείς και δείγματα πόσιμου ύδατος δεν συσχετίζονται με τις υπόλοιπες παραμέτρους.

10.14.2 Εφαρμογή της Factor Analysis

Με εφαρμογή της Factor Analysis (Principal Components Analysis method, Varimax normalized), παρήχθησαν δύο (2) νέοι παράγοντες (VFs), οι οποίοι παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.3.

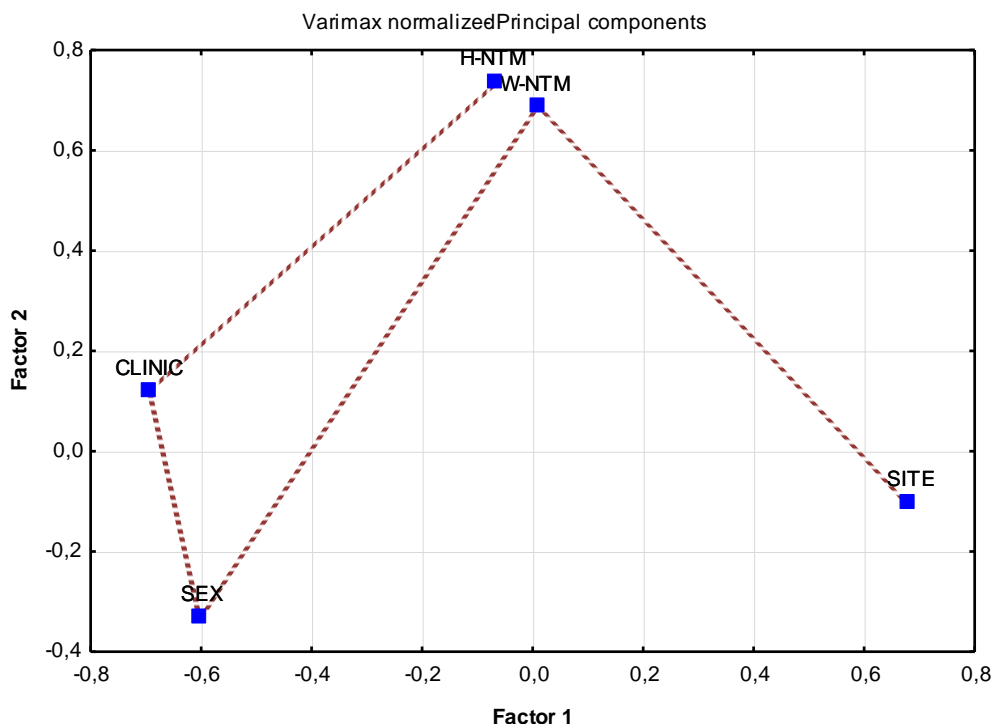
Πίνακας 10.3. Αποτελέσματα (VFs, L) της Factor Analysis (παράμετροι με L μεγαλύτερο ή ίσο με 0.5 θεωρείται ότι συσχετίζονται).

Παράμετρος	VF1	VF2
SITE	-0,679870	-0,113640
SEX	0,606698	-0,317903
CLINIC	0,689608	0,134536
H-NTM	0,051771	0,739581
W-NTM	-0,022483	0,687424
% Total Variance	26.2	23.0

Η συσχέτιση μιας παραμέτρου με έναν VF χαρακτηρίζεται ως "ισχυρή", "μέτρια" και "ασθενής", ανάλογα με την απόλυτη τιμή (L) που η παράμετρος έχει στο εξαγόμενο μοντέλο. Έτσι, εάν η απόλυτη τιμή L είναι μεγαλύτερη του 0.75 τότε η συσχέτιση χαρακτηρίζεται ως ισχυρή, εάν είναι μεταξύ (0,75 - 0,50) τότε χαρακτηρίζεται ως μέτρια και εάν είναι μεταξύ (0,50 - 0,30) τότε χαρακτηρίζεται ως ασθενής. (*Liu et al. 2003; Singh et al. 2005*).

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 10.3, το % ποσοστό της συνολικής διακύμανσης που περιγράφει το παραγόμενο μοντέλο είναι μικρό (49.2%), γεγονός αυτό δείχνει ότι το μοντέλο αυτό ίσως έχει περιορισμένη ισχύ.

Η γραφική παράσταση των παραγόντων VF1 και VF2 στο χώρο φαίνεται στην *εικόνα 10.13*.



Εικόνα 10.13. Γραφική παράσταση των παραγόντων VF1 και VF2 στον χώρο.

Από την *εικόνα 10.13* παρατηρούμε ότι οι παράμετροι H-NTM και NTM βρίσκονται κοντά ο ένας στον άλλο στον χώρο, γεγονός που δηλώνει την αλληλοσυσχέτισή τους.

Επιπρόσθετα, παρατηρούμε ότι και με εφαρμογή της μεθόδου της Factor Analysis, τα NTM που απομονώθηκαν από τους ασθενείς και αυτά που βρέθηκαν στο πόσιμο ύδωρ δε φαίνεται να συσχετίζονται με τις υπόλοιπες παραμέτρους, δεδομένου ότι βρίσκονται μακριά στον χώρο από αυτές (*εικόνα 10.13*).

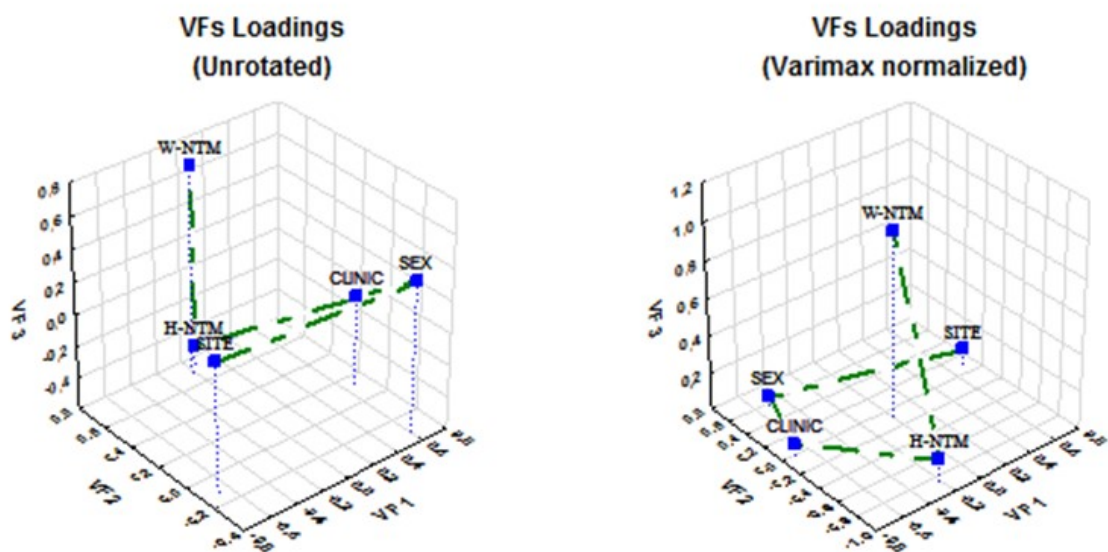
Λαμβάνοντας υπόψη ότι το ανωτέρω μοντέλο δεν είναι ισχυρό, πραγματοποιήθηκε η ίδια ανάλυση με εφαρμογή της Factor Analysis και την εξαγωγή τριών (3) νέων παραγόντων (VFs), (Πίνακας 10.4).

Πίνακας 10.4. VFs και Factor Loadings (Un = Unrotated and Var = Varimax normalized), Eigenvalues, και συνολική διακύμανση (%).

Parameter	VF1 (Un)	VF1 (Var)	VF2 (Un)	VF2 (Var)	VF3 (Un)	VF3 (Var)
SITE	-0,679870	0,708935	-0,113640	0,094491	0,208499	0,084207
SEX	0,606698	-0,512505	-0,317903	0,566237	0,343027	0,059385
CLINIC	0,689608	-0,701011	0,134536	-0,000026	-0,037253	0,060258
H-NTM	0,051771	-0,208472	0,739581	-0,848676	-0,476127	0,112456
W-NTM	-0,022483	0,012976	0,687424	-0,070167	0,712645	0,987841
Eigenvalue	1,309051		1,151609		0,897088	
Total variance (%)	26,18101		49,21319		67,15494	

Όπως βλέπουμε στον Πίνακα 10.4, το νέο μοντέλο είναι σαφώς ισχυρότερο του προηγούμενου, δεδομένου ότι εξηγεί το 67.2% περίπου της συνολικής διακύμανσης.

Η γραφική παράσταση των VFs στον χώρο παρουσιάζεται στην *εικόνα 10.14* που ακολουθεί.



Εικόνα 10.14. Γραφική παράσταση των VF1 συναρτήσεων των VF2 και VF3.

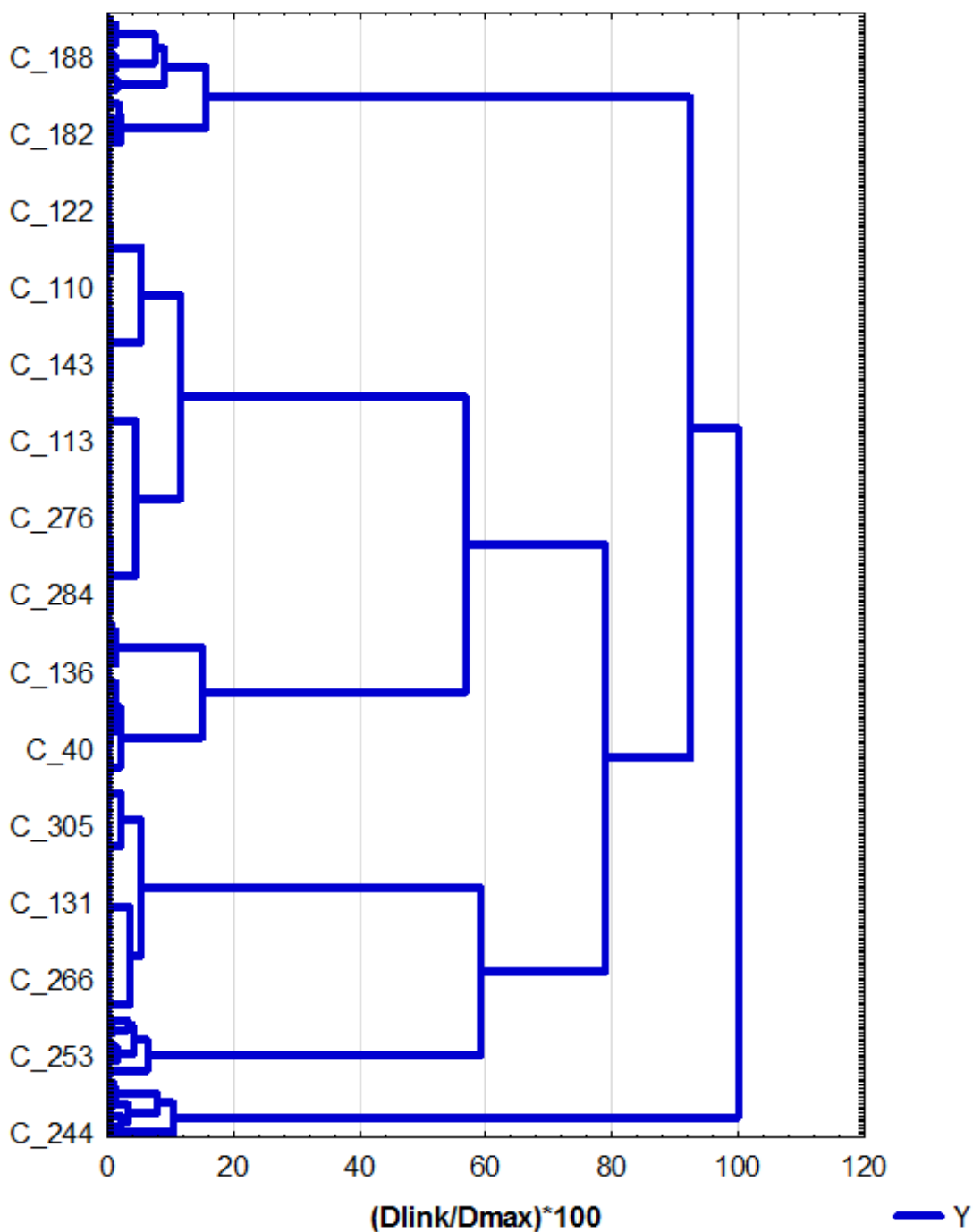
Και σε αυτή την περίπτωση, όπως φαίνεται στην *εικόνα 10.14*, τα άτυπα μυκοβακτηρίδια που απομονώθηκαν από τους μελετώμενους ασθενείς και αυτά που απομονώθηκαν από τα δείγματα πόσιμου ύδατος από τις περιοχές μόνιμης κατοικίας τους (H-NTM και W-NTM, αντίστοιχα), παριστάνονται κοντά στον χώρο, γεγονός που δηλώνει ότι αυτά συσχετίζονται μεταξύ τους.

Επίσης, στην ίδια εικόνα, βλέπουμε ότι δεν παρατηρείται συσχέτιση μεταξύ των NTM και των υπόλοιπων μελετώμενων παραμέτρων, αποτέλεσμα που συμφωνεί με αυτό της CA.

Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα, παρατηρούμε μία πλήρη συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων που εξάγονται με εφαρμογή της CA και αυτών που εξάγονται με εφαρμογή της FA. Το γεγονός αυτό ενισχύει την ορθότητα της ανάλυσης και των αποτελεσμάτων αυτής, και μας επιτρέπει να ισχυριστούμε με βεβαιότητα ότι τα παραγόμενα μοντέλα είναι ορθά.

10.14.3 Εφαρμογή Cluster Analysis για την ομαδοποίηση των μελετώμενων ασθενών

Με εφαρμογή της Cluster Analysis, παράγεται το δενδρόγραμμα της εικόνας 10.15, στο οποίο βλέπουμε την ομαδοποίηση των μελετώμενων ασθενών.



Εικόνα 10.15. Δενδρόγραμμα ομαδοποίησης μελετώμενων ασθενών.

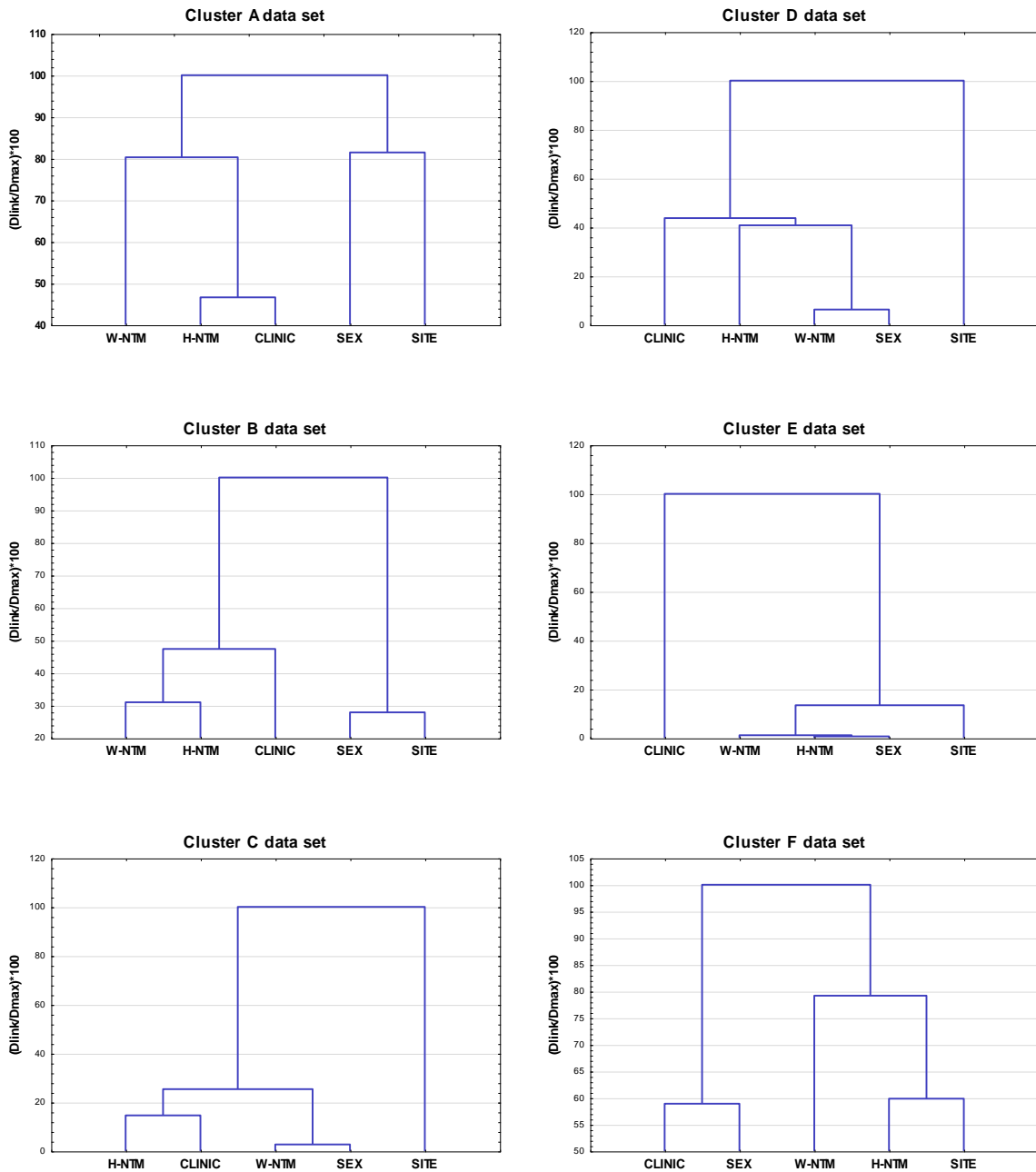
Σύμφωνα με το δενδρόγραμμα της *εικόνας 10.15*, οι μελετώμενοι ασθενείς ομαδοποιούνται σε έξι (6) ομάδες – clusters, (με βάση την περιοχή μόνιμης κατοικίας (SITE), την κλινική του ΠΝΛ από την οποία προήλθε το θετικό σε NTM βιολογικό δείγμα (CLINIC), το φύλο των θετικών σε NTM ασθενών (SEX), το είδος των NTM που απομονώθηκαν από ασθενείς (H-NTM) και το είδος των NTM που απομονώθηκαν από δείγματα πόσιμου ύδατος (W-NTM), ως εξής:

- ✚ **Cluster A:** 20 περιπτώσεις
- ✚ **Cluster B:** 116 περιπτώσεις
- ✚ **Cluster C:** 79 περιπτώσεις
- ✚ **Cluster D:** 104 περιπτώσεις
- ✚ **Cluster E:** 19 περιπτώσεις
- ✚ **Cluster F:** 29 περιπτώσεις

10.14.4 Εφαρμογή της Cluster Analysis στις επιμέρους ομάδες (A – F)

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η Cluster Analysis στις επιμέρους ομάδες που προέκυψαν με εφαρμογή της Cluster Analysis σε όλες τις μελετώμενες περιπτώσεις.

Στην *εικόνα 10.16* παρουσιάζονται τα αντίστοιχα δενδρογράμματα, στα οποία φαίνεται η ομαδοποίηση των μελετώμενων παραμέτρων.



Εικόνα 10.16. Δενδρογράμματα (Ward's method with squared Euclidean distance measure), για κάθε ομάδα – cluster (A-F).

Στον Πίνακα 10.5 παρουσιάζονται οι παράμετροι που περιλαμβάνονται σε κάθε παραγόμενο cluster, με εφαρμογή της Cluster Analysis στις ομάδες (A-F).

Πίνακας 10.5. Παράμετροι που περιλαμβάνονται σε κάθε παραγόμενο cluster, με εφαρμογή της Cluster Analysis στις ομάδες (A-F).

Cluster	Data set of Cluster A	Data set of Cluster B	Data set of Cluster C	Data set of Cluster D	Data set of Cluster E	Data set of Cluster F
Cluster 1	SEX and SITE	SEX and SITE	SITE	SITE	CLINIC	CLINIC and SEX
Cluster 2	CLINIC, H-NTM and W-NTM	CLINIC, H-NTM and W-NTM	SEX, CLINIC, H-NTM and W-NTM	SEX, CLINIC, H-NTM and W-NTM	SITE, SEX, H-NTM and W-NTM	SITE, H-NTM and W-NTM

10.14.5 Εφαρμογή της Factor Analysis στις επιμέρους ομάδες (A – F)

Ακολούθως εφαρμόστηκε η Factor Analysis στις επιμέρους ομάδες που προέκυψαν με εφαρμογή της Cluster Analysis σε όλες τις μελετώμενες περιπτώσεις.

Οι παραγόμενοι νέοι παράγοντες (VFs) παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.6.

Πίνακας 10.6. Eigenvalues (διακύμανση (%)) και παράμετροι (L = loading value, Varimax normalized) ανά VF για κάθε μελετώμενη ομάδα, και η ολική διακύμανση (%).

Data set	VF1	VF2	VF3	Total variance (%)
Cluster A	1.479611 (29.60%)	1.330771 (26.62%)	1.076510 (21.53%)	77.75%
	CLINIC (L=0.83)	SITE (L=0.78)	SEX (L=-0.96)	
	H-NTM (L=0.84)	H-NTM (L=0.31)		
	W-NTM (L=0.16)	W-NTM (L=0.75)		
Cluster B	1.269770 (25.40%)	1.089206 (21.78%)	1.039053 (20.78%)	67.96%
	SITE (L=0.87)			
	CLINIC (L=-0.56)	CLINIC (L=0.65)	SEX (L=-0.86)	
	H-NTM (L=0.17)	W-NTM (L=0.87)	H-NTM (L=0.51)	
	W-NTM (L=0.19)			
Cluster C	1.522045 (30.44%)	1.118302 (22.37%)	0.979744 (19.60%)	72.40%
	SITE (L=-0.91)	CLINIC (L=0.77)	SEX (L=0.53)	
	SEX (L=-0.66)	W-NTM (L=-0.76)	H-NTM (L=0.93)	
Cluster D	1.262541 (25.25%)	1.019278 (20.39%)	0.982466 (19.65%)	65.29%
	SITE (L=0.55)	SEX (L=0.84)	H-NTM (L=0.92)	
	CLINIC (L=-0.86)	W-NTM (L=0.57)	W-NTM (L=0.27)	
Cluster E	1.694371 (33.89%)	1.067030 (21.34%)	1.040474 (20.81%)	76.04%
	SITE (L=0.70)			
	SEX (L=-0.87)	H-NTM (L=-0.95)	CLINIC (L=-0.89)	
	W-NTM (L=0.54)			

	1.456479 (29.13%)	1.103681 (22.07%)	1.046451 (20.93%)	
Cluster F	SITE (L=0.85)			72.13%
	SEX (L=-0.65)	H-NTM (L=0.56)	CLINIC (L=-0.90)	
	H-NTM (L=0.38)			
	W-NTM (L=0.15)			

10.14.6 Εφαρμογή Cluster Analysis ((K-Means Clustering))

Στόχος της k-means Cluster Analysis είναι να βρεθεί η βέλτιστη "διχοτόμηση" για τη διαίρεση ενός αριθμού αντικειμένων σε k ομάδες. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται με στόχο την ελαχιστοποίηση της διακύμανσης εντός του cluster και την μεγιστοποίησή της μεταξύ των παραγόμενων clusters.

Η k-means Cluster Analysis εφαρμόστηκε σε όλες τις μελετώμενες περιπτώσεις, ώστε να εντοπίσει τις σημαντικότερες παραμέτρους σε κάθε παραγόμενο cluster. Τα αποτελέσματά της παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.7.

Πίνακας 10.7. Ανάλυση της διακύμανσης.

Parameter	Between - SS	df	Within - SS	df	F	p
SITE	0,0346	1	365,7365	363	0,034	0,853007
SEX	0,7539	1	364,2838	363	0,751	0,386662
CLINIC	2,3061	1	362,6602	363	2,308	0,129561
H-NTM	9,3231	1	355,5730	363	9,518	0,002191
W-NTM	270,8725	1	90,0575	363	1091,821	0,000000

Όπως φαίνεται από τα δεδομένα του Πίνακα 10.7, οι σημαντικότερες παράμετροι είναι τα H-NTM και W-NTM, ενώ τα cluster που παράγονται είναι:

1st Cluster: "SITE", "H-NTM" and "W-NTM".

2nd Cluster: "SEX" and "CLINIC"

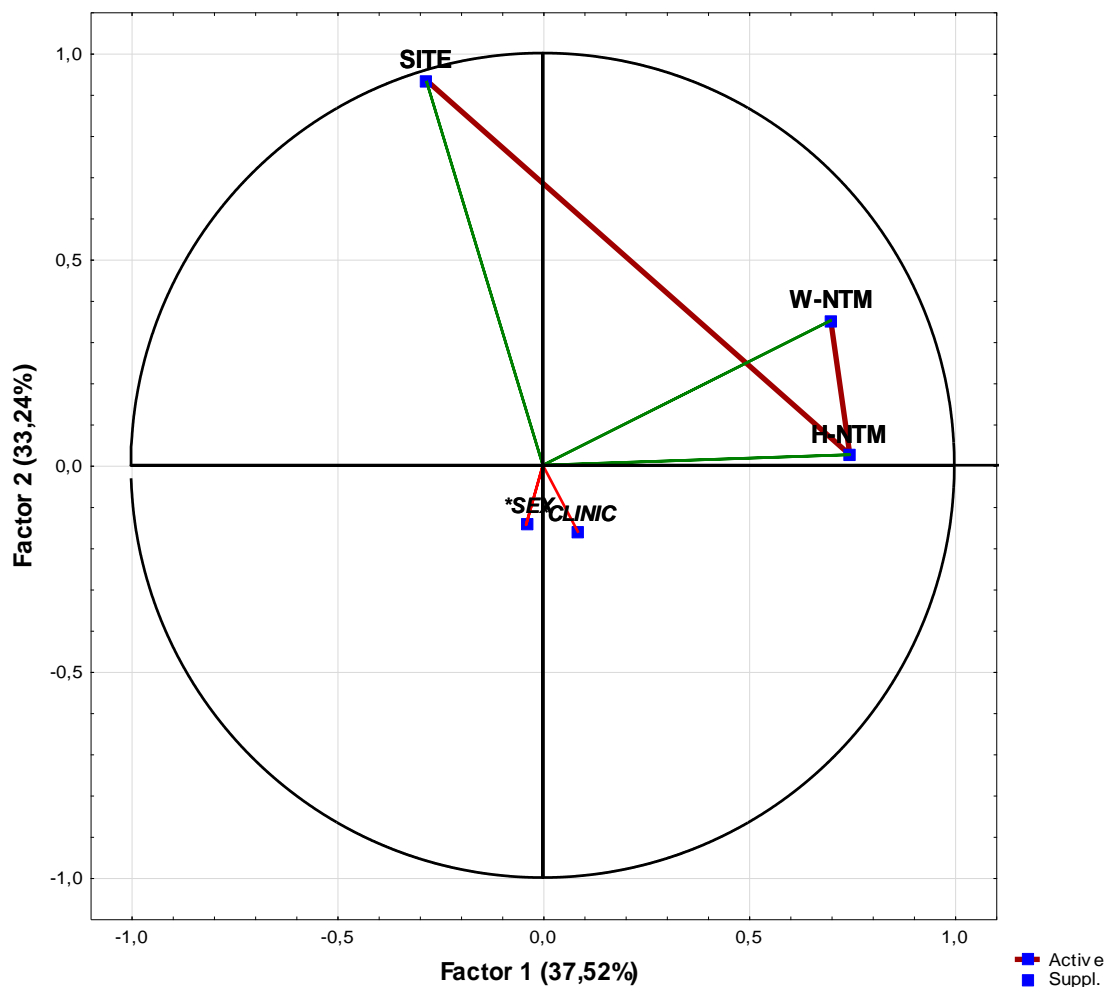
10.14.7 Εφαρμογή Factor Analysis, με βάση τα αποτελέσματα της k-means Cluster Analysis

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της k-means Cluster Analysis, εφαρμόστηκε η Factor Analysis θεωρώντας ως ενεργές παραμέτρους τις H-NTM και W-NTM και ως συμπληρωματικές τις υπόλοιπες παραμέτρους. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.8.

Πίνακας 10.8. Εξαγωγή νέων παραγόντων για τις μελετώμενες παραμέτρους με βάση τις συσχετίσεις μεταξύ τους.

Parameter	Factor 1	Factor 2
SITE	-0,283370	0,934452
H-NTM	0,745749	0,025676
W-NTM	0,699455	0,351200
*SEX	-0,040511	-0,144500
*CLINIC	0,086555	-0,163950
Eigenvalue	1,125678	0,997201
Total variance (%)	37,52	70,76

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 10.8, παράγονται δύο νέοι παράγοντες, ο Factor 1, στον οποίο υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων H-NTM και W-NTM και ο Factor 2,, στον οποίο παρατηρείται μία ασθενή συσχέτιση μεταξύ της παραμέτρου “SITE” και της παραμέτρου “W-NTM”. Η γραφική παράσταση των παραγόντων στον χώρο δίνεται στην *εικόνα 10.17*.



Εικόνα 10.17. Γραφική απεικόνιση των δύο παραγόντων και των παραμέτρων που περιλαμβάνουν στον χώρο.

Από την *εικόνα 10.17* φαίνεται και πάλι ότι οι παράμετροι H-NTM και W-NTM είναι κοντά ο ένας στον άλλο στον χώρο και άρα συσχετίζονται.

Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί πλήρως με τα προηγούμενα, ενισχύοντας ακόμη περισσότερο την ορθότητά του, ότι δηλαδή τα NTM που απομονώθηκαν από τους ασθενείς συσχετίζονται με αυτά που απομονώθηκαν από δείγματα πόσιμοι ύδατος που συλλέχθηκαν από τις περιοχές μόνιμης κατοικίας των θετικών σε NTM ασθενών.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κεφάλαιο 11^ο – Συζήτηση

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος, μόνο λίγες σποραδικές μελέτες έχουν διερευνήσει τον τρόπο που τα μη-φυματιώδη μυκοβακτηρίδια μεταδίδονται στον άνθρωπο. Συγκεκριμένα στην Ελλάδα, υπάρχουν μόνο δύο μελέτες στις οποίες απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν μη-φυματιώδη μυκοβακτηρίδια από δείγματα πόσιμου νερού, στην ίδια γεωγραφική περιοχή, στην πόλη της Πάτρας (*Vantarakis et al. 1998; Tsintzou et al. 2000*).

Οι παραπάνω μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί την περίοδο 1994 - 1997. Στις εργασίες αυτές μελετήθηκε η ύπαρξη NTM σε δείγματα πόσιμου νερού. Αναλύθηκαν δείγματα πόσιμου ύδατος από πέντε διαφορετικά νοσοκομεία της Πάτρας και από το σύστημα διανομής νερού της πόλης της Πάτρας. Σε αμφότερες τις μελέτες, κανένα δείγμα πόσιμου ύδατος που βρέθηκε θετικό NTM δεν βρέθηκε θετικό σε άλλα βακτήρια, όπως οι εντερόκοκκοι. Το ίδιο συνέβη και στην παρούσα μελέτη, όπου δεν υπάρχει δείγμα πόσιμου ύδατος θετικό σε NTM που να περιέχει άλλα κοπρανώδη βακτήρια. Επιπλέον, τα αποτελέσματα των δύο προαναφερθέντων ερευνών σε σχέση με την επίδραση του υπολειμματικού χλωρίου στην παρουσία NTM σε δείγματα πόσιμου ύδατος, επιβεβαιώθηκαν στην παρούσα μελέτη. Αυτό ενισχύει την άποψη ότι συγκέντρωση υπολειμματικού χλωρίου μεγαλύτερη από 1 mg L^{-1} είναι αρκετή για την εξάλειψη των NTM.

Από τις ανωτέρω αναφερόμενες μελέτες που διεξήχθησαν σε νοσοκομεία, τα NTM που απομονώθηκαν ήταν *M. flavescens*, *M. gordonae*, *M. chelonae* και *M. Terraе*, ενώ από το σύστημα ύδρευσης της πόλης της Πάτρας ήταν τα ανωτέρω τέσσερα και επιπλέον τα *M fortuitum*, *M kansasii* και *M phlei*. Επίσης, και στις δύο μελέτες, κάποια NTM που απομονώθηκαν από τα δείγματα πόσιμου ύδατος δεν ταυτοποιήθηκαν. Στην παρούσα μελέτη, τα NTM που απομονώθηκαν ήταν τα *M. gordonae*, *M fortuitum* και *M peregrinum*, ενώ ένας σημαντικός αριθμός NTM που απομονώθηκαν από τα δείγματα πόσιμου ύδατος δεν ταυτοποιήθηκε. Το ποσοστό των δειγμάτων πόσιμου ύδατος που βρέθηκαν θετικά σε NTM ήταν 11,2%, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά στις άλλες δύο ανωτέρω αναφερόμενες μελέτες ήταν 15,6% και 21,3%, αντίστοιχα. Έτσι,

στην παρούσα μελέτη, το ποσοστό των θετικών σε NTM δειγμάτων ήταν μικρότερο σε σύγκριση με τα ευρήματα άλλων ερευνητών ([Vantarakis et al. 1998](#); [Tsintzou et al. 2000](#)).

Επιπλέον, υπάρχουν δύο άλλες επιδημιολογικές μελέτες για τα NTM, μια στην κεντρική Ελλάδα και μία δεύτερη στην Αθήνα ([Gerogianni et al. 2008](#); [Panagiotou et al. 2014](#)). Και στις δύο εργασίες αναφέρεται ότι ένας πιθανός τρόπος μετάδοσης των NTM στους ανθρώπους είναι το πόσιμο ύδωρ. Τα άτυπα μυκοβακτηρίδια *M fortuitum*, *M gordonae*, *M peregrinum*, *M chelonae*, απομονώθηκαν από ασθενείς με πνευμονολογικά προβλήματα υγείας, καθώς και σε δείγματα νερού στις αναφερθείσες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην Ελλάδα. Τα άτυπα μυκοβακτηρίδια *M flavescens*, *M terrae*, *M kansasii* και *M phlei* δεν απομονώθηκαν από ασθενείς, στις αναφερόμενες μελέτες που διεξήχθησαν στην Ελλάδα. Επιπρόσθετα, υπάρχει μία ακόμη μελέτη που εξετάζει την κλινική σημασία και την αντοχή των NTM στα αντιβιοτικά, η οποία πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς στην Κρήτη ([Gitti et al. 2011](#)).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι τα NTM διασπείρονται ευρέως στο περιβάλλον (εικόνα 10.7), όπως άλλωστε αναφέρουν και άλλες σχετικές βιβλιογραφικές μελέτες, στις οποίες επίσης αναφέρεται ότι η κατανομή των διαφορετικών ειδών NTM ποικίλλει ανά γεωγραφική περιοχή. Έτσι, οι ερευνητικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην κεντρική Ελλάδα, την περίοδο 2004-2006, έδειξαν ότι τα NTM που απομονώνονται συχνότερα σε ασθενείς ήταν τα *M. fortuitum* (51,6%) και *M. peregrinum* (34,5%), ενώ το *M. avium* απομονώθηκε μόνο στο 6,7% των δειγμάτων πόσιμου ύδατος. Στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Αθήνα, για την περίοδο 2007-2013, τα NTM που απομονώθηκαν ήταν τα *M. avium* (13%), *M. intracellulare* (10%), *M. gordonae* (14%) και *M. fortuitum* (12%). Τέλος, στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Κρήτη, την περίοδο 2000-2009, τα πιο κοινά NTM είδη που απομονώθηκαν από ασθενείς ήταν το σύμπλεγμα MAC (*M. avium* και *M. intracellulare*) (8,6%) και *M. kansasii* (3,4%). Στη παρούσα μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην ευρύτερη περιοχή της Λάρισας, τα πιο κοινά είδη NTM που απομονώθηκαν ήταν τα *M. fortuitum* (30,8%), *M. gordonae* (22,7%) και *M. peregrinum* (12%), ενώ το ποσοστό των *M. avium* και *M. intracellulare* ήταν 2,1% και 1,8%, αντίστοιχα.

Πρόσφατες μελέτες στις ΗΠΑ, την Ιαπωνία και άλλες χώρες σε όλο τον κόσμο δείχνουν ότι τα πιο συχνά αναφερόμενα είδη NTM που μολύνουν κυρίως μεσήλικες ή ηλικιωμένους ασθενείς είναι τα *M. avium*, *M. fortuitum* και *M. kansasii* (Gerogianni et al. 2008).

Οι διαφορές που παρατηρούνται στα αποτελέσματα των διαφόρων ερευνών οφείλονται κυρίως στις διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση και ταυτοποίηση των διαφορετικών ειδών NTM και στη διαφορετική σύνθεση του μελετώμενου πληθυσμού των ασθενών, καθώς και στις διαφορές που υπάρχουν στις περιβαλλοντικές συνθήκες, οι οποίες μπορεί να ευνοούν την ανάπτυξη διαφορετικών ειδών NTM στις δεξαμενές και στο σύστημα ύδρευσης πόσιμου ύδατος, στο οποίο εκτέθηκαν οι μελετώμενοι ασθενείς. Αξίζει να σημειωθεί ότι οποιοδήποτε είδος NTM θα μπορούσε να βρεθεί στο πόσιμο νερό που λαμβάνεται από τη βρύση. Ωστόσο, στην παρούσα εργασία δεν απομονώθηκαν *M. avium* και *M. xenopi* από τα δείγματα του πόσιμου ύδατος που μελετήθηκαν, πιθανώς επειδή η θερμοκρασία των δειγμάτων αυτών δεν ήταν αρκετά υψηλή για να επιτρέψει τον πολλαπλασιασμό αυτών των θερμοφίλων μικροοργανισμών.

Όπως προαναφέρθηκε, ο κύριος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί εάν υπάρχουν συσχετίσεις μεταξύ των NTM που απομονώθηκαν από δείγματα πόσιμου ύδατος και αυτών που απομονώθηκαν από ασθενείς που διαμένουν στην ευρύτερη περιοχή της Λάρισας. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκαν 367 ασθενείς (67% ήταν άνδρες) που νοσηλεύτηκαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας και βρέθηκαν θετικοί σε NTM, κατά τη διάρκεια της περιόδου 2003-2013. Η μόνιμη κατοικία των ασθενών αυτών ήταν η ευρύτερη περιοχή της Λάρισας, και συγκεκριμένα 30 γεωγραφικές περιοχές που παρουσιάζονται στην *εικόνα 10.6* και *εικόνα 10.7*. Το 86,6% των θετικών σε NTM ασθενών είχαν ως μόνιμη κατοικία την πόλη της Λάρισας, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό κατανέμεται σε όλες τις περιοχές του Νομαρχιακού Διαμερίσματος της Λάρισας. Όπως έχουν αποδείξει προηγούμενες βιβλιογραφικές μελέτες, τα NTM μπορεί να αποικίσουν, να επιβιώνουν και να εξακολουθούν να υπάρχουν, να αναπτύσσονται και να πολλαπλασιάζονται στο νερό της βρύσης για μεγάλες χρονικές περιόδους. Έτσι, λοιμώξεις που οφείλονται σε NTM (π.χ. λοίμωξη των πνευμόνων)

εμφανίστηκαν πιο συχνά σε ασθενείς που ζούσαν σε πόλεις παρά σε μη αστικές περιοχές.

Τα δείγματα πόσιμου ύδατος συλλέχθηκαν από τις ανωτέρω 30 περιοχές και από τις κεντρικές δεξαμενές του συστήματος ύδρευσης της πόλης της Λάρισας και εξετάστηκαν για την ύπαρξη NTM, για το χρονικό διάστημα 2010-2013. Το ποσοστό των θετικών σε NTM δειγμάτων ήταν 11,2%. Το παραπάνω ποσοστό είναι χαμηλότερο σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποσοστά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία ([Dantec et al. 2002](#); [Kamala et al. 1994a,b](#); [Neumann et al. 1997](#); [Tsintzou et al. 2000](#); [Torvinen et al. 2004](#); [Vantarakis et al. 1998](#)). Αυτό μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική μέθοδο απομόνωσης που χρησιμοποιήθηκε, διότι υπάρχουν δυσκολίες στην απομόνωση και ταυτοποίηση των NTM. Στην παρούσα μελέτη, η μέθοδος ταυτοποίησης που εφαρμόστηκε ήταν σε θέση να ταυτοποιήσει ορισμένα μόνο είδη NTM είδη (μόνο 15 από αυτά).

Όπως φαίνεται στην [εικόνα 10.9](#), η προέλευση των βιολογικών δειγμάτων που μελετήθηκαν ήταν κυρίως από την πνευμονολογική και παθολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Η προέλευση των μελετώμενων βιολογικών δειγμάτων και σε άλλες βιβλιογραφικές μελέτες είναι παρόμοια ([Archibald and Jarvis 2011](#); [Billinger et al. 2009](#); [Chou et al. 2014](#); [Gerogianni et al. 2008](#); [Iseman and Marras 2008](#); [Maekawa et al. 2011](#); [Moore et al. 2010](#); [Panagiotou et al. 2014](#); [Primm et al 2004](#); [Winthrop 2012](#)).

Συνολικά, μελετήθηκαν 367 ασθενείς που διέμεναν στη διοικητική περιφέρεια της Λάρισας και βρέθηκαν θετικοί σε NTM. Από αυτούς απομονώθηκαν 383 είδη NTM, διότι σε πολλές περιπτώσεις (ασθενείς) απομονώθηκαν περισσότερα από ένα είδος NTM από έναν μόνο ασθενή. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε 8 ασθενείς απομονώθηκε μαζί με κάποιο είδος NTM και το μυκοβακτηριδίο της φυματίωσης ([εικόνα 10.10](#)). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, το γεγονός αυτό αποτελεί μία αιτία για ψευδώς θετική ή αρνητική διάγνωση της φυματίωσης ([Gerogianni et al. 2008](#)).

Στα δείγματα πόσιμου ύδατος πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των φυσικοχημικών, βιολογικών και μικροβιολογικών παραμέτρων, σύμφωνα με την ευρωπαϊκή οδηγία 98/83, ώστε να ελεγχτεί η ποιότητά τους. Όπως φαίνεται από τους Πίνακες 10.1 και 10.2, η φυσικοχημική και μικροβιολογική ποιότητα των

δειγμάτων πόσιμου ύδατος που μελετήθηκαν ήταν μέσα στα όρια των παραμετρικών τιμών ανά παράμετρο, σύμφωνα με την ευρωπαϊκή οδηγία 98/83.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η ύπαρξη συσχετίσεων μεταξύ των NTM και των υπολοίπων παραμέτρων ποιότητας του πόσιμου ύδατος με εφαρμογή πολυπαραγοντικών μεθόδων ανάλυσης, όπως η Cluster Analysis και η FA. Τόσο η εφαρμογή της CA όσο και της FA δεν έδειξε να υπάρχει συσχέτιση των NTM με κάποια από τις υπόλοιπες παραμέτρους ποιότητας.

Στη συνέχεια οι ίδιες πολυπαραγοντικές μέθοδοι εφαρμόστηκαν για να διερευνήσουν την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ NTM σε ασθενείς και στο πόσιμο ύδωρ. Η παρούσα εργασία είναι η πρώτη στη βιβλιογραφία, στην οποία εφαρμόστηκαν πολυπαραγοντικές μέθοδοι ανάλυσης (Cluster Analysis και Factor Analysis) για τον εντοπισμό πιθανών συσχετίσεων μεταξύ της παρουσίας των NTM σε ασθενείς (H-NTM) και NTM στο πόσιμο ύδωρ (W-NTM) από τη περιοχή της μόνιμης κατοικίας τους.

Με εφαρμογή της Cluster Analysis (CA), το παραγόμενο δενδρόγραμμα (*εικόνα 10.12*), δείχνει ότι τα NTM που απομονώθηκαν από τους μελετώμενους ασθενείς (H-NTM) συσχετίζονται με εκείνα που απομονώθηκαν από δείγματα πόσιμου νερού (W-NTM) από την περιοχή της μόνιμης κατοικίας των θετικών σε NTM ασθενών. Όπως βλέπουμε στην εν λόγω *εικόνα*, τα H-NTM και W-NTM ομαδοποιούνται στο ίδιο cluster, γεγονός που δηλώνει ότι συσχετίζονται.

Ακολούθως, στα ίδια δεδομένα εφαρμόστηκε η Factor Analysis. Τα αποτελέσματα της FA επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα της CA, ενισχύοντας την εγκυρότητά τους. Όταν οι μελετώμενοι παράμετροι βρίσκονται πιο κοντά ο ένας στον άλλο στο χώρο, τότε η ανάλυση δείχνει ότι αυτοί είναι πιο στενά συνδεδεμένοι μεταξύ τους. Έτσι, τόσο στην *εικόνα 10.13* και όσο και στην *εικόνα 10.14*, φαίνεται ότι οι παράμετροι «N-NTM» και «W-NTM» πράγματι συσχετίζονται μεταξύ τους, επειδή βρίσκονται κοντά ο ένας τον άλλο στο χώρο.

Στη συνέχεια, με εφαρμογή της CA, οι θετικοί σε NTM ασθενείς ομαδοποιούνται σε 6 κύριες ομάδες (*εικόνα 15*), με βάση τα κοινά χαρακτηριστικά τους [την περιοχή μόνιμης κατοικίας (SITE), την κλινική του ΠΝΛ από την οποία προήλθε το θετικό σε NTM βιολογικό δείγμα (CLINIC), το φύλο των θετικών σε NTM ασθενών (SEX), το είδος των NTM που απομονώθηκαν από ασθενείς (H-NTM) και το είδος των NTM που

απομονώθηκαν από δείγματα πόσιμου ύδατος (W-NTM)].

Με εφαρμογή της CA σε κάθε ομάδα θετικών σε NTM ασθενών (Cluster A - Cluster F) που προέκυψε, ερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων H-NTM και W-NTM. Όπως παρουσιάζεται στην *εικόνα 10.16*, στα αντίστοιχα δενδρογράμματα, παρατηρούμε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των H-NTM και W-NTM, διότι αυτοί ομαδοποιούνται στο ίδιο cluster. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των NTM που απομονώθηκαν στους μελετώμενους ασθενείς (H-NTM) και εκείνων που απομονώθηκαν από τα δείγματα πόσιμου νερού (W-NTM), (Πίνακας 10.5). Όσο μικρότερη είναι η τιμή του (D_{link} / D_{max}) για τις ομάδες (clusters) που σχηματίζονται στο δενδρογράμμα τόσο ισχυρότερη είναι η συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων που περιλαμβάνονται σε αυτές. Έτσι, στα δενδρογράμματα της *εικόνας 10.15* φαίνεται ότι υπάρχει μια ισχυρότερη συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων "H-NTM" και "W-NTM" στις ομάδες B, C, D και E ($(D_{link} / D_{max}) < 35$) σε σχέση με το ομάδων A και F ($(D_{link} / D_{max}) > 35$).

Στις ίδιες έξι παραπάνω ομάδες των θετικών σε NTM ασθενών, με εφαρμογή της FA εξήχθησαν τρεις νέοι παράγοντες (VFs) για κάθε μία από τις έξι ομάδες (clusters), οι οποίοι παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.6. Οι παράγοντες αυτοί εξηγούν το 77,75%, 67,96%, 72,40%, 65,29%, 76,04% και 72,13% της συνολικής διακύμανσης, στα αντίστοιχα σύνολα δεδομένων (Clusters A - F).

Από τον Πίνακα 10.6 συμπεραίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων "H-NTM" και «W-NTM», όταν η FA εφαρμόστηκε στο σύνολο των δεδομένων των cluster A, B, D και F, ενώ για τα υπόλοιπα σύνολα δεδομένων (cluster C και E) δεν παρουσιάζεται κάποια συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων "H-NTM" και «W-NTM». Τα διαφορετικά αποτελέσματα της FA σε σχέση με εκείνα της CA, για τα cluster C και E, μπορεί να οφείλονται στην περιορισμένη διάρκεια της παραμονής των μελετώμενων ασθενών στην τοποθεσία διαμονής τους, στις πιθανές επιπτώσεις του περιβάλλον εργασίας τους ή στην περιορισμένη ικανότητα της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των NTM. Όλα αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν την ανάγκη για νέες μελέτες που θα λαμβάνουν υπόψη τα ανωτέρω.

Με εφαρμογή της CA (K-Means Clustering) εξήχθησαν δύο ομάδες (Πίνακας 10.7). Οι πιο σημαντικές παράμετροι για την ομαδοποίηση ήταν οι

παράμετροι H-NTM και W-NTM που ομαδοποιούνται στην πρώτη ομάδα, υποδεικνύοντας ότι υπάρχει συσχετισμός μεταξύ τους. Έτσι, με την εφαρμογή της CA (K-means clustering) σε όλες τις ομάδες των θετικών σε NTM ασθενών, αποδεικνύεται ότι οι πιο σημαντικές παράμετροι για την ανάλυση είναι "H-NTM» και «W-NTM», που χρησιμοποιούνται για την κατηγοριοποίηση των δεδομένων σε δύο ομάδες (Πίνακας 10.7), επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ των παραμέτρων "H-NTM» και «W-NTM».

Στη συνέχεια, με εφαρμογή της FA (PCA method), εξήχθησαν δύο νέοι παράγοντες που εξηγούν το 70.76% της συνολικής διακύμανσης (Πίνακας 10.8). Συγκεκριμένα, τα loadings αυτών των δύο παραμέτρων είναι μεταξύ 0,75 και 0,50, δείχνοντας μία μέτρια συσχέτιση μεταξύ τους. Τέλος, αυτή η συσχέτιση παρουσιάζεται στην *εικόνα 10.17*, όπου οι δύο μελετώμενοι παράμετροι, H-NTM και W-NTM, είναι κοντά στο χώρο. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν μια μέτρια προς ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων H-NTM και W-NTM, συμφωνώντας έτσι με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της CA και FA.

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω, τόσο τα αποτελέσματα της CA όσο και αυτά της FA της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ των NTM που απομονώθηκαν από ασθενείς του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας (H-NTM) με τα NTM που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από δείγματα πόσιμου ύδατος από τις περιοχές μόνιμης κατοικίας των θετικών σε NTM ασθενών (W-NTM), ενισχύοντας έτσι την άποψη ότι το πόσιμο νερό είναι ένας πιθανός τρόπος μετάδοσης των NTM από το περιβάλλον στον άνθρωπο.

Σύνοψη

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ των περιβαλλοντικών μυκοβακτηριδίων (NTM) που απομονώθηκαν από ασθενείς από την ευρύτερη περιοχή του νομαρχιακού διαμερίσματος Λάρισας, για την περίοδο 2003-2013, και NTM που απομονώθηκαν από δείγματα πόσιμου ύδατος που συλλέχτηκαν από τις περιοχές μόνιμης κατοικίας των θετικών σε NTM ασθενών. Επίσης, διερευνήθηκε η ύπαρξη συσχετίσεων μεταξύ των NTM που απομονώθηκαν από τα δείγματα πόσιμου ύδατος και των υπόλοιπων παραμέτρων (φυσικοχημικών, βιολογικών και μικροβιολογικών) ποιότητας του πόσιμου ύδατος.

Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκαν δύο πολυπαραγοντικές μέθοδοι ανάλυσης, η Cluster Analysis (CA) και η Factor Analysis (FA).

Καμία συσχέτιση δεν βρέθηκε μεταξύ των NTM και των υπολοίπων παραμέτρων ποιότητας του πόσιμου ύδατος, με εφαρμογή των ανωτέρω δύο πολυπαραγοντικών μεθόδων ανάλυσης.

Με εφαρμογή τόσο της CA όσο και της FA, προκύπτει ότι υπάρχει μέτρια έως ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των άτυπων μυκοβακτηριδίων που απομονώθηκαν από τους ασθενείς (H-NTM) και αυτών που απομονώθηκαν από τα δείγματα πόσιμου ύδατος (W-NTM). Η μελέτη αυτή αποτελεί το πρώτο παράδειγμα στη βιβλιογραφία, όπου με εφαρμογή δύο πολυπαραγοντικών μεθόδων ανάλυσης (CA και FA) αποδεικνύεται ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ H-NTM και W-NTM, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι το πόσιμο ύδωρ είναι μία πιθανή οδός μετάδοσης των NTM από το περιβάλλον στον άνθρωπο.

Βιβλιογραφία

- [1] **Ahn CH**, Lowell JR, Onstad GD, Shuford EH, Hurst GA. (1979). A demographic study of disease due to *Mycobacterium kansasii* or *M intracellulare-avium* in Texas. *Chest*, 75, 120-125.
- [2] **Aitken ML**, Burke W, McDonald G, Wallis C, Ramsey B, Nolan C. (1993). Nontuberculous mycobacterial disease in adult cystic fibrosis patients. *Chest*, 103, 1096-1099.
- [3] **Aksamit TR**. (2002). *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in patients with pre-existing lung disease. *Clin Chest Med*, 23, 643-653.
- [4] **Ali S**, Sivak-Callcott JA, Khakoo R, Williams HJ. (2007). *Mycobacterium fortuitum* infection masquerading as an orbital mass. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*, 23 (4), 327-329.
- [5] **Alvarado-Esquivel C**, Garcia-Corral N, Carrero-Dominguez D, Enciso-Moreno JA, Gurrola-Morales T, Portillo-Gomez L, Rossau R, Mijs W. (2009). Molecular analysis of *Mycobacterium* isolates from extrapulmonary specimens obtained from patients in Mexico. *BMC Clinical Pathology*, 9, 1.
- [6] **American Thoracic Society, Medical Section of the American Lung Association**. (1997). Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med.*, 156, S1-S25.
- [7] **American Thoracic Society (ATS) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA)**. (2007). An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med.*, 175, 367-416.
- [8] **American Thoracic Society**. (2000). Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *Am J Respir Crit Care Med.*, 161, 1376-1395.
- [9] **Angenent LT**, Kelley ST, St Amand A, Pace NR, Hernandez MT. (2005). Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 102, 4860-4865.
- [10] **APHA** (1989). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, 17th ed. Washington D.C.
- [11] **Archibald LK**, Jarvis WR. (2011). Health Care–Associated Infection Outbreak Investigations by the Centers for Disease Control and Prevention, 1946-2005. *Am J Epidemiol.*, 174, S47–S64.
- [12] **Autschbach F**, Eisold S, Hinz U. (2005). High Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut.*, 54, 944-949.
- [13] **Azov AG**, Koch J, Hamilton-Dutoit SJ. (2005). Improved diagnosis of mycobacterial infections in formalin-fixed and paraffin-embedded sections with nested polymerase chain reaction. *APMIS*, 113, 586-593.

- [14] **Bailey RK**, Wyles S, Dingley M, Kent GW. (1970). The isolation of high catalase *Mycobacterium kansasii* from tap water. *The American review of respiratory disease*, 101 (3), 430-431.
- [15] **Bailey WC**. (1983). Treatment of atypical mycobacterial disease. *Chest*, 84 (5), 625-8.
- [16] **Bamias G**, Daikos GL, Siakavellas SI, Kaltsa G, Smilakou S, Katsogridakis I, Vafiadis-Zouboulis I, Ladas SD. (2001). Atypical Mycobacterial Infection Presenting as Persistent Skin Lesion in A Patient with Ulcerative Colitis. *Case Reports in Medicine*, 2011.
- [17] **Barrow GPI**, Hewitt M. (1971). Skin infections with *Mycobacterium marinum* from a tropical fish tank. *British Med.J.*, 2, 505-506.
- [18] **Bartralot R**, Pujol RM, Garcia-Patos V, Sitjas D, Martin-Casabona N, Coll P, Alomar A, Castells A. (2000). Cutaneous infections due to nontuberculous mycobacteria: histopathological review of 28 cases. Comparative study between lesions observed in immunosuppressed patients and normal hosts. *J Cutan Pathol.*, 27, 124-129.
- [19] **Bartralot R**, Garcia-Patos V, Sitjas D, Rodriguez-Cano L, Mollet J, Martin-Casabona N, Coll P, Castells A, Pujol RM. (2005). Clinical patterns of cutaneous nontuberculous mycobacterial infections. *Br J Dermatol.*, 152, 727-734.
- [20] **Bettiker RL**, Axelrod PI, Fekete T, St John K, Truant A, Toney S, Yakrus MA. (2006). Delayed recognition of a pseudo-outbreak of *Mycobacterium terrae*. *Am J Infect Control.*, 34, 343-347.
- [21] **Bhattacharya B**, Karak K, Ghosal AG, Roy A, Das S, Dandapat P, Khetawat D, Mondal DK, Bhattacharya S, Chakrabarti S. (2003). Development of a new sensitive and efficient multiplex polymerase chain reaction (PCR) for identification and differentiation of different mycobacterial species. *Trop Med Int Health*, 8, 150-157.
- [22] **Bicmen C**, Coskum M, Gunduz AT, Seol G, Cirak AK, Tibet G. (2010). Nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary specimens between 2004 and 2009: causative agent or not? *New Microbiologica*, 33, 399-403.
- [23] **Biet F**, Boschioli ML. (2014). Non-tuberculous mycobacterial infections of veterinary relevance. *Research in Veterinary Science*, 97, s69-s77.
- [24] **Billinger ME**, Olivier KN, Viboud C, Montes de Oca R, Steiner C, Holland SM, Prevots DR. (2009). Nontuberculous Mycobacteria-associated Lung Disease in Hospitalized Persons, United States, 1998–2005. *Emerging Infectious Diseases*, 15 (10), 1562-1569.
- [25] **Bionde M**, Marranzano M, Allegra AD et al. (1982). Micobatteri atipici isolati dal suolo e dalle acque. *Annali Sclavo*, 24, 496- 502.
- [26] **Bodmer T**, Miltner E, and Bermudez LE. (2000). *Mycobacterium avium* resists exposure to the acidic conditions of the stomach. *FEMS Microbiol Lett*, 182, 45-49.

- [27] **Bojalil LF**, Ortiz-Ortiz L, Rivas-Gomez C, Molinari JL. (1969). Characterization of somatic microbacterial fractions with inflammatory capability. *Gac Med Mex*, 99 (12), 1155-1162.
- [28] **Briancesco R**, Semproni M, Libera D, Sdanganelli M, Bonadonna L. (2010). Non-tuberculous mycobacteria and microbial populations in drinking water distribution systems. *Ann Ist Super Sanita*, 46 (3), 254-258.
- [29] **Briken V**, Porcelli SA, Besra GS, Kremer L. (2004). Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol.*, 53, 391-403.
- [30] **British Thoracic Society (BTS)** (2000). Management of opportunist mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee guidelines 1999. *Thorax*, 55, 210-218.
- [31] **Brooks RW**, Parker BC, Gruft H, Falkinham III JO. (1984). Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria V, Numbers in Eastern United States Soils and Correlation with Soil Characteristics. *American Review of Respiratory Disease*, 130 (4), 630-633.
- [32] **Brown-Elliott BA**, Griffith DE, Wallace RJ Jr. (2002). Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *Clin Lab Med.*, 22, 911-925.
- [33] **Brudey K**, Filliol I, Ferdinand S, Guernier V, Duval P, Maubert B, Sola C, Rastogi N. (2006). Long-term population-based genotyping study of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in the French departments of the Americas. *J Clin Microbiol.*, 44,183-191.
- [34] **Buhler VB**, Pollak ANN. (1953). Human Infection with Atypical Acid-Fast Organisms. Report of Two Cases with Pathologic Findings. *Americal Journal of Clinical Pathology*, 23 (4), 363-374.
- [35] **Buijtels PC**, Petit PL. (2005). Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J Microbiol Methods*, 62, 83-88.
- [36] **Bull TJ**, McMinn EJ, Sidi-Boumedine K. (2003). Detection and verification of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J Clin Microbiol.*, 41, 2915-2923.
- [37] **Butler WR**, Guthertz LS. (2001). Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. *Clin Microbiol Rev.*, 14, 704-726.
- [38] **Butler WR**, Thibert L, Kilburn JO. (1992). Identification of *Mycobacterium avium* complex strains and some similar species by high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol.*, 30, 2698-2704.
- [39] **Callaghan R**, Allen M. (2003). *Mycobacterium malmoense* infection of the knee. *Ann Rheum Dis.*, 62, 1047.
- [40] **Carson LA**, Bland LA, et al. (1988). Pravelence of Nontuberculous Mycobacteria in Water Supplies of Hemodialysis Centers. *Applied and Environmental Microbiology*, 54 (12), 3122-3125.

- [41] **Carson LA**, Petersen NJ, Favero MS, Aguero SM. (1978). Growth Characteristics of Atypical Mycobacteria in Water and Their Comparative Resistance to Disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*, 36 (6), 839-846.
- [42] **Castillo-Rodal AI**, Mazari-Hiriart M, Lloret-Sánchez LT, Sachman-Ruiz B, Vinuesa P, López-Vidal Y. (2012). Potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria found in aquatic systems. Analysis from a reclaimed water and water distribution system in Mexico City. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31, 683-694.
- [43] **Chacon O**, Bermudez LE, Barletta RG. (2004). Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annual Review of Microbiology*, 58, 329-363.
- [44] **Chalermkulrat W**, Gilbey JG, Donohue JF. (2002). Nontuberculous mycobacteria in women, young and old. *Clin Chest Med*, 23, 675-686.
- [45] **Chalermkulrat W**, Sood N, Neuringer IP, Hecker TM, Chang L, Rivera MP, Paradowski LJ, Aris RM. (2006). Non-tuberculous mycobacteria in end stage cystic fibrosis: implications for lung transplantation. *Thorax*, 61, 507-513.
- [46] **Chamberlin WM**, Naser SA. (2006). Integrating theories of the etiology of Crohn's disease. On the etiology of Crohn's disease: questioning the hypotheses. *Med Sci Monit.*, 12, RA27-33.
- [47] **Chang C**, Wang L, Liao C, Huang S. (2002). Identification of Nontuberculous Mycobacteria Existing in Tap Water by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 3159-3161.
- [48] **Chapman JS**. (1960). The anonymous mycobacteria in human disease. In: Ivan H. Mattson I. Memorial Conference (6th : 1959 : University of Texas Southwestern Medical School).
- [49] **Chapman JS**, Speight M. (1968). Isolation of Atypical Mycobacteria from Pasteurized Milk", *American Review of Respiratory Disease*, 98 (6), 1052-1054.
- [50] **Chapman JS**. (1971). The ecology of the atypical mycobacteria. *Archives of Environmental Health*. 1971, 22, 41.
- [51] **Chemlal K**, Huys G, Laval F, Vincent V, Savage C, Gutierrez C, Laneelle MA, Swings J, Meyers WM, Daffe M, Portaels F. (2002). Characterization of an unusual *Mycobacterium*: a possible missing link between *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol.*, 40, 2370-2380.
- [52] **Chemlal K**, Portaels F. (2003). Molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Infect Dis.*, 16, 77-83.
- [53] **Chen JM**, German GJ, Alexander DC, Ren H, Tan T, Liu J. (2006). Roles of *Lsr2* in Colony Morphology and Biofilm Formation of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol.*, 188, 633-641.
- [54] **Chiodini RJ**, van Kruiningen HJ, Merkal RS, Thayer WR, Coutu JA. (1984). Characteristics of an Unclassified Mycobacterium Species Isolated from

Patients with Crohn's Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 20 (5), 966-971.

- [55] **Chou MP**, Clements ACA, Thomson RM. (2014). A spatial epidemiological analysis of nontuberculous mycobacteria infections in Queensland, Australia. *BMC Infectious Diseases*, 14, 279.
- [56] **Cloud JL**, Neal H, Rosenberry R, Turenne CY, Jama M, Hillyard DR, Carroll KC. (2002). Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. *J Clin Microbiol.*, 40, 400-406.
- [57] **Codecasa L**, Mantegani P, Galli L, Lazzarin A, Scarpellini P, Fortis C. (2006). An in-house RD1-based enzyme-linked immunospot-gamma interferon assay instead of the tuberculin skin test for diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol.*, 44, 1944-1950.
- [58] **Collins CH**, Grange JM, Yates MD. (1984). A Review - Mycobacteria in water. *Journal of Applied Bacteriology*, 57, 193-211.
- [59] **Collins HL**. (2003). The role of iron in infections with intracellular bacteria. *Immunol Lett.*, 85, 193-195.
- [60] **Conger NG**, O'Connell RJ, Laurel VL, Olivier KN, Graviss EA, Williams-Bouyer N, Zhang Y, Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr. (2004). *Mycobacterium simae* outbreak associated with a hospital water supply. *Infect Control Hosp Epidemiol.*, 25, 1050-1055.
- [61] **Cook JL**. (2010). Nontuberculous mycobacteria: opportunistic environmental pathogens for predisposed hosts. *British Medical Bulletin*, 96, 45-59.
- [62] **Cooksey RC**, Limor J, Morlock GP, Crawford JT. (2003). Identifying *Mycobacterium* species and strain typing using a microfluidic labchip instrument. *Centers for Disease Control and Prevention*, 35 (4), 786. Atlanta, GA, USA.
- [63] **Corinne D**, Duguet JP, Montiel A, et al. (2002). Occurrence of Mycobacteria in Water Treatment Lines and in Water Distribution Systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5318-5325.
- [64] **Coulter C**, Robson J. (2004). Skin and soft tissue infections due to nontuberculous mycobacteria. *Microbiol Australia*, 25, 10-14.
- [65] **Covert TC**, Rodgers MR, Reyes AL, Stelma GN. (1999). Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (6), 2492-2496.
- [66] **Da Costa Cruz J**. (1938). "Mycobacterium fortui-tum" an Acid-fast Organism Pathogenic for Man. *Acta Med. Rio de Janeiro*, 1, 297-301.
- [67] **Dailoux M**, Laurain C, Weber M, Hartemann PH. (1999). Water and Nontuberculous Mycobacteria. *Wat. Res.*, 33 (10), 2219-2228.
- [68] **Danelishvili L**, Poort MJ, Bermudez LE. (2004). Identification of *Mycobacterium avium* genes up-regulated in cultured macrophages and in mice. *FEMS Microbiol Lett.*, 239, 41-49.

- [69] **Daniel AK**, Lee RE, Portaels F, Small PL. (2004). Analysis of *Mycobacterium* species for the presence of a macrolide toxin, mycolactone. *Infect Immun.*, 72, 123-132.
- [70] **Daniel O**, Osman E, Adebisi P, Mourad G, Declarcq E, Bakare R. (2011). Non tuberculosis mycobacteria isolates among new and previously treated pulmonary tuberculosis patients in Nigeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 113-115.
- [71] **Dantec CL**, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V. (2002a). Chlorine Disinfection of Atypical Mycobacteria Isolated from a Water Distribution System. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (3), 1025-1032.
- [72] **Dantec CL**, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V. (2002b). Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (11), 5318-5325.
- [73] **Dauendorffer JN**, Guillemin I, Aubry A, Truffot-Pernot C, Sougakoff W, Jarlier V, Cambau E. (2003). Identification of mycobacterial species by PCR sequencing of quinolone resistance-determining regions of DNA gyrase genes. *J Clin Microbiol.*, 41, 1311-1315.
- [74] **De Baere T**, Moerman M, Rigouts L, Dhooge C, Vermeersch H, Verschraegen G, Vaneechoutte M. (2001). *Mycobacterium interjectum* as causative agent of cervical lymphadenitis. *J Clin Microbiol.*, 39, 725.
- [75] **Detjen AK**, Keil T, Roll S, Hauer B, Mauch H, Wahn U, Magdorf K. (2007). Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis.*, 45, 322-328.
- [76] **Dhanasekaran S**, Jenum S, Stavrum R, Wiker HG, Kenneth J, Vaz M, Doherty TM, Grewal MS, et al. (2014). Effect of Non-tuberculous Mycobacteria on Host Biomarkers Potentially Relevant for Tuberculosis Management. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8 (10), e3243.
- [77] **Dhillon SS**, Watanakunakorn C. (2000). Lady Windermere syndrome: middle lobe bronchiectasis and *Mycobacterium avium* complex infection due to voluntary cough suppression. *Clin Infect Dis.*, 30, 572-575.
- [78] **Diel R**, Nienhaus A, Lange C, Meywald-Walter K, Forssbohm M, Schaberg T. (2006). Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res.*, 7, 77.
- [79] **Ding LW**, Lai CC, Lee LN, Hsueh PR. (2006). Disease caused by non-tuberculous mycobacteria in a university hospital in Taiwan, 1997-2003. *Epidemiol Infect.*, 1-8.
- [80] **Dirac MA**, Horan KL, Doody DR, Meschke JS, Park DR, Jackson LA, et al. (2012). Environment or Host? *Am J Respir Crit Care Med*, 186 (7), 684-691.

- [81] **Dobos KM**, Quinn FD, Ashford DA, Horsburgh CR, King CH. (1999). Emergence of a unique group of necrotizing mycobacterial diseases. *Emerg Infect Dis.*, 5, 367-378.
- [82] **Dodge JA**, Lewis PA, Stanton M, Wilsher J. (2007). Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947-2003. *Eur Respir J*, 29, 522-526.
- [83] **Dolz-Marco R**, Udaondo P, Gallego-Pinazo R, Millán JM, Díaz-Llopis M. (2012). Topical linezolid for refractory bilateral *Mycobacterium chelonae* post-laser-assisted in situ keratomileusis keratitis. *Archives of Ophthalmology*, 130 (11), 1475-1476.
- [84] **Doucet-Populaire F**, Buriankova K, Weiser J, Pernodet JL. (2002). Natural and acquired macrolide resistance in mycobacteria. *Curr Drug Targets Infect Disord.*, 2, 355-370.
- [85] **Douglas RS**, Cook T, Shorr N. (2003). Lumps and bumps: late postsurgical inflammatory and infectious lesions. *Plast Reconstr Surg.*, 112, 1923-8.
- [86] **Dovriki E**, gerogianni I, Petinaki E, Hadjichristodoulou Ch, Papaioannou A, Gourgoulisanis K. (2016). Isolation and Identification of Non Tuberculous Mycobacteria from Hospitalized Patients and Drinking Water Sample – Examination of their Correlation by Chemometrics. *Environ Monit Assess*, 188-247.
- [87] **Du Moulin GC**, Sherman IH, Hoaglin DC, Stottmeier KD. (1985). *Mycobacterium avium* Complex, an Emerging Pathogen in Massachusetts. *Journal of Clinical Microbiology*, 22 (1), 9-12.
- [88] **Du Moulin GC**, Stottmeier KD. (1986). Waterborne Mycobacteria: An increasing threat to health. *ASM News*, 52, 525-529.
- [89] **Du Moulin GC**, Stottmeier K, Pelletier P, Tsang A, Hedley-Whyte J. (1988). Concentration of *Mycobacterium avium* by hospital hot water systems. *Journal of the American Medical Association*, 260(11), 1599-1601.
- [90] **Ebert DL**, Olivier KN. (2002). Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. *Infect Dis Clin North Am*, 16, 221-233.
- [91] **Editorials.** (2008). The Importance of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 178, 999-1001.
- [92] **Eilertsen E.** (1969). Atypical mycobacteria and reservoir in water. *Scand. J.Resp. Dis.*, 50, 85-88.
- [93] **Elahi E**, Su D, Young A. (2011). Canalculitis involving *Mycobacterium fortuitum* after dacryocystorhinostomy with silicone stenting,” *Canadian Journal of Ophthalmology*, 46 (3), 291-292.
- [94] **Ellis SM.** (2004). The spectrum of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infection. *Eur Radiol.*, 14 (Suppl 3), E34-42.
- [95] **Engel HWB**, Berwald LG, Havelaar AH. (1980). The occurrence of *Mycobacterium kansasii* in tapwater. *Tubercle*, 61 (1), 21-26.

- [96] **EPA-822-B-01-007. (1999).** United States Office of Science and Technology EPA-822-B-01-007, Mycobacteria: Health Advisory Environmental Protection Office of Water. Agency Washington, DC 20460.
- [97] **Epson E, Winthrop K. (2012).** Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease: An Emerging Disease in the Elderly. *Open Longevity Science*, 6, 92-100.
- [98] **Eriksson M, Bennet R, Danielsson N. (2001).** Non-tuberculous mycobacterial lymphadenitis in healthy children: another "lifestyle disease"? *Acta Paediatr.*, 90, 1340-1342.
- [99] **Esteban J, Fernandez-Roblas R, Ortiz A, Garcia-Cia JI. (2006).** Pseudo-outbreak of *Mycobacterium gordonae*: usefulness of randomly amplified polymorphic DNA analysis to assess the clonality of the isolates. *Clin Microbiol Infect.*, 12, 677-679.
- [100] **EU Directive 98/83/EC**, Official Journal of the European Communities. No. L 31/1.
- [101] **EU Directive 2000/60/EC**, Official Journal of the European Communities. No. L 297/1.
- [102] **EU Directive 2006/118/EU**, Official Journal of the European Communities. No. L 372/19.
- [103] **Falkinham JO 3rd, Parker BC, Gruft H. (1980).** Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. I. Geographic distribution in the eastern United States. *American Review of Respiratory Disease*, 121 (6), 931-937.
- [104] **Falkinham JO 3rd. (1996).** Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 9 (2), 177-215.
- [105] **Falkinham JO 3rd, Norton CD, LeChevallier MW. (2001).** Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol.*, 67 (3), 1225-1231.
- [106] **Falkinham JO 3rd. (2002).** Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med.*, 23, 529-551.
- [107] **Falkinham JO 3rd. (2003a).** Factors Influencing the Chlorine Susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (9), 5685-5689.
- [108] **Falkinham JO 3rd. (2003b).** Mycobacterial aerosols and respiratory disease. *Emerg Infect Dis.*, 9, 763-767.
- [109] **Falkinham JO 3rd. (2009).** Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 356-367.
- [110] **Falkinham JO 3rd. (2011).** Nontuberculous Mycobacteria from Household Plumbing of Patients with Nontuberculous Mycobacteria Disease *Emerging Infectious Diseases*, 17 (3), 419-424.

- [111] **Falsey RR**, Kinzer MH, Hurst S, Kalus A, Pottinger P, Duchin JS, Zhang J, Noble-Wang J, Shimohara MM. (2013). Cutaneous Inoculation of Nontuberculous Mycobacteria Curing Professional Tattooing: A Case Series and Epidemiologic Study. *Clinical Infectious Diseases*, 57 (6), e143-147.
- [112] **Favivar TN**, Johari P, Moien AA, Shahri MH, Naderi M, Oskouie H. (2012). Assessment of Prevalence of Non-tuberculous Mycobacteria in Archival Acid-fast Bacilli Positive Smear Slides by TaqMan Real-time PCR Assay. *North American Journal of Medical Sciences*, 4 (5), 231.
- [113] **Feldman WH**, Davies R, Moses HE, Andberg W. (1943). An Unusual Mycobacterium isolated from Sputum of a Man suffering from Pulmonary Disease of Long Duration. *American Review of Tuberculosis and Pulmonary Diseases*, 48 (2), 82-93.
- [114] **Feller M**, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, Furrer H, Pfyffer GE, Jemmi T, Baumgartner A, Egger M. (2007). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.*, 7, 607-613.
- [115] **Ferroni A**, Sermet-Gaudelus I, Le Bourgeois M, Pierre-Audigier C, Offredo C, Rottman M, Guillemot D, Bernede C, Vincent V, Berche P, Gaillard JL. (2005). Measurement of immunoglobulin G against Mycobacterial antigen A60 in patients with cystic fibrosis and lung infection due to *Mycobacterium abscessus*. *Clin Infect Dis.*, 40, 58-66.
- [116] **Ferroni A**, Vu-Thien H, Lanotte P, Le Bourgeois M, Sermet-Gaudelus I, Fauroux B, Marchand S, Varaigne F, Berche P, Gaillard JL, Offredo C. (2006). Value of the chlorhexidine decontamination method for recovery of nontuberculous mycobacteria from sputum samples of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.*, 44, 2237-2239.
- [117] **Field SK**, Fisher D, Cowie RL. (2004) Mycobacterium avium complex pulmonary disease in patients without HIV infection. *Chest*, 126, 566–581.
- [118] **Fischeder R**, Schulze-Robbecke, Weber A. (1991). Occurrence of mycobacteria in drinking water samples. *Zentbl. Hyg. Umweltmed* ,192, 154-158.
- [119] **Ford JG**, Huang AJ, Pflugfelder SC, Alfonso EC, Forster RK, Miller D. (1998). Nontuberculous mycobacterial keratitis in south Florida. *Ophthalmology*, 105, 1652-1658.
- [120] **Forget EJ**, Menzies D. (2006). Adverse reactions to first-line antituberculosis drugs. *Expert Opin Drug Saf.*, 5, 231-249.
- [121] **Franco-Alvarez de Luna F**, Ruiz P, Gutierrez J, Casal M. (2006). Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct Assay for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Four Atypical Mycobacterial Species in Clinical Samples. *J Clin Microbiol.*, 44, 3025-7.
- [122] **Fry KL**, Meissner PS, Falkinham III JO. (1986). Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria VI. Identification and Use of Epidemiologic Markers for Studies of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, and *M. scrofulaceum*. *American Review of Respiratory Disease*, 134 (1), 39-43.

- [123] **Fujita Y**, Naka T, Doi T, Yano I. (2005). Direct molecular mass determination of trehalose monomycolate from 11 species of mycobacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *Microbiology*, 151, 1443-1452.
- [124] **Fukushima M**, Kakinuma K, Hayashi H, Nagai H, Ito K, Kawaguchi R. (2003). Detection and identification of Mycobacterium species isolates by DNA microarray. *J Clin Microbiol.*, 41, 2605-2615.
- [125] **Furman V**, Lebedeva N, Biran A. (2002). Childhood environmental health concerns in Russia. 28th WEDC Conference, Calcutta, India.
- [126] **Galassi L**, Donato R, Tortoli E, Burrini D, Santianni D, Dei R. (2003). Nontuberculous mycobacteria in hospital water systems: application of HPLC for identification of environmental mycobacteria. *J Water Health*, 1, 133.
- [127] **Gangadharam PRJ**, Jenkins PA. (1998). *Mycobacteria. I. Basic Aspects.* New York, NY: Chapman & Hall.
- [128] **Gardner TJ**. (2004). Evaluation of *Mycobacterium avium* complex lung disease in women. Dissertation. ISBN 0-496-01687-3.
- [129] **Garman ME**, Orengo I. (2003). Unusual infectious complications of dermatologic procedures. *Dermatol Clin.*, 21, 321-235.
- [130] **Gasperi J**, Garnaud S, Rocher V, Moilleron R. (2009). Priority pollutants in surface waters and settleable particles within a densely urbanized area: Case study of Paris (France). *Science of the Total Environment*, 407, 2900-2908.
- [131] **Gbery IP**, Djeha D, Yobouet P, Aka B, Kanga JM. (1996). Atypical mycobacterial skin infections. *Sante*, 6, 317-322.
- [132] **George KL**, Parker BC, Gruft H, Falkinham JO 3rd. (1980). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. II. Growth and survival in natural waters. *Am Rev Respir Dis.*, 122 (1), 89-94.
- [133] **Gerogianni I**, Papala M, Kostikas K, Petinaki E, Gourgoulianis KI. (2008). Epidemiology and clinical significance of mycobacterial respiratory infections in Central Greece. *Int J Tuberc Lung Dis*, 12 (7), 807–812.
- [134] **Gill CO**, Saucier L, Meadus WJ. (2011). Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis in dairy products, meat, and drinking water. *Journal of Food Protection*, 74 (3), 480-499.
- [135] **Gitti Z**, Neonakis I, Fanti G, Kontos F, Maraki S, Tselentis Y. (2006). Use of the GenoType Mycobacterium CM and AS Assays To Analyze 76 Nontuberculous Mycobacterial Isolates from Greece. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (6), 2244-2246.
- [136] **Gitti Z**, Mantarakis E, Maraki S, Samonis G. (2011). Clinical significance and antibiotic susceptibilities of nontuberculous mycobacteria from patients in Crete, Greece. *Future Microbiol.*, 6(9):1099-1109.
- [137] **Glennon M**, Cormican M. (2001). Detection and diagnosis of mycobacterial pathogens using PCR. *Expert Rev Mol Diagn*, 1, 163-174.

- [138] **Glover N**, Holtzman A, Aronson T, Froman S, Berlin OGW, Dominguez P, Yakrus, M. (1994). The isolation and identification of *Mycobacterium avium* complex (MAC) recovered from Los Angeles potable water, a possible source of infection in AIDS patients. *International Journal of Environmental Health Research*, 4, 63-72.
- [139] **Go LHT**, Jain M. (2012). Diagnosis of Cystic Fibrosis in Adults. *Clinical Pulmonary Medicine*, 19 (4), 159.
- [140] **Goslee S**, Wolinsky E. (1976). Water as a source of potentially pathogenic mycobacteria. *American Review of Respiratory Diseases*, 113 (3), 287-292.
- [141] **Graham DY**, Markesich DC, Yoshimura HH. (1987). Mycobacteria and inflammatory bowel disease. Results of culture. *Gastroenterology*, 92, 436-442.
- [142] **Grange JM**, Yates MD, Pozniak A. (1995). Bacteriologically confirmed nontuberculous mycobacterial lymphadenitis in south east England: a recent increase in the number of cases. *Arch Dis Child.*, 72, 516-517.
- [143] **Grange JM**. (1996). The biology of the genus *Mycobacterium*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser.*, 25, 1S-9S.
- [144] **Griffith DE**, Aksamit T, Brown-Elliott BA,, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, von Reyn CF, Wallace RJ, Winthrop K. (2007). An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 175, 367-416.
- [145] **Griffith DE**. (1997). Nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Pulm Med.*, 3, 139-45.
- [146] **Gurtler V**, Harford C, Bywater J, Mayall BC. (2006). Direct identification of slowly growing *Mycobacterium* species by analysis of the intergenic 16S-23S rDNA spacer region (ISR) using a GelCompar II database containing sequence based optimization for restriction fragment site polymorphisms (RFLPs) for 12 enzymes. *J Microbiol Methods*, 64, 185-199.
- [147] **Gusmao FA**, Alvarenga L, Barbosa L, Sampaio J, Leao SC, Hofling-Lima AL, Freitas D. (2005). Deep stromal mycobacterial keratitis: viable bacteria after six months of treatment: case report and literature review. *Arq Bras Oftalmol.*, 68, 551-553.
- [148] **Hale YM**, Pfyffer E, Salfinger M. (2001). Laboratory Diagnosis of Mycobacterial Infections: New Tools and Lessons Learned *Clin Infect Dis.*, 33, 834-846.
- [149] **Halstrom S**, Price P, Thomson R. (2015). Review: Environmental mycobacteria as a cause of human infection. *International Journal of Mycobacteriology*, 4, 81-91.
- [150] **Hamsch C**, Hartschuh W, Enk A, Flux K. (2011). A Chinese Tatoo Paint as a Vector of Atypical Mycobacteria-outbreak in 7 Patients in Germany. *Acta Derm Venereol.* 91, 63.

- [151] **Hanak V**, Kalra S, Aksamit TR, Hartman TE, Tazelaar HD, Ryu JH. (2006). Hot tub lung: presenting features and clinical course of 21 patients. *Respir Med.*, 100, 610-615.
- [152] **Harriff M**, Bermudez L, Kent ML. (2007). Experimental exposure of zebrafish (*Danio rerio* Hamilton) to *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium peregrinum* reveals the gastrointestinal tract as the primary route of infection: A potential model for environmental mycobacterial infection. *J Fish Dis*, 29, 1-13.
- [153] **Havelaar AH**, Berwald LG, Groothuis DG, Baas JG. (1985). Mycobacteria in Semi-public swimming pools and whirlpools. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*, 180 (5-6), 505-514.
- [154] **Haverkamp MH**, Arend SM, Lindeboom JA, Hartwig NG, van Dissel JT. (2004). Nontuberculous mycobacterial infection in children: a 2-year prospective surveillance study in the Netherlands. *Clin Infect Dis.*, 39, 450-456.
- [155] **Haverkamp MH**, van Dissel JT, Holland SM. (2006). Human host genetic factors in nontuberculous mycobacterial infection: lessons from single gene disorders affecting innate and adaptive immunity and lessons from molecular defects in interferon-gamma-dependent signaling. *Microbes Infect.*, 8, 1157.
- [156] **Haverkort F**. (2003). Australian Mycobacterium Reference Laboratory Network; Special Interest Group in Mycobacteria within the Australian Society for Microbiology. National atypical mycobacteria survey, 2000. *Commun Dis Intell.*, 27, 180-189.
- [157] **Henry MT**, Inamdar L, O'Riordain D, Schweiger M, Watson JP. (2004). Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology, treatment and response. *Eur Respir J.*, 23, 741-746.
- [158] **Hilborn DH**, Covert TC, Yakrus MA, et al. (2006). Persistence of Nontuberculous mycobacteria in a Drinking Water System after Addition of Filtration treatment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 5864-5869.
- [159] **Hillebrand-Haverkort ME**, Kolk AHJ, Kox LFF, Ten Velden JJAM, Ten Veen JH. (1999). Generalized Mycobacterium genavense Infection in HIV-infected Patients: Detection of the Mycobacterium in Hospital Tap Water. *Scandinavian Journal of Infectious*, 31 (1), 63-68.
- [160] **Honarvar B**, Movahedan H, Mahmoodi M, Sheikholeslami FM, Farnia P. (2012). Mycobacterium aurumkeratitis: an unusual etiology of a sight-threatening infection. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16 (2), 204-208.
- [161] **Horan KL**, Freeman R, Weigel K, Semret M, Pfaller S, Covert TC, van Soolingen D, Leao SC, Behr MA, Cangelosi GA. (2006). Isolation of the genome sequence strain *Mycobacterium avium* 104 from multiple patients over a 17-year period. *J Clin Microbiol.*, 44, 783-789.
- [162] **Horsburgh CR**, Havlik JA, Ellis DA, Kennedy E, Fann SA, Dubois RE, Thompson SE. (1991). Survival of Patients with Acquired Immune Deficiency Syndrome and Disseminated *Mycobacterium avium* Complex. *Infection with*

and without Antimycobacterial Chemotherapy. *American Review of Respiratory Disease*, 144 (3), 557-559.

- [163] **Hosek J**, Svastova P, Moravkova M, Pavlik I, Bartos M. (2006). Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: a review. *Veterinarni Medicina*, 51, 180-192
- [164] **Howell N**, Heaton PA, Neutze J. (1997). The epidemiology of nontuberculous mycobacterial lymphadenitis affecting New Zealand children 1986-95. *N Z Med J.*, 110, 171-173.
- [165] **Hwang JH**, Koh WJ, Kim EJ, Kang EH, Suh GY, Chung MP, Kim H, Kwon OJ. (2007). Partial interferon-gamma receptor deficiency and non-tuberculous mycobacterial lung disease. *Tuberculosis*, 87, 166-171.
- [166] **Ichikawa K**, Yagi T, Inagaki T, Moriyama M, Nakagawa T, Uchiya KI, Nikai T, Ogawa K. (2010). Molecular Typing of *Mycobacterium intracellulare* using Multilocus Variable-Number of Tandem-Repeat Analysis: Identification of Loci and Analysis of Clinical Isolates. *Microbiology*, 156 (2), 496-504.
- [167] **Iffat H**, Abid K. (2011). Mycetoma Revisited. *N Dermatol Online*, 147.
- [168] **Ikonomopoulos JA**, Gorgoulis VG, Zacharatos PV, Manolis EN, Kanavaros P, Rassidakis A, Kittas C. (1999). Multiplex polymerase chain reaction for the detection of mycobacterial DNA in cases of tuberculosis and sarcoidosis. *Mod Pathol.*, 12, 854-862.
- [169] **Iseman M**. (1998). Nontuberculous mycobacterial infections. In: Gorbach S, Bartlett J, Blacklow N. (Eds) *Infectious Diseases*. Saunders and Company Philadelphia PA.
- [170] **Iseman MD**, Marras TK. (2008). The Importance of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 178, 999–1001.
- [171] **Iwamoto T**, Saito H. (2006). Comparative study of two typing methods, hsp65 PRA and ITS sequencing, revealed a possible evolutionary link between *Mycobacterium kansasii* type I and II isolates. *FEMS Microbiol Lett.*, 254, 129-133.
- [172] **Jarzembowski JA**, Young MB. (2008). Nontuberculous mycobacterial infections. *Arch Pathol Lab Med*, 132, 1333-1341.
- [173] **Jenkins PA**. (1981). The epidemiology of opportunist mycobacterial infections in Wales, 1952-1978. *Rev Infect Dis*, 3 (5), 1021-1023.
- [174] **Jenkins PA**. (1991). Mycobacteria in the environment. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, 20, 137S-141S.
- [175] **Jenkins PA**. (1992). The laboratory diagnosis of mycobacterial disease. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.*, 2, 101-103.
- [176] **Jeong YJ**, Lee KS, Koh WJ, Han J, Kim TS, Kwon OJ. (2004). Nontuberculous mycobacterial pulmonary infection in immunocompetent patients: comparison of thin-section CT and histopathologic findings. *Radiology*, 231, 880-886.

- [177] **Jindal N**, Devi B, Aggarwal A. (2003). Mycobacterial cervical lymphadenitis in childhood. *Indian J Med Sci.*, 57, 12-15.
- [178] **John T**, Velotta E. (2005). Nontuberculous (atypical) mycobacterial keratitis after LASIK: current status and clinical implications. *Cornea*, 24, 245-255.
- [179] **Johnson MM**, Odell JA. (2013). Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *J Thorac Dis*, 6 (3), 210-220.
- [180] **Johnson PDR**, Azuolas J, Lavender CJ, Wishart E, Stinear TP, Hayman JA, et al. (2007). *Mycobacterium ulcerans* in mosquitoes captured during outbreak of Buruli ulcer, southeastern Australia. *Emerg Infect Dis.*, 13, 1653-1660.
- [181] **Johnson R**, Streicher EM, Louw GE, Warren RM, van Helden PD, Victor TC. (2006). Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Issues Mol Biol.*, 8, 97-111.
- [182] **Jolobe OMP**. (2011). Atypical tuberculous pleural effusions. *European Journal of Internal Medicine*, 22, 456-459.
- [183] **Jordan PW**, Stanley T, Donnelly FM, Elborn JS, McClurg RB, Millar BC, Goldsmith CE, Moore JE. (2007). Atypical mycobacterial infection in patients with cystic fibrosis: update on clinical microbiology methods. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 459-466.
- [184] **Kaevska M**, Hruska K. (2010). Research on *Mycobacterium avium* during the period 1995 to 2009. *Veterinari Medicina*, 55 (10), 473-482.
- [185] **Kahana LM**, Kay JM, Yakrus MA, Wasserman S. (1997) *Mycobacterium avium* complex infection in an immunocompetent young adult related to hot tub exposure. *Chest*, 111, 242-245.
- [186] **Kalita JB**, Rahman H, Baruah KC. (2005). Delayed post-operative wound infections due to non-tuberculous *Mycobacterium*. *Indian J Med Res.*, 122, 535-539.
- [187] **Kamala T**, Paramasivan CN, Herbert D, Venkatesan P, Prabhakar R. (1994a). Evaluation of procedures for isolation of nontuberculous mycobacteria from soil and water. *Appl. Environ. Microbiol*, 60 (3), 1021-1024.
- [188] **Kamala T**, Paramasivan CN, Herbert D, Venkatesan P, Prabhakar R. (1994b). Isolation and Identification of Environmental Mycobacteria in the *Mycobacterium bovis* BCG Trial Area of South India. *Appl. Environ. Microbiol*, 60 (6) 2180-2183.
- [189] **Kane AS**, Stine CB, Hungerford L, Matsche M, Driscoll C, Baya AM. (2007). Mycobacteria as Environmental Portent in Chesapeake Bay Fish Species. *Emerging Infectious Diseases*, 13 (2), 329.
- [190] **Kankya C**, Muwonge A, Djønne B, Munyeme M, Opuda-Asibo J, Skjerve E, Oloya J, Edvardsen V, Johansen TB. (2011). Isolation of non-tuberculous mycobacteria from pastoral ecosystems of Uganda: Public Health significance. *BMC Public Health*, 11, 320.

- [191] **Katoch VM. (2004).** Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J Med Res.*, 120, 290-304.
- [192] **Kennedy BS,** Bedard B, Younge M, Tuttle D, Ammerman E, Ricci J, et al. **(2012).** Outbreak of *Mycobacterium chelonae* Infection Associated with Tattoo Ink. *The New England Journal of Medicine*, 367, 11.
- [193] **Kent ML,** Whipps CM, Matthews JL, Florio D, Watral V, Bishop-Stewart JK, Poort M, Bermudez L. **(2004).** Mycobacteriosis in zebrafish (*Danio rerio*) research facilities. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.*, 138, 383-390.
- [194] **Khan IU,** Selvaraju SB, Yadav JS. **(2005).** Occurrence and characterization of multiple novel genotypes of *Mycobacterium immunogenum* and *Mycobacterium chelonae* in metalworking fluids. *FEMS Microbiol Ecol.*, 54, 329-338.
- [195] **Khanum T,** Rasool SA, Ajaz M, Khan AI. **(2011).** Isolation-Drug Resistance Profile and Molecular Characterization of Indigenous Typical And Atypical Mycobacteria. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 24 (4), 527-532.
- [196] **Kheir WJ,** Sheheitli H, Fattah A, Hamam RN. **(2015).** Nontuberculous Mycobacterial Ocular Infections: A Systematic Review of the Literature. *BioMed Research International*, 2015.
- [197] **Khoor A,** Leslie KO, Tazelaar HD, Helmers RA, Colby TV. **(2001).** Diffuse pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria in immunocompetent people (hot tub lung). *Am J Clin Pathol.*, 115, 755-762.
- [198] **Kim BJ,** Lee KH, Park BN, et al. **(2001).** Detection of Rifabrin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Sputa by Nested PCR-Linked Single-Strand Conformation Polymorphism and DNA Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (7), 2610-2617.
- [199] **Kim TH,** Kubica GP. **(1973).** Preservation of Mycobacteria: 100% Viability of Suspensions Stored at -70°C. *Applied Microbiology*, 25 (6), 956-960.
- [200] **Kirschner P,** Rosenau J, Springer B, et al. **(1996).** Diagnosis of mycobacterial infections by nucleic acid amplification: 18-month prospective study. *J Clin Microbiol.*, 34, 304-312.
- [201] **Kline S,** Cameron S, Streifel A, Yakrus MA, Kairis F, Peacock K, Besser J, Cooksey RC. **(2004).** An outbreak of bacteremias associated with *Mycobacterium mucogenicum* in a hospital water supply. *Infect Control Hosp Epidemiol.*, 25, 1042-1049.
- [202] **Koh WJ,** J. H. Lee, Kwon YS, Lee KS, Suh GY, Chung MP, Kim H, Kwon OJ. **(2007).** Prevalence of gastroesophageal reflux disease in patients with nontuberculous mycobacterial lung disease. *Chest* 131, 1825-1830.
- [203] **Kratky M,** Vinsova J, Novorna E, Sto larikova J. **(2014).** Salicylanilide pyrazinoates inhibit in vitro multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains, atypical mycobacteria and isocitrate lyase. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53, 1-9.

- [204] **Kroner C**, Ganster B, Kappler M, Grimmelt AC, Belohradsky BH, Hogardt M, et al. (2013). Molecular Epidemiology of Nontuberculous Mycobacteria in a German CF Center and Clinical Course of NTM Positive Patients. *Open Journal of Medical Microbiology*, 3, 39-47.
- [205] **Kubica GP**, Beam RE, Palmer JR, Rigdon AL. (1963a). The isolation of unclassified (atypical) acid fast bacilli from soil and water samples collected in the state of Georgia. *American Review of Respiratory Disease*, 88, 718-720.
- [206] **Kubica GP**, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G. (1963b). Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L- cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.*, 87, 775-779.
- [207] **Kymionis GD**, Kankariya VP, Kontadakis GA. (2012). Combines treatment with flap amputation, phototherapeutic keratectomy, and collagen crosslinking in severe intractable post-LASIK atypical mycobacterial infection with corneal melt. *J Cataract Refract Surg*, 38, 713-715.
- [208] **Le Dantec C**, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V. (2002a). Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1025-1032.
- [209] **Le Dantec C**, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V. (2002b). Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5318-5325.
- [210] **Lee SB**, Oliver KM, Strube YN, Mohan SK, Slomovic AR. (2005). Fourth-generation fluoroquinolones in the treatment of mycobacterial infectious keratitis after laser-assisted in situ keratomileusis surgery. *Can J Ophthalmol.*, 40, 750-753.
- [211] **Leite CQ**, da Silva Rocha A, de Andrade Leite SR, Ferreira RM, Suffys PN, de Souza Fonseca L, Saad MH. (2005). A comparison of mycolic acid analysis for nontuberculous mycobacteria identification by thin-layer chromatography and molecular methods. *Microbiol Immunol.*, 49:571-578.
- [212] **Leoni E**, Legnani P, Mucci MT, Pirani R. (1999). Prevalence of mycobacteria in a swimming pool environment. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 683-688.
- [213] **Lévy-Frébault VV, et al.** (1983). *Mycobacterium fallax* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1983, 33, 336-343.
- [214] **Lévy-Frébault VV**, Portaels F. (1992). Proposed Minimal Standards for the Genus *Mycobacterium* and for Description of New Slowly Growing *Mycobacterium* Species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42 (2), 315-323.
- [215] **Li XJ**, Wu QX, Zeng XS. (2003). Nontuberculous mycobacterial cutaneous infection confirmed by biochemical tests, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis and sequencing of *hsp65* gene. *Br J Dermatol.*, 149, 642-646.

- [216] **Lim SY**, Kim BJ, Lee MK, Kim K. (2008). Development of a real-time PCR-based method for rapid differential identification of *Mycobacterium* species. *Lett Appl Microbiol.*, 46, 101-106.
- [217] **Lindeboom JA**, Prins JM, Bruijnesteijn van Coppenraet ES, Lindeboom R, Kuijper EJ. (2005). Cervicofacial lymphadenitis in children caused by *Mycobacterium haemophilum*. *Clin Infect Dis.*, 41, 1569-1575.
- [218] **Lindeboom JA**, Kuijper EJ, Prins JM, Bruijnesteijn van Coppenraet ES, Lindeboom R. (2006a). Tuberculin skin testing is useful in the screening for nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis in children. *Clin Infect Dis.*, 43, 1547-1551.
- [219] **Lindeboom JA**. (2006b). Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis in children: a prospective multicenter, multidisciplinary study in the Netherlands. Thesis.
- [220] **Lindeboom JA**, Kuijper EJ, Bruijnesteijn van Coppenraet ES, Lindeboom R, Prins JM. (2007). Surgical excision versus antibiotic treatment for nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis in children: a multicenter, randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis.*, 44, 1057-1064.
- [221] **Lindeboom JA**, Bruijnesteijn van Coppenraet LES, van Soolingen D, Prins JM, Kuijper EJ. (2011). Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment of *Mycobacterium haemophilum* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 24 (4), 701-717.
- [222] **Linell F**, Norden A. (1954). *Mycobacterium balnei*. A New Acid-Fast Bacillus occurring in Swimming Pools and Capable of producing Skin Lesions in Humans. *Acta Tuberculosea Scandinavica*, 33, 84.
- [223] **Liu CW**, Lin KH, Kuo YM. (2003). Application of factor analysis in the assessment of groundwater quality in a blackfoot disease area in Taiwan. *Sci. Total Environ.*, 313, 77-89.
- [224] **Loddenkemper K**, Enzweiler C, Loddenkemper C, Backhaus M, Burmester GR, Buttgereit F. (2005). Granulomatous synovialitis with erosions in the shoulder joint: a rare case of polyarthritis caused by *Mycobacterium kansasii*. *Ann Rheum Dis.*, 64, 1088-1090.
- [225] **Luong A**, McClay JE, Jafri HS, Brown O. (2005). Antibiotic therapy for nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis. *Laryngoscope*. 115, 1746-1751.
- [226] **Lyu J**, Jang HJ, Song JW, Choi CM, Oh YM, Lee SD, Kim WS, Kim DS, Shim TS. (2011). Outcomes in patients with *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease treated with long-term injectable drugs. *Respiratory Medicine*, 105, 781-787.
- [227] **Maekawa K**, Ito Y, Hirai T, Kubo T, Imai S, Tatsumi S, Fujita K, Takakura S, Niimi A, Iinuma Y, Ichiyama S, Togashi K, Mishima M. (2011). Environmental Risk Factors for Pulmonary *Mycobacterium avium-intracellulare* Complex Disease. *CHEST*, 140 (3), 723-729.

- [228] **Mahaisavariya P**, Chaiprasert A, Khemngern S, Manonukul J, Gengviniij N, Ubol PN, Pinitugsorn S. (2003). Nontuberculous mycobacterial skin infections: clinical and bacteriological studies. *J Med Assoc Thai.*, 86, 52-60.
- [229] **Mahaisavariya P**, Manonukul J, Khemngern S, Chaiprasert A. (2004). Mycobacterial skin infections: comparison between histopathologic features and detection of acid fast bacilli in pathologic section. *J Med Assoc Thai.* 87, 709-712.
- [230] **Malecha MA**, Doughman DJ. (2002). *Mycobacterium chelonae* keratitis associated with soft contact lens wear. *CLAO J.*, 28, 228-230.
- [231] **Maloney S**, Welbel S, Daves B. et al. (1994). Mycobacterium abscessus pseudoinfection traced to an automated endoscope washer: utility of epidemiologic and laboratory investigation. *J. Infect. Dis.*, 169, 1166-1169.
- [232] **Marchetti N**, Criner K, Criner GJ. (2004). Characterization of functional, radiologic and lung function recovery post-treatment of hot tub lung. A case report and review of the literature. *Lung.*, 182, 271-277.
- [233] **Marks J**, C.H.H. Thomas CHH. (1958). *Mth. Bull. Minist. Hlth. Lab. Serv.*, 17, 194.
- [234] **Massart DL**, Kaufman L. (1983). *The Interpretation of Chemical Data by the Use of Cluster Analysis.* J. Wiley, New York.
- [235] **McNabb A.**, Eisler D., Adie K., et al. (2004). Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (hsp65) for routine identification of Mycobacterium species isolated from clinical sources. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 3000-3011.
- [236] **McSwiggan DA**, Collins CH. (1974). The isolation of *M. kansasii* and *M. xenopi* from water systems. *Tubercle*, 55, 291-297.
- [237] **Mediavilla-Gradolph MC**, De Toro-Peinado I, Bermudez-Ruiz MP, et al. (2015). Use of MALDI-TOF MS for Identification of Nontuberculous Mycobacterium Species Isolated from Clinical Specimens. *BioMed Research International (Hindawi)*.
- [238] **Meier JL**, Beekmann SE. (1995). Mycobacterial and fungal infections of bone and joints. *Curr Opin Rheumatol.*, 7, 329-336.
- [239] **Mendes de Souza MG**, Sato DN, Leite CQ, de Andrade Leite SR, Sartori FG, de Andrade Prince K, Casmeiro LA, Martins CHG. (2010). Occurrence of pathogenic environmental mycobacteria on surfaces in health institutions. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 1, 53–58.
- [240] **Mendoza JL**, Lana R, Diaz-Rubio M. (2009). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and its relationship with Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 15 (4), 417-422.
- [241] **Mignard S**, Flandrois JP. (2007). Identification of Mycobacterium using the EF-Tu encoding (tuf) gene and the tmRNA encoding (ssrA) gene. *J Med Microbiol.*, 56, 1033-1041.

- [242] **Mijs W**, de Haas P, Rossau R, Van der Laan T, Rigouts L, Portaels F, van Soolingen D. (2002). Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 52, 1505-1518.
- [243] **Mirnejad R**, Jeddi F, Kiani J, Khoobdel M. (2011). Etiology of spontaneous bacterial peritonitis and determination of their antibiotic susceptibility patterns in Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 116-118.
- [244] **Moore EH**. (1993). Atypical Infection in the Lung: CT Appearance. *Radiology*, 187, 777-782.
- [245] **Moore JE**, Kruijshaar ME, Ormerod L, Drobniowski F, Abubakar I. (2010). Increasing reports of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006. *BMC Public Health*, 10, 612.
- [246] **Moorthy RS**, Valluri S, Rao NA. (2012). Nontuberculous Mycobacterial Ocular and Adnexal Infections. *Surv Ophthalmol*, 57 (3), 202-235.
- [247] **Mostrom P**, Gordon M, Sola C, Ridell M, Rastogi N. (2002). Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect.*, 8, 694-704.
- [248] **Murthy SI**, Jain R, Swarup R, Sangwan VS. (2013). Recurrent non-tuberculous mycobacterial keratitis after deep anterior lamellar keratoplasty for keratoconus. *BMJ Case Reports*, 2013.
- [249] **Mussaffi H**, Rivlin J, Shalit I, Ephros M, Blau H. (2005). Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis associated with allergic bronchopulmonary aspergillosis and steroid therapy. *Eur Respir J.*, 253.
- [250] **Mussaffi H**, Rivlin J, Shalit I, Ephros M, Blau H. (2005). Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis associated with allergic. *Eur Respir J*, 25, 324-328.
- [251] **Nakamura T**, Yamamura Y, Tsuruta T, Tomoda K, Sakaguchi M, Tsukano M. (2001). *Mycobacterium kansasii* arthritis of the foot in a patient with systemic lupus erythematosus. *Intern Med.*, 40, 1045-1049.
- [252] **Narang R**, Narang P, Mendiratta DK. (2009). Isolation and Identification of Nontuberculous Mycobacteria from Water and Soil in Central India. *India Journal of Medical Microbiology*, 27 (3), 247-250.
- [253] **Nash KA**, Zhang Y, Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr. (2005). Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*. *J Antimicrob Chemother.*, 55, 170-177.
- [254] **Neonakis IK**, Gitti Z, Krambovitis E, Spandidos DA. (2008). Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. Review. *Journal of Microbiological Methods*, 75, 1-11.
- [255] **Ness R**, Kip K, Hillier S, Soper D, Stamm C, Sweet R, Rice P, Richter H. (2005). A Cluster Analysis of Bacterial Vaginosis-associated Microflora and Pelvic Inflammatory Disease. *American Journal of Epidemiology*, 162, 585-590.

- [256] **Neumann M**, Schulze-Robbecke R, Hagenau C, Behringer K. (1997). Comparison of methods for isolation of mycobacteria from water. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 547-552.
- [257] **Nguyen H**, Altinger J, Carrieri-Kohlman V, Gormley J, Paul S, Stulbarg M. (2003). Factor Analysis of Laboratory and Clinical Measurements of Dyspnea in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Journal of Pain and Symptom Management*, 25, 118-127.
- [258] **Nguyen L**, Pieters J. (2005). The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Trends Cell Biol.*, 15, 269-276.
- [259] **Niedecken HW**. (1984). Swimming pool granuloma--an atypical mycobacterial infection]. *Hautarzt*, 35 (7), 373-376.
- [260] **Nilsen CT**, Andersen AB. (2009). Hypercalcemia and renal failure in a case of disseminated *Mycobacterium marinum* infection. *European Journal of Internal Medicine*, 20, e29-e31.
- [261] **Noeden A**, Linell F. (1951). A New Type of Pathogenic Mycobacterium. *Nature*, 10, 826.
- [262] **O'Brien RJ**, Geiter LJ, Snider DE Jr. (1987). The Epidemiology of Nontuberculous Mycobacterial Diseases in the United States. Results from a National Survey. *American Review of Respiratory Disease*, 135 (5), 1007-1014.
- [263] **Olivier KN**, Weber DJ, Wallace RJ, Jr., Faiz AR, Lee JH, Zhang Y, Brown-Elliott BA, Handler A, Wilson RW, Schechter MS, Edwards LJ, Chakraborti S, and Knowles MR. (2003). Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 167, 828-834.
- [264] **Olivier KN**, Weber DJ, Lee JH, Handler Tudor AG, Molina PL, Tomaszefski J, and Knowles MR. (2003). Nontuberculous mycobacteria. II: nested-cohort study of impact on cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 167, 835-40.
- [265] **Olsen RJ**, Cernoch PL, Land GA. (2006). Mycobacterial synovitis caused by slow-growing nonchromogenic species: eighteen cases and a review of the literature. *Arch Pathol Lab Med.*, 130, 783-791.
- [266] **Olson NR**. (1981). Nontuberculous mycobacterial infections of the face and neck-practical considerations. *Laryngoscope*, 91, 1714-1726.
- [267] **Ottenhoff TH**, Verreck FA, Lichtenauer-Kaligis EG, Hoeve MA, Sanal O, van Dissel JT. (2002). Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae. *Nat Genet.*, 32, 97-105.
- [268] **Pai HH**, Chen WC, Peng CF. (2003). Isolation of non-tuberculous mycobacteria from hospital cockroaches (*Periplaneta americana*). *J Hosp Infect.*, 53, 224-228.
- [269] **Panagiotou M**, Papaioannou AI, Kostikas K, Paraskeua M, Velentza E, Kanellopoulou M, Filaditaki V, Karagiannidis N. (2014). The Epidemiology of

Pulmonary Nontuberculous Mycobacteria: Data from a General Hospital in Athens, Greece, 2007–2013. *Pulmonary Medicine*.

- [270] **Panesar J**, Higgins K, Daya H, Forte V, Allen U. (2003). Nontuberculous mycobacterial cervical adenitis: a ten-year retrospective review. *Laryngoscope*, 113, 149-154.
- [271] **Papaioannou A**, Karamanis G, Rigas I, Spanos T, Roupa Z. (2009a). Determination and Modelling Clinical Laboratory Data of Healthy Individuals and End-Stage Renal Failure Patients. *Cent. Eur. J. Med.*, 4(1), 37-48.
- [272] **Papaioannou A**, Rigas N, Rigas G, Paliatsos AG, Nastos PT, Plageras P, Roupa Z, Kakavas KV, Dovrki E. (2009b). Multivariate Statistical Interpretation of Soil Quality Data in the Context of Public Health. *Fresenius Environmental Bulletin*, 18 (2), 204-2012.
- [273] **Papaioannou A**, Mavridou A, Hadjichristodoulou C, Papastergiou P, Pappa O, Dovrki E, Rigas I. (2010a). Application of multivariate statistical methods for groundwater physicochemical and biological quality assessment in the context of public health. *Environ Monit Assess*, 170, 87–97.
- [274] **Papaioannou A**, Dovrki E, Rigas N, Plageras P, Rigas I, Kokkora M, Papastergiou P. (2010b). Assessment and Modelling of Groundwater Quality Data by Environmetric Methods in the Context of Public Health. *Water Resources Management*, 24 (12), 3257-3278.
- [275] **Parashar D**, Chauhan D, Sharma SVD, Chauhan A, Chauhan SVS, Katoch VM. (2004). Optimization of Procedures for Isolation of Mycobacteria from Soil and Water Samples Obtained in Northern India. *Applied And Environmental Microbiology*, 70, 3751–3753.
- [276] **Parashar D**, Das R, Chauhan DS, Sharma VD, Lavania M, Yadav VS, Chauhan SVS, Katoch VM. (2009). Identification of environmental mycobacteria isolated from Agra, north India by conventional & molecular approaches. *Indian J Med Res*, 129, 424-431.
- [277] **Parker BC**, Ford MA, Gruft H, Falkinham III JO. (1983). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. IV. Preferential aerosolization of *Mycobacterium intracellulare* from natural waters. *American Review of Respiratory Disease*, 128 (4), 652-656.
- [278] **Parrish N**, Osterhout G, Dionne K, Sweeney A, Kwiatkowski N, Carroll K, Jost KC Jr, Dick J. (2007). A Rapid, Standardized, Susceptibility Method for *Mycobacterium tuberculosis* using Mycolic Acid Analysis. *J Clin Microbiol.*, 45, 3915-3920.
- [279] **Paull A**. (1973). An environmental study of the opportunist mycobacteria. *Med Lab Technol.*, 30 (1), 11–19.
- [280] **Pavlik I**, Matlova L, Gilar M, Bartl J, Parmova I, Lysak F, et al. (2007). Isolation of conditionally pathogenic mycobacteria from the environment of one pig farm and the effectiveness of preventive measures between 1997 and 2003. *Veterinarni Medicina*, 52 (9), 392-404.

- [281] **Pena JA**, Ferraro MJ, Hoffman CG, Branda JA. (2012). Growth Detection Failures by the Nonradiometric Bactec MGIT 960 Mycobacterial Culture System. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (6), 2092-2095.
- [282] **Penn R**, Steehler MK, Sokohl A, Harley EH. (2011). Nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis - A review and proposed classification system. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 75, 1599–1603.
- [283] **Peters M**, Muller C, et al. (1995). Isolation of Atypical Mycobacteria from Tap Water in Hospitals and Homes: Is This a Possible Source of Disseminated MAC Infection in AIDS Patients? *Journal of Infection*, 31, 39-44.
- [284] **Pfister P**, Jenni S, Poehlsgaard J, Thomas A, Douthwaite S, Ban N, Bottger EC. (2004). The structural basis of macrolide-ribosome binding assessed using mutagenesis of 23S rRNA positions 2058 and 2059. *J Mol Biol.*, 342, 1569-1581.
- [285] **Phillips MS**, von Reyn CF. (2001). Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clin Infect Dis.*, 33, 1363-1374.
- [286] **Pinner M**. (1935). Atypical Acid-fast Microorganisms. III. Chromogenic Acid-fast Bacilli from Human Beings. *American Review of Tuberculosis and Pulmonary Diseases*, 32, 424-439.
- [287] **Pittet B**, Montandon D, Pittet D. (2005). Infection in breast implants. *Lancet Infect Dis*, 5, 94-106.
- [288] **Polesky A**, Grove W, Bhatia G. (2005). Peripheral tuberculous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, treatment, and outcome. *Medicine (Baltimore)*, 84, 350-362.
- [289] **Portaels F**. (1995). Epidemiology of Mycobacterial Diseases. *Clinics in Dermatology*, 13, 207-222.
- [290] **Poupard J**, Gagnon B, Stanhope M, Stewart C. (2002). Methods for Data Mining from Large multinational Surveillance Studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 2409-2419.
- [291] **Primm TP**, Lucero CA, Falkinham JO 3rd. (2004). Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.*, 17, 98-106.
- [292] **Prince DS**, Peterson DD, Steiner RM, Gottlieb JE, Scott R, Israel HL, Figueroa HG, Fish JE. (1989). Infection with *Mycobacterium avium* complex in patients with predisposing conditions. *N Engl J Med*, 321, 863-868.
- [293] **Pumberger W**, Hallwirth U, Pawlowsky J, Pomberger G. (2004). Cervicofacial lymphadenitis due to atypical mycobacteria: a surgical disease. *Pediatr Dermatol.*, 21, 24-29.
- [294] **Radomski N**, Cambau E, Moulin L, Haenn S, Moilleron R, Lucas FS. (2010). Comparison of culture methods for isolation of nontuberculous mycobacteria from surface waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (11), 3514-3520.

- [295] **Radomski N**, Lucas FS, Moilleron R, Cambau E, Haenn S, Moulin L. (2010). Development of a Real-Time qPCR Method for Detection and Enumeration of Mycobacterium spp. In Surface Water. Applied and Environmental Microbiology, 76 (21), 7348-7351.
- [296] **Rajasekaran K**, Krokovitz P. (2013). Enlarged Neck Lymph Nodes in Children. Pediatr Clin N Am, 60, 923-936.
- [297] **Ranger BS**, Mahrous EA, Mosi L, Adusumilli S, Lee RE, Colorni A, Rhodes M, Small PL. (2006). Globally distributed mycobacterial fish pathogens produce a novel plasmid-encoded toxic macrolide, mycolactone F. Infect Immun., 74, 6037-6045.
- [298] **Rastogi N**, et al. (1995). French Multicenter Study Involving Eight Test Sites for Radiometric Determination of Activities of 10 Antimicrobial Agents against Mycobacterium avium Complex. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 39 (3), 638-644.
- [299] **Ricaldi JN**, Guerra H. (2008). A simple and improved method for diagnosis of tuberculosis using hypertonic saline and sodium hydroxide to concentrate and decontaminate sputum. Trop Doct., 38, 97-99.
- [300] **Ringuet H**, Honore AK, Varnerot A, Vincent V, Berche P, Gaillard JL, Pierre-Audigier C. (1999). hsp65 Sequencing for Identification of Rapidly Growing Mycobacteria. Journal of Clinical Microbiology, 37 (3), 852-857.
- [301] **Ristola MA**, von Reyn CF, Arbeit RDS, Soini H, Lumio J, Ranki A, et al. (1999). High rates of disseminated infection due to non-tuberculous mycobacteria. J Clin Pathol, 52, 629-635.
- [302] **Robbe-Austerman S**, Bravo DM, Harris B. (2013). Comparison of the MGIT 960, BACTEC 460 TB and solid media for isolation of Mycobacterium bovis in United States veterinary specimens. BMC Veterinary Research, 9, 74.
- [303] **Robson CD**, Hazra R, Barnes PD, Robertson RL, Jones D, Husson RN. (1999). Nontuberculous mycobacterial infection of the head and neck in immunocompetent children: CT and MR findings. AJNR Am J Neuroradiol. 20, 1829-1835.
- [304] **Rodriguez B**, Holzinger KA, Le LH, Winkle RK, Allen RD. (2006). Mycobacterium chelonae keratitis after laser-assisted subepithelial keratectomy. J Cataract Refract Surg., 32, 1059-1061.
- [305] **Rodriguez-Blanco I**, Fernandez LC, et al. (2011). Mycobacterium chelonae Infection Associated with Tattoos. Acta Derm Venereol, 91, 61-106.
- [306] **Rogall T**, Wolters J, Flohr T, Bottger EC. (1990). Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus Mycobacterium. Int J Syst Bacteriol., 40, 323-330.
- [307] **Romano MI**, Amadio A, Bigi F, Klepp L, Etchechoury I, Llana MN, Morsella C, Paolicchi F, Pavlik I, Bartos M, Leao SC, Cataldi A. (2005). Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of Mycobacterium avium complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America. Vet Microbiol., 110, 221-237.

- [308] **Rosenblueth M**, Martinez-Romero JC, Reyes-Prieto M, Rogel MA, Martinez-Romero E. (2011). Environmental Mycobacteria: A Threat to Human Health? *DNA and Cell Biology*, 30 (9), 633–640.
- [309] **Rosenzweig DY**. (1979). Pulmonary mycobacterial infections due to *Mycobacterium intracellulare-avium* complex. Clinical features and course in 100 consecutive cases. *Chest*, 75 (2), 115-119.
- [310] **Rosenzweig DY**. (1980). Atypical" mycobacterioses. *Clin Chest Med.*, 1 (2), 273-284.
- [311] **Rosenzweig DY**, Schlueter DP. (1981). Spectrum of clinical disease in pulmonary infection with *Mycobacterium avium-intracellulare*. *Rev Infect Dis.*, 3 (5), 1046-1051.
- [312] **Rosenzweig DY**. (1984). Emerging importance of infections due to the *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. *N Y State J Med.*, 84 (6), 290.
- [313] **Rosenzweig DY**. (1996). Nontuberculous mycobacterial disease in the immunocompetent adult. *Semin Respir Infect.*, 11 (4), 252-261.
- [314] **Roth A**, Reischl U, Streubel A, Naumann L, Kroppenstedt RM, Habicht M, Fischer M, Mauch H. (2000). Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. *J Clin Microbiol.*, 38, 1094-1104.
- [315] **Roux AL**, Catherinot E, Ripoll F, Soismier N, Macheras E, Ravilly S, et al. (2009). Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in France. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(12), 4124-4128.
- [316] **Ruiz M**, Rodriguez JC, Escribano I, Garcia-Martinez J, Rodriguez-Valera F, Royo G. (2001). Application of molecular biology techniques to the diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *APMIS*, 109, 857-864.
- [317] **Ruiz P**, Gutierrez J, Zerolo FJ, Casal M. (2002). GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species Isolated from Human Clinical Samples by using Liquid Medium. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (8), 3076-3078.
- [318] **Runyon EH**. (1959). Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *The Medical clinics of North America*, 43 (1), 273-290.
- [319] **Russell CD**, Claxton P, Doig C, Seagar AL, Rayner A, Laurenson IF. (2014). Non-tuberculous mycobacteria: a retrospective review of Scottish isolates from 2000 to 2010. *Thorax*, 69, 593-595.
- [320] **Russo C**, Tortoli E, Menichella D. (2006). Evaluation of the new GenoType Mycobacterium assay for identification of mycobacterial species. *J Clin Microbiol.*, 44, 334-339.
- [321] **Ryan P**, Bennett MW, Aarons S, Shanahan F. (2002). PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection. *Gut.*, 51, 665–670

- [322] **Ryll R**, Kumazawa Y, Yano I. (2001). Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid-containing glycolipids-a review. *Microbiol Immunol.*, 45, 801-811.
- [323] **Saito H**, Tsukamura M. (1976). *Mycobacterium intracellulare* from Public Bath Water. *Japan J Microbiol.*, 20 (6), 561-563.
- [324] **Saitz EW**. (1981). Cervical lymphadenitis caused by atypical mycobacteria. *Pediatr Clin North Am.*, 28, 823.
- [325] **Sampaio JL**, Chimara E, Ferrazoli L, et al. (2006). Application of four molecular typing methods for analysis of *Mycobacterium fortuitum* group strains causing post-mammoplasty infections. *Clin Microbiol Infect.*, 12, 142-149.
- [326] **Santos R**. et al. (2005). Detection and identification of mycobacteria in the Lisbon water distribution system. *Water Science and Technology*, 52, 177.
- [327] **Sartain MJ**, Slayden RA, Singh KK, Laal S, Belisle JT. (2006). Disease state differentiation and identification of tuberculosis biomarkers via native antigen array profiling. *Mol Cell Proteomics*, 5, 2102-2113.
- [328] **Schaible UE**, Kaufmann SH. (2004). Iron and microbial infection. Review. *Nat Rev Microbiol.*, 2, 946-953.
- [329] **Schulz S**, Cabras AD, Kremer M, Weirich G, Miethke T, Bosmuller HC, Hofler H, Werner M, Fend F. (2005). Species identification of mycobacteria in paraffin-embedded tissues: frequent detection of nontuberculous mycobacteria. *Mod Pathol.*, 18, 274-282.
- [330] **Schulze-Robbecke R**, Weber A, Fischeder R. (1991). Comparison of decontamination methods for the isolation of mycobacteria from drinking water samples. *J. Microbiol. Methods* 14, 177-183.
- [331] **Schulze-Robbecke R**, Buchholtz K. (1992a) Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), 1869-1873.
- [332] **Schulze-Röbbecke R**, Janning B, & Fischeder R. (1992b). Occurrence of mycobacteria in biofilm samples. *Tuberculosis and Lung Disease*. 73(3), 141-144.
- [333] **Schwabacher H**. (1959). A strain of mycobacterium isolated from skin lesions of a cold-blooded animal, *Xenopus laevis*, and its relation to atypical acid-fast bacilli occurring in man. *Journal of Hygiene*, 57 (1), 57-67.
- [334] **Schwartz T**, Kalmbach S, Hoffmann S, Szewzyk U, Obst U. (1998). PCR-based detection of mycobacteria in biofilms from a drinking water distribution system. *Journal of Microbiological Methods*, 34, 113-123.
- [335] **Seagar AL**, Prendergast C, Emmanuel FX, Rayner A, Thomson S, Laurenson IF. (2008). Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct assay for the simultaneous detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and four atypical mycobacterial species in smear-positive respiratory specimens. *Journal of Medical Microbiology*, 57, 605-611.

- [336] **Sebakova H.** et al. (2008). Incidence of nontuberculous mycobacteria in four hot water systems using various of disinfection. *Can. J. Microbiol.*, 54, 891.
- [337] **Semret M,** Bakker D, Smart N, Olsen I, Haslov K, Behr MA. (2006). Genetic analysis of *Mycobacterium avium* complex strains used for producing purified protein derivatives. *Clin Vaccine Immunol.*, 13, 991-996.
- [338] **September SM,** Brozel VS, Venter SN. (2004). Diversity of Nontuberculoïd Mycobacterium Species in Biofilms of Urban and Semiurban Drinking Water Distribution Systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 7571-7573.
- [339] **Shaarawy H,** Elhawary AT. (2014). Risk factors for atypical mycobacterial disease in patients with smear positive pulmonary TB. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*, 63, 657-661.
- [340] **Shah SS,** McGowan JP, Klein RS, Converse PJ, Blum S, Gourevitch MN. (2006). Agreement between Mantoux skin testing and QuantiFERON-TB assay using dual mycobacterial antigens in current and former injection drug users. *Med Sci Monit.*, 12, MT11-6.
- [341] **Showalter SG,** Wolinsky E. (1974). Water as a source of pathogenic mycobacteria. *American Review of Respiratory Disease*, 109, 710.
- [342] **Sharma S,** Sachdeva P, Viridi JS. (2003). Emerging water-borne pathogens. *Appl Microbiol Biothchnol*, 61, 424-428.
- [343] **Sharma SK,** Mohan A. (2004). Multidrug-resistant tuberculosis. *Indian J Med Res.*, 120, 354-376.
- [344] **Shivannavar CT,** et al. (1996). Determination of Micobacterial Phylogeny on the Basis of Immunological Relatedness of Superoxide Dismutases. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46 (4), 1164-1169.
- [345] **Shrestha NK,** Tuohy MJ, Hall GS, Reischl U, Gordon SM, Procop GW. (2003). Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. *J Clin Microbiol.*, 41, 5121-5126.
- [346] **Simons S,** van Ingen J, Hsueh PR, van Hung N, Dekhuijzen PNR, Boeree MJ, van Soolingen D. (2011). Nontubercuous Mycobacteria in Respiratory Tract Infections, Eastern Asia. *Emerging Infectious Diseases*, 17 (3), 343.
- [347] **Singh AK,** Maurya AK, Umrao J, Kant S, et al. (2013). Role of GenoType® Mycobacterium Common Mycobacteria/Additional Species Assay for Rapid Differentiation between Mycobacterium tuberculosis Complex and Different Species of Non-tuberculous Mycobacteria. *Journal of Laboratory Physicians*, 5 (2), 83.
- [348] **Singh KP,** Malik A, Sinha S. (2005). Water Quality Assessment and Apportionment of Pollution Sources of Gomti River (India) Using Multivariate Statistical Techniques: A Case Study. *Anal. Chim. Acta*, 538, 355-374.
- [349] **Singleton P.** (1997). In: *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine*, (4th Edition). John Wiley & Sons Ltd., London.

- [350] **Slosarek M**, Kubin M, Pokorny J. (1994). Water as a possible factor of transmission in mycobacterial infections. *Central European Journal of Public Health*, 2 (2), 103-105.
- [351] **Sniadack DH**, Ostroff SM, Karlix MA, Smithwick RW, Schwartz B, Sprauer MA, Silcox VA, Good RC. (1993). A nosocomial pseudo-outbreak of *Mycobacterium xenopi* due to a contaminated potable water supply: lessons in prevention. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 14 (11), 636-641.
- [352] **Sohal JS**, Singh SV, Tyagi P, Subhodh S, Singh PK, Singh AV, Narayanasamy K, Sheoran N, Sandgh KS. (2008). Immunology of mycobacterial infectious: With special reference to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Immunology*, 213, 585-598.
- [353] **Soini H**, Bottger EC, Viljanen MK. (1994). Identification of Mycobacteria by PCR-Based Sequence Determination of the 32-Kilodalton Protein Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (12), 2944-2947.
- [354] **Solyar A**, Lee AS, Przybyszewski B, Lanza DC. (2012). Atypical Mycobacterium Detection in Refractory Chronic Rhinosinusitis. *Otolaryngology – Head and Neck Surgery*, 146 (6), 1012-1016.
- [355] **Sookman L**, Coovadia YM. (2014). A laboratory-based study to identify and speciate non-tuberculous mycobacteria isolated from specimens submitted to a central tuberculosis laboratory from throughout KwaZulu-Natal Province, South Africa. *SAMJ*, 104 (11).
- [356] **Steyaert S**, Stappaerts G, Mareen P, Dierick J. (2011). Soft Tissue Infections with Atypical Mycobacteria in two patients with Inflammatory Rheumatic Diseases using TNF-Inhibitors and / or Leflunomide. *Acta Clinica Belgica: International Journal of Clinical and Laboratory Medicine*, 66 (2), 144-147.
- [357] **Stine TM**, Harris AA, Levin S, Rivera N, Kaplan RL. (1987). A Pseudoepidemic due to Atypical Mycobacteria in a Hospital Water Supply. *JAMA*, 258 (6), 809.
- [358] **Subcommittee of the Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society**. (2000). Management of opportunist mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee guidelines 1999. *Thorax*, 55, 210–218.
- [359] **Takemoto N**, Kohiyama R, Tsuboi J, Sasaki K, Sakurabayashi I, Miyata M. (1996). A case of a patient with postoperative empyema due to *Mycobacterium chelonae*. *Kyobu Geka*, 49, 301-305.
- [360] **Tarantino L**, Giorgio A, de Stefano G, Farella N, Perrotta A, Esposito F. (2003). Disseminated mycobacterial infection in AIDS patients: abdominal US features and value of fine-needle aspiration biopsy of lymph nodes and spleen. *Abdom Imaging*, 28, 602-608.
- [361] **Taylor RH**, Falkinham III JO, Norton CD, Le Chevallier MW. (2000). Chlorine, chloramine, chlorine dioxide and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. (2000). *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (4), 1702-1705.

- [362] **Tebruegge M**, Curtis N. (2011). *Mycobacterium marinum* Infection. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 719.
- [363] **Teixeira HC**, Abramo C, Munk ME. (2007). Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. *J Bras Pneumol.*, 33, 323-34.
- [364] **Telenti A**, Marchesi F., Balz M., et al. (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 175-178.
- [365] **Tenover F**, Arbeit RD, Mickelsen PA, et al. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for strain typing. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 2233-2239.
- [366] **Theodorou DJ**, Theodorou SJ, Kakitsubata Y, Sartoris DJ, Resnick D. (2001). Imaging Characteristics and Epidemiologic Features of Atypical Mycobacterial Infections Involving the Musculoskeletal System. *AJR*, 176, 341-349.
- [367] **Thomas M**, D'Silva JA, Borole AJ, Chilgar RM. (2013). Periprosthetic atypical mycobacterial infection in breast implant: A new kid on the block! *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 66, e16-e19.
- [368] **Thomson R**, Carter R, Gilpin C, Coulter C, Hargreaves M. (2008). Comparison of Methods for Processing Drinking Water Samples for the Isolation of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74 (10), 3094-3098.
- [369] **Thomson RM**, Tolson C, Sidjabat H, Huygens F, Hargreaves M. (2013a). *Mycobacterium abscessus* isolated from municipal water – a potential source of human infection. *BMC Infectious Diseases*, 13, 241.
- [370] **Thomson RM**, Carter R, Tolson C, Coulter C, Huygens F, Hargreaves M. (2013b). Factors associated with the isolation of Nontuberculous mycobacteria (NTM) from a large municipal water system in Brisbane, Australia. *BMC Microbiology*, 13, 89.
- [371] **Thorel MF**, Krichevsky M, Levy-Frebault VV. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol.*, 40, 254-260.
- [372] **Tichenor WS**, Thurlow J, McNulty S, Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Falkinham III JO. (2012). Nontuberculous Mycobacteria in Household Plumbing as Possible Cause of Chronic Rhinosinusitis. *Emerging Infectious Diseases*, 18 (10), 1612-1617.
- [373] **Tobler NE**, Pfunder M, Herzog K, Frey JE, Altwegg M. (2006). Rapid detection and species identification of *Mycobacterium* spp. using real-time PCR and DNA-microarray. *J Microbiol Methods*, 66, 116-124.

- [374] **Tonjum T**, Welty DB, Jantzen E, Small PL. (1998). Differentiation of *Mycobacterium ulcerans*, *M. marinum*, and *M. haemophilum*: mapping of their relationships to *M. tuberculosis* by fatty acid profile analysis, DNADNA hybridization, and 16S rRNA gene sequence analysis. *J Clin Microbiol.*, 36, 918-925.
- [375] **Torkko P**, Suomalainen S, Iivanainen E, Suutari M, Tortoli E, Paulin L, Katila ML. (2000). *Mycobacterium xenopi* and related organisms isolated from stream waters in Finland and description of *Mycobacterium botniense* sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 283-289.
- [376] **Torkko P**, Suomalainen S, Iivanainen E, Suutari M, Paulin L, Ruback E, Tortoli E, Vincent V, Mattila R, Katila ML. (2001). Characterization of *Mycobacterium bohemicum* Isolated from Human, Veterinary, and Environmental Sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (1), 207-211.
- [377] **Tortoli E**. (2003). Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy: the New Mycobacteria of the 1990s. *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (2), 319-354.
- [378] **Tortoli E**, Rindi L, Goh KS, Katila ML, Mariottini A, Mattei R, Mazzarelli G, Suomalainen S, Torkko P, Rastogi N. (2005). *Mycobacterium florentinum* sp. nov., isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 55, 1101-1106.
- [379] **Torvinen E**, Suomalainen S, Lehtola MJ, Miettinen IT, Zacheus O, Paulin L, et al. (2004). Mycobacteria in water and loose deposits of drinking water distribution systems in Finland. *Applied and environment Microbiology*, 70 (4), 1973-1981.
- [380] **Torvinen E**, Lehtola MJ, Martikainen PJ, Miettinen IT. (2007). Survival of *Mycobacterium avium* in Drinking Water Biofilms as Affected by Water Flow Velocity, Availability of Phosphorus, and Temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (19), 6201-6207.
- [381] **Tsintzou A**, Vantarakis A, Pagonopoulou O, Athanassiadou A, Papapetropoulou M. (2000). Environmental mycobacteria in drinking water before and after replacement of the water distribution network. *Water, Air, and Soil Pollution*, 120, 273-282.
- [382] **Tsitko I**, Rahkila R, Priha O, Ali-Vehmas T, Terefework Z, Soini H, Salkinoja-Salonen MS. (2006). Isolation and automated ribotyping of *Mycobacterium lentiflavum* from drinking water distribution system and clinical specimens. *FEMS Microbiol Lett.*, 256, 236-243.
- [383] **Tuffley RE**, Holbeche JD. (1980). Isolation of the *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare*-*M. scrofulaceum* complex from tank water in Queensland, Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(1), 48-53.
- [384] **Tzen CY**, Wu TY, Tzen CY. (2006). Detection of mycobacteria in Crohn's disease by a broad spectrum polymerase chain reaction. *J Formos Med Assoc.*, 105, 290-298.

- [385] **Vacher S**, Pellegrin JL, Leblanc F, Fourche J, Maugein J. (1999). Comparative antimycobacterial activities of ofloxacin, ciprofloxacin and grepafloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44, 647-652.
- [386] **Vaerewijck MJM**, Huys G, Palomino JC, Swings J, Portaels F. (2005). Mycobacteria in drinking water distribution systems: Ecology and significance for human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 911-934.
- [387] **Viallier J**, Viallier G. (1973a). Distribution of mycobacteria in nature. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, 53 (4), 361-371.
- [388] **Viallier J**, **Viallier G**. (1973b). An inventory of naturally-occurring mycobacteria. *Ann Soc Belg Med Trop.*, 53 (4), 361-71.
- [389] **Viallier J**, Joubert L. (1974). Tuberculosis and mycobacterioses: From animals to man. *Lyon Medical.*, 232, 597-602.
- [390] **Viallier J**, Viallier G. (1982). Does the operation of nuclear power plants modify the mycobacterial flora in the water. *Cah. Lab. Hydrobiol. Montereau.*, 14, 55-60.
- [391] **Van Coppentraet ESB**, Lindeboom JA, Prins JM, Peeters MF, Claas ECJ, Kuijper EJ. (2004). Real-Time PCR Assay Using Fine-Neeble Aspirates and Tissue Biopsy Specimens for Rapid Diagnosis of Mycobacterial Lymphadenitis in Children. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (6), 2644-2650.
- [392] **van de Vosse E**, Lichtenauer-Kaligis EG, van Dissel JT, Ottenhoff TH. (2003). Genetic variations in the interleukin-12/interleukin-23 receptor (beta1) chain, and implications for IL-12 and IL-23 receptor structure and function. *Immunogenetics*, 54, 817-829.
- [393] **van de Vosse E**, de Paus RA, van Dissel JT, Ottenhoff TH. (2005). Molecular complementation of IL-12Rbeta1 deficiency reveals functional differences between IL-12Rbeta1 alleles including partial IL-12Rbeta1 deficiency. *Hum Mol Genet.*, 14, 3847-3855.
- [394] **Vanderginste B**, Massart DL, Buydens L, De Jong S, Lewi P, Smeyers-Verbeke J. (1998). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. Elsevier, Amsterdam.
- [395] **Vantarakis A**, Tsintzou A, Diamandopoulos A, Papapetropoulou M. (1998). Non-Tuberculosis Mycobacteria in Hospital Water Supplies. *Water, Air, and Soil Pollution*, 104, 331-337.
- [396] **Vernet G**, Jay C, Rodrigue M, Troesch A. (2004). Species differentiation and antibiotic susceptibility testing with DNA microarrays. *J Appl Microbiol.*, 96, 59-68.
- [397] **Vogt W**, Nagel D. (1992). Cluster Analysis in Diagnosis. *Clin. Chem.*, 38, 182-198.
- [398] **von Reyn CF**, Marlow JN, Arbeit RD, Barber TW, Falkinham JO. (1994). Persistent colonisation of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *The Lancet*, 343 (8906), 1137-1141.

- [399] **von Reyn CF**, Arbeit RD, Horsburgh CR, Ristola MA, Waddell RD, Tvaroha SM, Samore M, Hirschhorn LR, Lumio J, Lein AD, Grove MR, Tosteson AN. (2002). Sources of disseminated *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *J Infect*, 44, 166-170.
- [400] **Vordermeier HM**, Brown J, Cockle PJ, Franken WP, Arend SM, Ottenhoff TH, Jahans K, Hewinson RG. (2007). Assessment of cross-reactivity between *Mycobacterium bovis* and *M. kansasii* ESAT-6 and CFP-10 at the T-cell epitope level. *Clin Vaccine Immunol.*, 14, 1203-1209.
- [401] **Vu TT**, Daniel SJ, Quach C. (2005). Nontuberculous mycobacteria in children: a changing pattern. *J Otolaryngol.*, 34 (Suppl 1), S40-S44.
- [402] **Wagner D**, Young LS. (2004). Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. *Infection.*, 32, 257-270.
- [403] **Wallace R**, Brown BA, Griffith DE. (1998). Nosocomial outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 52, 453-490.
- [404] **Wayne LG, Doubek JR, Russel RL. (1964)**. Classification and identification of mycobacteria. I. Tests employing tween 80 as substrate. *American Review of Respiratory Disease*, 90, 588.
- [405] **WAYNE LG. (1966)**. Classification and identification of mycobacteria. 111. Species within group 111. *American Review of Respiratory Disease*, 93, 9-928.
- [406] **Wayne LG**, Good RC. (1985). The "Atypical" Mycobacteria: Recognition and Disease Association. *CRC critical Reviews in Microbiology*, 12 (3), 185-222.
- [407] **Wayne LG**, Good RC, Tsang A, Butler R, Dawson D, Groothuis D, Gross W, Hawkins J, Kilburn J, Kubin M. (1993). Serovar determination and molecular taxonomic correlation in *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*: a cooperative study of the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int J Syst Bacteriol.*, 43, 482-489.
- [408] **Wendt SL**, George KL, Parker BC, Gruft H, Falkinham III JO. (1980). Epidemiology of infection by nontuberculous Mycobacteria. III. Isolation of potentially pathogenic mycobacteria from aerosols. *American Review of Respiratory Disease.*, 122(2), 259-263.
- [409] **Whiley H**, Keegan A, Giglio S, Bentham R. (2012). *Mycobacterium avium* complex – the role of potable water in disease transmission. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 223–232.
- [410] **WHO (1986)**. Correlation between coastal water quality and health effects: Report of a joint WHO/UNEP meeting. Follonica, 21-25 October 1985. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, WHO/EURO document ICP/CEH 001 M06.
- [411] **WHO (2003)**. Emerging Issues in Water and Infectious Disease. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [412] **WHO (2004a)**. Guidelines for drinking-water quality. 3rd ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

- [413] **WHO (2004b)**. Pedley S, Bartram J, Rees G, Dufour A, Cotruvo JA. Pathogenic Mycobacteria in Water.
- [414] **Wilson RW**, Steingrube VA, Bottger EC, et al. (2001). Mycobacterium immunogenum sp. Nov., a novel species related to contaminated metalworking fluids: an international cooperative study on mycobacterial taxonomy. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 1751-1764.
- [415] **Winthrop KL**, Varley CD, Sullivan A, Hopkins RS. (2012). Photo Quiz. Happy buddha? *Clin Infect Dis.*, 54 (11), 1670-1671.
- [416] **Wolinsky E**, Smith MM, Mitchel RS, Steenken WJr. (1957). Atypical chromogenic Mycobacteria associated with Pulmonary Disease. Including a Report of Three Cases. *American Review of Tuberculosis and Pulmonary Diseases*, 75 (2), 180-198.
- [417] **Wolinsky E. (1979)**. Nontuberculous Mycobacteria and Associated Diseases. *American Review of Respiratory Disease*, 119 (1), 107-159.
- [418] **Wolinsky E. (1992)**. Mycobacterial diseases other than tuberculosis. *Clin Infect Dis.*, 15, 1-10.
- [419] **Wolinsky E. (1995)**. Mycobacterial lymphadenitis in children: a prospective study of 105 nontuberculous cases with long-term follow-up. *Clin Infect Dis.*, 20, 954-963.
- [420] **Wong AK**, Lam DS. (1998). Mycobacterium chelonae keratitis: report of a case and review of the literature. *Yan Ke Xue Bao*, 14 (3), 156-163.
- [421] **Wouter H.** et al. (2013). The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J*, 42, 1604-1613.
- [422] **Wright EP**, Collins CH, Yates MD. (1985). Mycobacterium xenopi and Mycobacterium kansasii in a hospital water supply. *Journal of Hospital Infection*, 6, 175-178.
- [423] **Wu X**, Zhang J, Liang J, Lu Y, Li H, Li C, Yue J, Zhang L, Liu Z. (2007). Comparison of three methods for rapid identification of mycobacterial clinical isolates to the species level. *J Clin Microbiol.*, 45, 1898-1903.
- [424] **Xiong L**, Kong F, Yang Y, Cheng J, Gilbert GL. (2006). Use of PCR and reverse line blot hybridization macroarray based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences for rapid identification of 34 mycobacterium species. *J Clin Microbiol.*, 44, 3544-3550.
- [425] **Yamada-Noda M**, Ohkusu K, Hata H, Shah MM, Nhung PH, Sun XS, Hayashi M, Ezaki T. (2007). Mycobacterium species identification-a new approach via dnaJ gene sequencing. *Syst Appl Microbiol.*, 30, 453-462.
- [426] **Yeboah-Manu D**, Bodmer T, Mensah-Quainoo E, Owusu S, Ofori-Adjei D, Pluschke G. (2004). Evaluation of decontamination methods and growth media for primary isolation of Mycobacterium ulcerans from surgical specimens. *J Clin Microbiol.*, 42, 5875-5876.

- [427] **Yee D**, Valiquette C, Pelletier M, Parisien I, Rocher I, Menzies D. (2003). Incidence of serious side effects from first-line antituberculosis drugs among patients treated for active tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.*, 167, 1472-1477.
- [428] **Yip MJ**, Porter JL, Fyfe JA, Lavender CJ, Portaels F, Rhodes M, Kator H, Coloni A, Jenkin GA, Stinear T. (2007). Evolution of *Mycobacterium ulcerans* and other mycolactone-producing mycobacteria from a common *Mycobacterium marinum* progenitor. *J Bacteriol.*, 189, 2021-2029.
- [429] **Youmans GP**. (1958). *Bull. Un. int. Tuberc.*, 28, p. 128.
- [430] **White MP**, Bangash H, Goel KM, Jenkins PA. (1986). Non-tuberculous mycobacterial lymphadenitis. *Arch Dis Child.*, 61 (4), 368-371.
- [431] **Scarlata G**, Pellerito AM, Di Benedetto M, et al. (1985). Isolation of *Mycobacteria* from drinking water in Palermo. *Boll Ist Sieroter Milan*, 64 (6), 479-482.

Ελληνόγλωσση Βιβλιογραφία

- [432] **Γερογιάννη Ε**, Παπαλά Μ, Γουργουλιάνης ΚΙ. (2008). Άτυπα μυκοβακτηρίδια. Επιδημιολογικά και διαγνωστικά κριτήρια και θεραπευτικές προσεγγίσεις. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής Εταιρείας* 25 (25), 418-431.
- [433] **Δασκαλόπουλος Γ**. (1991). Άτυπα Μυκοβακτηρίδια Στην Ελλάδα. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Διαδικτυακή Βιβλιογραφία

- [434] <http://www.bd.com/ds/productCenter/245113.asp>
- [435] <http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/photo2detail.php?id=187>
- [436] <http://casereports.bmj.com/content/2013/bcr-2013-009159.full.pdf>
- [437] <http://casereports.bmj.com/content/2013/bcr-2013-009159.full.pdf>
- [438] <http://patentsforhumanity.devpost.com/submissions/11132-becton-dickinson-bd-mgit-technology>
- [439] http://cloud.med.nyu.edu/modules/nyu/microbiology/infect-disease/Branched_Rods6.html
- [440] <http://www.slideshare.net/revid/presentacin1-21132552?related=2>
- [441] <http://www.slideshare.net/MicrobeswithMorgan/mycobacteriology>
- [442] <http://www.slideshare.net/cud2018/mycobacteria-practical>
- [443] <http://reference.medscape.com/features/slideshow/mycobacteria>
- [444] <http://www.authorstream.com/Presentation/drnaseelsalim-1341355-nontuberculous-mycobacterial-infections>