

ΕΘΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ  
( Ε.Σ.Δ.Υ.)

ΤΟΜΕΑΣ: Μικροβιολογίας

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Αλ. Βατόπουλος  
ΕΠΙΒΛ. ΣΥΝΕΡΓΑΤΗΣ: Εμμ. Ν. Βελονάκης

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΑΘΗΝΩΝ (ΤΕΙ – Α)

ΤΜΗΜΑ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΙΕΙΝΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ: Υγιεινής & Επιδημιολογίας

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Χαρ. Κουτής

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

### «ΕΦΗΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ», ΕΣΔΥ – ΤΕΙ -Α



" Πιλοτική έρευνα  
απομόνωσης *Legionella* spp  
από φυτόχωμα στην  
περιοχή της Αττικής.



Πιθανή συσχέτιση  
και σημασία για τη  
Δημόσια Υγεία "

ΥΠΟ

**ΙΩΑΝΝΑΣ – ΜΑΡΙΚΑΣ ΚΙΟΥΣΗ**

ΥΓΙΕΙΝΟΛΟΓΟΣ ΤΕ - ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2008

ΕΘΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ

ΑΘΗΝΩΝ (ΤΕΙ – Α)

ΤΟΜΕΑΣ: ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΙΕΙΝΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Αλ. Βατόπουλος

ΤΟΜΕΑΣ: Υγιεινής & Επιδημιολογίας

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΣΥΝΕΡΓΑΤΗΣ: Εμμ. Ν. Βελονάκης

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Χαρ. Κουτής

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΦΗΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»

ΕΣΔΥ – ΤΕΙ -Α

Πιλοτική έρευνα απομόνωσης *Legionella spp*  
από φυτόχωμα στην περιοχή της Αττικής.  
Πιθανή συσχέτιση και σημασία για τη Δημόσια Υγεία.

ΥΠΟ

**ΙΩΑΝΝΑΣ – ΜΑΡΙΚΑΣ ΚΙΟΥΣΗ**

*ΥΓΙΕΙΝΟΛΟΓΟΣ ΤΕ*

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

ΑΘΗΝΑ 2008

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια των σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην

**“ ΕΦΗΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ”**

που απονέμει η Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, σε σύμπραξη με το Τμήμα Δημόσιας Υγιεινής του ΤΕΙ Αθηνών.

Εγκρίθηκε την.....από την εξεταστική επιτροπή:

**ΥΠΟΓΡΑΦΕΣ**

.....  
.....

**ΒΑΘΜΟΣ:**

**ΑΡΙΣΤΗ:.....**

**ΠΟΛΥ ΚΑΛΗ:.....**

**ΚΑΛΗ:.....**

**ΑΠΟΔΕΚΤΗ:.....**

**«ΒΕΒΑΙΩΝΩ ΟΤΙ Η ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΕΙΝΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΔΙΚΗΣ ΜΟΥ ΔΟΥΛΕΙΑΣ ΚΑΙ ΓΡΑΜΜΕΝΗ ΜΕ ΔΙΚΑ ΜΟΥ ΛΟΓΙΑ. ΣΤΙΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ Η΄ ΜΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΗΓΕΣ ΠΟΥ ΑΝΑΦΕΡΩ ΕΧΩ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΕΙ ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΟΠΟΥ ΧΡΕΙΑΖΕΤΑΙ ΚΑΙ ΕΧΩ ΠΑΡΑΘΕΣΕΙ ΤΙΣ ΠΗΓΕΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ»**

**ΒΕΒΑΙΩΝΩ ΟΤΙ Ο ΑΡΙΘΜΟΣ ΛΕΞΕΩΝ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΜΟΥ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΝ ΞΕΠΕΡΝΑ ΤΙΣ 50.000 ΛΕΞΕΙΣ**

**ΥΠΟΓΡΑΦΗ.....**

*Σε ό,τι αγαπώ*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΗΡΙΑ

Για την ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε ένα σύνολο ανθρώπων, που όλοι τους έβαλαν ένα λιθαράκι για την υλοποίησή της.

Συγκεκριμένα, στον Επιστημονικό Υπεύθυνο – Συντονιστή και Καθηγητή Εποπτείας μου, Δρ. Εμμ. Ν. Βελονάκη, Βιοπαθολόγο – Υγιεινολόγο του Τομέα Μικροβιολογίας της ΕΣΔΥ. Η ηθική, υλική και σε βάθος χρόνου συμπαράσταση του ήταν σημαντικότερη, ώστε να μπορέσω να προχωρήσω και να βρεθώ στο σημερινό σκαλί της ζωής μου. Η αμέριστη συμπαράστασή του, μαζί με την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη, που έδειξε στο πρόσωπο μου, κατά την εκπόνηση της εργασίας, μου έδωσαν δύναμη και κουράγιο, ούτως ώστε να επιτευχθεί ένας στόχος, παρά τα συνεχή εμπόδια. Η ιδέα, ο σχεδιασμός των πειραμάτων, οφείλονται σε εκείνον. Η ουσιαστική καθημερινή του συμμετοχή στα πειράματα συνέδραμε στην αποφασιστική ολοκλήρωση της διπλωματικής αυτής εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον υπεύθυνο Καθηγητή του Τομέα Μικροβιολογίας, Αλκ. Βατόπουλο, ο οποίος πάντα με ενδιαφέρουν και διακριτικότητα στεκόταν στο πλευρό μου και χωρίς τις τελικές του παραχωρήσεις του οποίου δεν θα μπορούσε να επιτευχθεί αυτή η πρωτότυπη διπλωματική εργασία.

Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή Εμ. Παπαδογιαννάκη, που με σύστησε στον Καθηγητή Εποπτείας μου και με παρέδωσε σε έναν δεύτερο πατέρα για να εκπληρώσω ένα από τα όνειρα μου, την έρευνα σε ένα πεδίο πολύ ξεχωριστό και την ενασχόλησή μου μέσα σε μικροβιολογικό εργαστήριο.

Τελειώνοντας θα ήθελα να συμπεριλάβω στις ευχαριστίες μου τους γονείς μου, την αδερφή μου και τον σύντροφο μου. Χωρίς την δική τους ηθική στήριξη, που είχα ανάγκη, την προσφορά του χρόνου τους για κάθε βοήθεια που χρειαζόμουν, ακόμη και για τις πολλές μετακινήσεις μου, δεν θα τα είχα καταφέρει.

Τελευταίο, αλλά όχι έσοχατο, ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Χ. Κουτή, ο οποίος από τις προπτυχιακές ακόμη σπουδές μου, όπου είχα την τύχη να του έχω καθηγητή και Προϊστάμενο του Τμήματος Δημόσιας Υγιεινής, στάθηκε συμπαροσάτης και καθοδηγητής σε όλες τις ακαδημαϊκές μου σπουδές.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το τελικό στάδιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος με τίτλο «Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία», που οργανώθηκε από την Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας και το Τμήμα Δημόσιας Υγιεινής του ΑΤΕΙ Αθηνών, είναι η εκπόνηση διπλωματικής εργασίας. Η διπλωματική εργασία κλείνει τον κύκλο του μονοετούς αυτού Προγράμματος και έχει σαν σκοπό την εφαρμογή γνώσεων που αποκτήθηκαν κατά την διάρκειά του.

Ένας χρόνος γεμάτος νέες και ενδιαφέρουσες γνώσεις, πληροφορίες και σημαντικές υπενθυμίσεις, καθώς και εργασίες που σε οδηγούν σε ένα νέο τρόπο σκέψης και έρευνας. Ένας μόχθος για τον αγώνα της γνώσης, που μόνο μία γεύση ευχαρίστησης και πλήρωσης άφησε, καθώς τα αποτελέσματά του είναι πλέον ορατά.

Ήταν μία συνειδητή επιλογή για τον εμπλουτισμό των γνώσεών μου και την δυναμική είσοδό μου στον εργασιακό και επιστημονικό χώρο. Η απόκτηση αυτού του υπόβαθρου θα μου κρατά σταθερά τα βήματα με τις νέες γνώσεις και με την απόκτηση πλέον ορθού τρόπου έρευνας και σκέψης.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε μέσα στο πλαίσιο όσων αναφέρθηκαν παραπάνω και προσδοκώ να έχω καταγράψει σε ικανοποιητικό βαθμό ένα ενδιαφέρον θέμα για όποιον ασχοληθεί μελλοντικά με το ίδιο αντικείμενο.

Με αυτό το τελικό στάδιο του μεταπτυχιακού τίτλου ολοκληρώνονται οι σπουδές του τελευταίου χρόνου και ξεκινάει η αναζήτηση για νέες διαδρομές.

# **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

## **“ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ”**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	16
ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ .....	17

## **«ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ»**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

1.1. Μορφολογικά και λοιπά χαρακτηριστικά βακτηρίου .....	22
1.1.1. βακτήρια της Λεγεωνέλλας.....	25
1.2. Ταξινόμηση .....	27
1.2.1. Ταυτοποίηση αποικιών Λεγεωνέλλας.....	29
1.3. Συμπτώματα νόσου Λεγεωναρίων.....	31

## **«ΔΙΑΓΝΩΣΗ»**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

2.1. Διάγνωση .....	34
2.2. Στοιχεία διάγνωσης.....	37
2.3. Διάγνωση ασθενών με ενδονοσοκομειακή πνευμονία.....	38



2.4. Θεραπεία .....	40
2.5. Εργαστηριακά ευρήματα .....	43

## «ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ»

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1. Γενικά επιδημιολογικά στοιχεία .....	44
3.2. Πως μεταδίδεται .....	53
3.2.1. Λόγοι αύξησης πιθανοτήτων μόλυνσης .....	59

## «ΔΙΑΣΠΟΡΑ *LEGIONELLA* SPP»

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1. Που οφείλεται η ανάπτυξη <i>Legionella</i> spp σε περιβαλλοντικά δείγματα.....	61
4.1.1. Πρότυπα ανίχνευσης Λεγεωνέλλας.....	63
4.2. Σημεία ανεύρεσης <i>Legionella</i> spp (σημεία υγειονομικού ενδιαφέροντος) .....	65
4.3. Χώμα .....	68
4.4. Επιλογή κατάλληλων σημείων για δειγματοληψία.....	75

## «ΠΡΟΛΗΨΗ Κ' ΕΛΕΓΧΟΣ»

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.1. Εισαγωγή.....	77
5.2. Μέτρα πρόληψης.....	77

### “ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ”

## «ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ Κ' ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΕΡΕΥΝΑΣ»

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6.1. Σκοπός .....	83
6.2. Δείγμα μελέτης .....	83
6.2.1. Έρευνα εύρεσης δείγματος .....	84
6.3. Μέθοδος διεξαγωγής έρευνας.....	87
6.4. Προβληματισμοί κατά την διεξαγωγή .....	88
6.4.1. Σύνολο φυτωρίων – ανθοπωλείων – θερμοκηπίων .....	88
6.4.2. Δείγματα μελέτης.....	88
6.4.3. Μεθοδολογία απομόνωσης <i>Legionella</i> spp από φυτόχωμα....	89
6.4.4. Θρεπτικά υλικά.....	89
6.4.5. Βιβλιογραφία .....	90

# «ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ»

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

7.1. Σκοποί και πεδίο εφαρμογής .....	91
7.2. Προφυλάξεις.....	91
7.3. Δειγματοληψία .....	91
7.4. Θρεπτικά υλικά - θρεπτικά υποστρώματα – αντιδραστήρια (υλικά καλλιέργειας) .....	93
7.4.1.BUFFERED CHARCOAL YEAST EXTRACT AGAR MEDIUM (BCYE) .....	93
7.4.2.MODIFIED WADOSKY YEE AGAR (MWY) .....	93
7.4.3.BUFFERED CHARCOAL YEAST EXTRACT AGAR MEDIUM with selective supplements (GVPC) .....	94
7.4.4.Διάλυμα Ringer's (1/4).....	94
7.4.5.ναταμυκίνη ή αλλιώς πιμαρισίνη (natamycin ή pimaricin).....	94
7.5. Ποιοτικός έλεγχος θρεπτικών υλικών και κρίκων επιφανειακής επίστρωσης τρυβλίων.....	95
7.6. Προετοιμασία .....	98
7.6.1. Θρεπτικά υλικά.....	99
A. BCYE .....	99
B. GVPC.....	101
Γ. YEAST EXTRA AGAR .....	102
Δ. Nutrient Agar.....	103

7.6.2. Διάλυμα Ringer's (1/4) .....	105
7.6.3. Ύδωρ αφιονισμένο – αποστειρωμένο (ΥΑΑ) .....	106
7.6.4. Ρυθμιστικό διάλυμα HCL-KCL (0,2μ) .....	106
7.6.5. Προετοιμασία μπουκαλιών δειγμάτων.....	107
7.7. Εξοπλισμός – Υλικά.....	108
7.8. Αρχή της μεθόδου.....	110
7.9. Μέθοδος.....	111
7.9.1. Επεξεργασία δείγματος.....	111
7.9.2. Βασικά βήματα μεθοδολογίας.....	113
7.9.3. Συμπληρωματικά βήματα μεθοδολογίας .....	116
7.9.4. Βαθεία κατάψυξη .....	119
7.9.5. Ενδιάμεσες τροποποιήσεις μεθόδου.....	120

## **«ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΕΡΕΥΝΑΣ»**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8**

8.1. Γενικά στοιχεία.....	122
8.2. Αποτελέσματα έρευνας.....	123
8.3. Ερμηνεία αποτελεσμάτων .....	138

ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	150
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	169
ΕΠΙΛΟΓΟΣ.....	171
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	172
ABSTRACT .....	175
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	177
ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ.....	187
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	189

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 1.</b> Βακτηριολογική κατάταξη <i>Legionella spp</i> .....	29
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 2.</b> Σύγκριση μεθόδων εργαστηριακών διαγνώσεων .....	37
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 3.</b> Πηγή και επιπολασμός Λεγεωνέλλας σε φυτοχώματα Αυστραλίας και Ευρώπη που δημοσιεύτηκαν το 1990 .....	47
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 4.</b> Θερμοκρασίες που επηρεάζουν την επιβίωση του βακτηρίου της Λεγεωνέλλας .....	64
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 5.</b> Είδος χύματος των δειγμάτων (θετικών και αρνητικών για <i>Legionella spp</i> ) που εξετάστηκαν σε περιεκτικότητά τους σε διάφορα συστατικά .....	72

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 6.</b>	Έλεγχος ποιότητας αποστείρωσης ετοιμών τρυβλίων με <i>Legionella selective agar</i> .....	76
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 7.</b>	Έλεγχος ποιότητας αποστείρωσης ετοιμών τρυβλίων με <i>Legionella selective agar</i> με επίστρωση Υ.Α.Α. με τη χρήση κρίκων επιφανειακής επίστρωσης τρυβλίων .....	97
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 8.</b>	Διάγραμμα βασικής ροής μεθοδολογίας απομόνωσης <i>Legionella spp</i> από φυτόχλωμα.....	115
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 9.</b>	Είδος δείγματος και θερμοκρασία του κατά την ώρα δοκιμής.....	123
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 10.</b>	Αποτελέσματα δείγματος 1 .....	124
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 11.</b>	Αποτελέσματα δείγματος 2 .....	125
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 12.</b>	Αποτελέσματα δείγματος 4 .....	126
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 13.</b>	Αποτελέσματα δείγματος 4 (για δεύτερη φορά) .....	127
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 14.</b>	Αποτελέσματα δείγματος 3 .....	127
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 15.</b>	Αποτελέσματα δείγματος 5 .....	128
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 16.</b>	Αποτελέσματα δείγματος 6 .....	129
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 17.</b>	Αποτελέσματα δείγματος 7 .....	129
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 18.</b>	Αποτελέσματα δείγματος 6 (για δεύτερη φορά) .....	130
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 19.</b>	Αποτελέσματα δείγματος 7 (για δεύτερη φορά) .....	131
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 20.</b>	Αποτελέσματα δείγματος 12 .....	132
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 21.</b>	Αποτελέσματα δείγματος 18 .....	132
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 22.</b>	Αποτελέσματα δείγματος 8 .....	132
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 23.</b>	Αποτελέσματα δείγματος 9 .....	133
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 24.</b>	Αποτελέσματα δείγματος 19 .....	133
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 25.</b>	Αποτελέσματα δείγματος 14 .....	133
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 26.</b>	Αποτελέσματα δείγματος 15 .....	134

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 27.</b> Αποτελέσματα δείγματος 16 .....	134
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 28.</b> Αποτελέσματα δείγματος 10 .....	134
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 29.</b> Αποτελέσματα δείγματος 11 .....	135
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 30.</b> Αποτελέσματα δείγματος 13 .....	135
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 31.</b> Αποτελέσματα δείγματος 17 .....	135
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 32.</b> Αποτελέσματα δείγματος 20 .....	136
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 33.</b> Αποτελέσματα δείγματος 21 .....	136
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 34.</b> Αποτελέσματα δείγματος 22 .....	136
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 35.</b> Αποτελέσματα δείγματος 21(για δεύτερη φορά) .....	137
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 36.</b> Αποτελέσματα δείγματος 22(για δεύτερη φορά) .....	137
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 37.</b> Συγκεντρωτικός πίνακας ταυτοποίησης αποικιών <i>Legionella</i> spp από φυτόχωμα .....	141
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 38.</b> Συγκεντρωτικός πίνακας αριθμού αποικιών <i>Legionella</i> spp από φυτόχωμα .....	148
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 39.</b> Απομόνωση αποικιών <i>Legionella</i> spp από χώμα ανάλογα με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος HCL-KCL ή θερμικής επεξεργασίας και ανάλογα με τη χρήση Υ.Α.Α. ή Ringer's solution .....	148
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 40.</b> Είδος και περιεχόμενα (όπου υπάρχουν) ανά θετικό σε <i>Legionella</i> spp δείγμα και αριθμός αποικιών ανά γραμμάριο είδους spp .....	152
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 41.</b> Είκοσι ένα συστατικά για παρασκευή μειγμάτων χώματος κηπουρικής από 2 κατασκευαστές φυτοχωμάτων το 1990 στην Νότια Αυστραλία .....	153

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 42.</b> Πίνακας συνολικής απομόνωσης αριθμού αποικιών <i>Legionella</i> spp στα θρεπτικά υλικά της έρευνας σε αυτήν τη διπλωματική εργασία .....	158
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 43.</b> Πίνακας αριθμού αποικιών Λεγεωνέλλας που αναπτύχθηκαν από διάφορα είδη χώματος και συστατικά για παρασκευή φυτοχωμάτων, το 1990 στην Αυστραλία.....	160
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 44.</b> Πίνακας αποικιών <i>Legionella</i> spp που απομονώθηκαν από φυτοχώματα 6 μεγάλων εταιριών παρασκευής φυτοχωμάτων.....	160
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 45.</b> Στελέχη και είδη <i>Legionella</i> spp που απομονώθηκαν από κομπόστα που προερχόταν από 20 κηπουρούς με δείγματα χώματος θετικά για Λεγεωνέλλα .....	161
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 46.</b> Πίνακας σχέσεων διάφορων θρεπτικών υλικών (agar) με διάφορα αντιβιοτικά .....	165

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>ΣΧΗΜΑ 1.</b> Σχεδιάγραμμα σύγκρισης <i>Legionella</i> spp με <i>Legionella pneumophila</i> και <i>Legionella longbeachae</i> στην Αυστραλία (NSW) από τον Ιανουάριο του 2004 έως τον Σεπτέμβριο του 2008 .....	52
<b>ΣΧΗΜΑ 2.</b> Δήλωση κρουσμάτων <i>Legionella longbeachae</i> για τους κατοίκους της Αυστραλίας (NSW) κατά ηλικιακές ομάδες 5 ετών, φύλο, και μήνα αρχής νόσου των Λεγεωναριών, από 1 Σεπτεμβρίου 2007 έως 31 Αυγούστου 2008.....	52



### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην διπλωματική αυτή εργασία θα μελετηθεί το πιθανό βακτηριακό φορτίο των φυτοχωμάτων με *Legionella* spp. Η έρευνα αφορά φυτώρια, ανθοπωλεία και θερμοκήπια στο Νομό Αττικής που πωλούν, παρασκευάζουν και χρησιμοποιούν (όλα μαζί ή σε συνδυασμό) φυτόχωμα για οικιακή ή και επαγγελματική χρήση. Η σημασία της ερευνητικής αυτής έγκειται στη διερεύνηση του ενδεχομένου το χώμα, και μάλιστα ειδικές κατηγορίες του όπως πχ το φυτόχωμα κλπ, να αποτελεί ενδιαίτημα για τη *Legionella* spp και επομένως δραστηριότητες κηπουρικής ή άλλες επαγγελματικές δραστηριότητες να συνιστούν πηγή μόλυνσης για τον άνθρωπο και επομένως να έχουν σημασία για την Δημόσια Υγεία. Στην περίπτωση αυτή είναι αυτονόητο ότι θα πρέπει να εξετασθούν μέτρα πρόληψης ώστε να προφυλάσσονται όσοι έχουν παρόμοιες δραστηριότητες.

Η πορεία της έρευνας για αυτό το θέμα, έβγαλε πολλές δυσκολίες στην επιφάνεια που δεν ήταν ορατές από την πρώτη ματιά, άγχη και εμπόδια που θα αναλυθούν, ανάλογα, στο κάθε βήμα της διπλωματικής εργασίας. Εν συντομία τα προβλήματα που έπρεπε να αντιμετωπιστούν:

- Εύρεση Μεθοδολογίας απομόνωσης *Legionella* spp από φυτόχωμα
- Επινόηση τροποποίησης Μεθοδολογίας απομόνωσης *Legionella* spp από χώμα
- Εύρεση συμπληρωμένης λίστας όλων των φυτωρίων, ανθοπωλείων και θερμοκηπίων στον Νομό Αττικής

- Εύρεση συμπληρωμένης λίστας όλων των φυτοχωμάτων στον Νομό Αττικής
- Οικονομικά, λόγω ακριβών υλικών για την ταυτοποίηση δημιουργία θρεπτικών υλικών καλλιέργειας για *Legionella* spp
- Μη ύπαρξη βιβλιογραφίας και σχεδόν μόνο μέσω διαδικτύου εύρεση ορισμένων στοιχείων
- Επικοινωνία με επιστήμονες που έχουν ασχοληθεί με το συγκεκριμένο θέμα και την προσφορά γνώσεών τους.
- Εύρεση συμπληρώματος για την δημιουργία θρεπτικού υλικού, που εκτός από το αρκετά υψηλό κόστος του, έπρεπε να αντικαταστεί με άλλο που θα είχε τα ίδια αποτελέσματα αλλά θα ήταν πιο φθηνό και θα προέρχεται από αξιόπιστη χώρα παραγωγής.

Το αποτέλεσμα της διπλωματικής αυτής εργασίας εν κατακλείδι, αντιπροσωπεύει την σκληρή δουλειά, που έδωσε τελικά καρπούς.

## **ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ**

Ένα νέο αερόβιο Gram αρνητικό βακτήριο ανακαλύφθηκε τον Ιανουάριο του 1977, μετά από μεταθανάτια απομόνωση από μολυσμένο πνευμονικό ιστό, για την εύρεση αίτιου ενός ανεξήγητου ξεσπάσματος πνευμονίας το 1976 σε ένα ξενοδοχείο στη Φιλαδέλφεια όπου 221 αρρώστησαν και κατέληξαν οι 34 από αυτούς. Η επιδημική έκρηξη της πνευμονίας έγινε σε Συνέδριο Λεγεωναρίων και για αυτό το νέο βακτήριο που ήταν υπεύθυνο για αυτό το είδος πνευμονίας, το οποίο ανακαλύφθηκε από τον Joseph McDade (από το αμερικάνικο κέντρο ελέγχου



ασθενειών, το γνωστό CDC), ονομάστηκε *Legionella* και συγκεκριμένα *pneumophila*. Η ονομασία του στηρίζεται το πρώτο μέρος της στην ομαδική αυτή μόλυνση των Λεγεωναρίων και το δεύτερο μέρος της έχει ελληνική σημασία όπου σημαίνει φίλος του πνεύμονα και η νόσος ονομάζεται νόσος των Λεγεωναρίων <sup>(1,2,3,4)</sup>.

Η νόσος των Λεγεωναρίων είναι μία πολυσυστηματική ασθένεια που περιλαμβάνει την πνευμονία. Όμως τα βακτήρια της Λεγεωνέλλας είναι υπεύθυνα και για μία αυτοπεριοριζόμενη γρίπη με πυρετό, τον πυρετό Pontiac <sup>(2,3)</sup>. Ακόμα γίνονται έρευνες για αυτήν τη διαφοροποίηση της μόλυνσης σύμφωνα με το με το Διεθνές Συνέδριο που διεξήχθη στις 12 – 13 Ιουνίου του 2006 στο Μπέρμινγχαμ <sup>(1)</sup>.

Στη συνέχεια έγιναν έρευνες για να καθοριστεί εάν υπήρχαν προγενέστερα κάποιες αντίστοιχες επιδημίες με τα εξής αποτελέσματα:

❖ *Legionella pneumophila*:

- 1965: στο νοσοκομείο της Αγίας Ελισάβετ στην Ουάσιγκτον, 81 ασθενής αρρώστησαν με πνευμονία και οι 14 κατέληξαν <sup>(5)</sup>
- 1973: στο Μπένιντορν της Ισπανίας ,από μία ομάδα τουριστών σε διακοπές, πέθαναν 3 <sup>(6)</sup>
- 1974: τον Σεπτέμβριο αυτής της χρονιάς έγινε ένα συνέδριο στο ίδιο ξενοδοχείο με αυτό που έγινε γνωστή η επιδημική έκρηξη πνευμονίας το 1976 όπου υπήρχαν 11 περιπτώσεις βαριάς πνευμονίας με διάγνωση την νόσο των Λεγεωναρίων <sup>(5)</sup>

❖ Πυρετός Pontiac:

- 1968: πρώτη επιδημική έκρηξη αυτού του είδους στο Πόντιακ του Μίτσιγκαν, όπου τουλάχιστον 114 άνθρωποι νόσησαν <sup>(7)</sup>

- 1973: στο Τζέιμς Ρίβερ της Βιρτζίνια, υπήρξαν 5 επιδημικές εκρήξεις από σημειακή πηγή ενός ελαττωματικού κλιματισμού

Και κάποιες σποραδικές περιπτώσεις Λεγεωνέλλωσης:

- ❖ 1943 – 1947 – 1959 <sup>(2,3)</sup>.

Μετά από το 1977 που έγινε η ταυτοποίηση του βακτηρίου της Λεγεωνέλλας, μέσα σε δύο χρόνια έγινε ταυτοποίηση και άλλου είδους Λεγεωνέλλας της *L. micdadei* και στα χρόνια που ακολούθησαν μαζί με την τεχνολογική πρόοδο ταυτοποιήθηκαν και άλλα είδη <sup>(2,3)</sup>. Όλα ως περιβαλλοντική πηγή έχουν το νερό.

Το 1981 ανακαλύφθηκε ένα νέο είδος Λεγεωνέλλας μετά από απομόνωση από έναν ασθενή με πνευμονία που διέμενε στο Λόνγκ Μπίτς της Καλιφόρνια <sup>(8,9,10,11)</sup>. Αυτό το είδος πήρε την ονομασία του από την περιοχή διαμονής του ασθενή αυτού και έτσι στην οικογένεια της Λεγεωνέλλας προστέθηκε και η *L. longbeachae*. Μετά από μικρό χρονικό διάστημα υπήρξε και δεύτερος ορότυπος του ίδιου είδους Λεγεωνέλλας <sup>(12)</sup>. Έγιναν αρκετές προσπάθειες να βρεθεί περιβαλλοντική πηγή για αυτό το είδος. Την πρωτομαγιά του 1987 η ορομάδα 1 αυτού του είδους απομονώθηκε για πρώτη φορά από έναν ασθενή στην Νότια Αυστραλία και στη συνέχεια υπήρξαν άλλες δύο περιπτώσεις τον Οκτώβριο του 1987 και τον Ιούνιο του 1988 <sup>(13)</sup>. Στη συνέχεια ακολούθησαν για την *Legionella longbeachae*:

- ❖ Οκτώβρης 1988: επιδημική έκρηξη από ορομάδα 1 στην νότια Αυστραλία. Μέσα σε 3 μήνες υπήρχαν 23 τέτοιες περιπτώσεις
- ❖ Φεβρουάριος – Απρίλιος – Ιούνιος 1989: σποραδικές περιπτώσεις

- ❖ Από Μάιο 1987 έως Ιούνιο 1989: διάγνωση οροομάδας 1 σε 30 ασθενείς με απομόνωση του βακτηρίου, ορομετατροπή και μέτρηση αντισωμάτων

Είναι σημαντική για τη *L. longbeachae* η έρευνα που έγινε τον Οκτώβρη και το Νοέμβρη του 1988 στο σπίτι ενός ασθενή που είχε επιβεβαιωμένη νόσηση από αυτό το είδος Λεγεωνέλλας. Ελέγχθηκε διεξοδικά ότι θα μπορούσε να προκαλέσει σταγονίδια νερού που θα μπορούσαν να είναι μέρος ανάπτυξης Λεγεωνέλλας και συνεπώς πηγή μόλυνσης. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στη συλλογή νερού από συστήματα ύδρευσης κατασκευασμένα με πολυπροπυλένιο καθώς θεωρήθηκαν υπεύθυνα για την μόλυνση. Όταν όλα τα δείγματα βρέθηκαν αρνητικά, συνέχισε η έρευνα και επεκτάθηκε και σε δείγματα χώματος από τον κήπο του ασθενή. Το προσωπικό του CDC επιπλέον μάζεψε δείγματα χώματος από κήπους ασθενών που είχαν νοσήσει τον Δεκέμβρη του 1988 ή μετά, με επιβεβαιωμένη μόλυνση από *L. longbeachae* με καλλιέργεια ή με ορομετατροπή. Οι ασθενείς αυτοί στο ιατρικό ιστορικό τους έπρεπε:

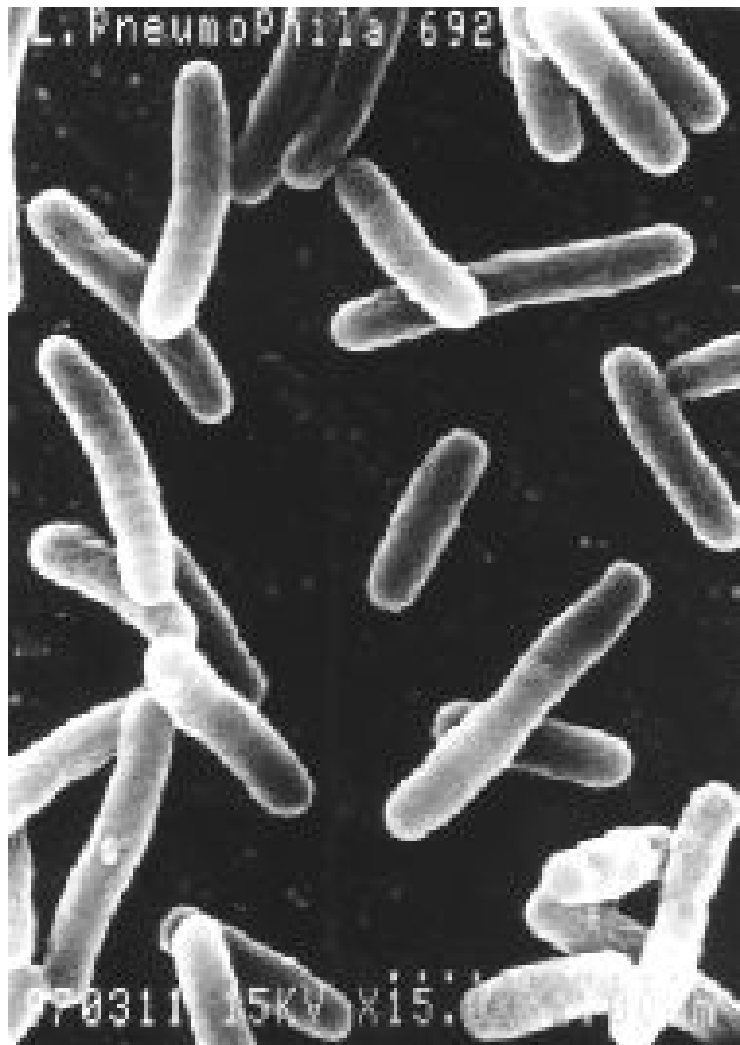
- ❖ να ασχολούνται με κηπουρική
- ❖ να έχουν χρησιμοποιήσει εμπορικά συσκευασμένα φυτοχώματα πριν μολυνθούν

Οι έρευνες αυτές έδειξαν πως η κηπουρική είναι υψηλός κίνδυνος μόλυνσης για τη *L. longbeachae* <sup>(8)</sup>.

Το Δεκέμβριο του 2004, υπήρξε ασθενής με *L. longbeachae*, όπου και κατέληξε, στην Ολλανδία. Αυτό ήταν και αφορμή για το Ολλανδικό Εθνικό Πρόγραμμα Ανίχνευσης Επιδημικών Εκρήξεων (Dutch National Legionella Outbreak Detection Programme = NLODP) να ερευνήσει όλες τις περιπτώσεις

Λεγεωνέλλας από το 1987 στην Ολλανδία, και να βρει άλλες πέντε περιπτώσεις απομόνωσης από 352 πάσχοντες με Λεγεωνέλλα *L. longbeachae*. Οι 3 ασθενείς από τους οποίους είχαν γίνει αυτές οι 5 απομονώσεις κατέληξαν 27 Αυγούστου 2000, 7 Αυγούστου 2000 και 4 Νοεμβρίου 2004 <sup>(14)</sup>.

Από όσο είναι γνωστό σε εμάς αυτή είναι και η πιο πρόσφατη έρευνα που δημοσιεύτηκε σε σχέση με την Λεγεωνέλλα και το φυτόχλωμα και αφορά στην Ευρώπη και έγινε τον Ιανουάριο του 2007, στην Ολλανδία <sup>(14)</sup>.



Εικ.1. Βακτήριο Λεγεωνέλλας

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

### 1.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΛΟΙΠΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ

Το βακτήριο που προκαλεί τη νόσο των λεγεωνάριων ανήκει στο γένος *Legionella* (οικογένεια *Legionellaceae* <sup>(15)</sup>) και είναι Gram αρνητικό (-) <sup>(16,17,18,19)</sup> βακτηρίδιο με λεπτό κυτταρικό τοίχωμα, όπου αναπτύσσεται κυρίως στο νερό και λιγότερο στο χώμα και σε οργανική ύλη <sup>(20,21,24)</sup>. Το μέγεθος του συγκεκριμένου βακτηρίου είναι 0,3 – 0,9 μm σε πλάτος και 2 – 20 μm σε μήκος <sup>(17,23)</sup>, ανάλογα από την ηλικία της καλλιέργειας (νέες καλλιέργειες παράγουν κοκοβάκιλλους 2 – 6 μm σε μήκος και καλλιέργειες μεγαλύτερης χρονικής περιόδου μπορεί να δημιουργήσουν μορφές νηματώδης μέχρι 20μm μήκος). Το βακτήριο της Λεγεωνέλλας έχει και πολικό μαστίγιο (εκτός από την *L. oakridgensis*) <sup>(45)</sup>. Μία από τις ιδιότητες αυτών των βακτηρίων είναι η ιδιότητα να παρασιτούν στα κύτταρα <sup>(2,24,25,26)</sup> (εικόνα 3). Στις πλευρικές αλυσίδες του κυτταρικού τοιχώματος υπάρχουν οι βάσεις που είναι υπεύθυνες για τα σωματικά αντιγόνα ειδικά για αυτούς τους οργανισμούς. Η χημική σύνθεση αυτών των πλευρικών αλυσίδων μαζί με της κυτταρικές δομές τους και τα διάφορα σάκχαρα προσδιορίζουν τη φύση των σωματικών ή των Ο αντιγονικών καθοριστικών παραγόντων. Αυτά βοηθούν στην κατηγοριοποίηση των οροομάδων πολλών χρώσης Gram αρνητικών βακτηρίων, όπως και η Λεγεωνέλλα <sup>(27)</sup>.

Υπάρχουν περίπου 48 είδη λεγεωνέλλας <sup>(24,25)</sup>, από τα οποία παραπάνω από τα μισά έχουν συνδεθεί με ασθένειες στον άνθρωπο και πάνω από 70 ορομάδες <sup>(23,28)</sup>. Το πιο συνηθισμένο είδος που έχει συνδεθεί με τη νόσο των λεγεωνάριων, είναι η *Legionella pneumophila* (είναι υπεύθυνη για

το 90% περίπου των περιπτώσεων της νόσου <sup>(23)</sup>), η οποία γενικότερα έχει περιορισμένη κινητικότητα και μερικά στελέχη είναι τελείως ακίνητα <sup>(29)</sup>. Το βακτήριο της Λεγεωνέλλας έχει ένα με δύο πολικά μαστίγια, κάτι το οποίο μπορεί να βασίζεται στην θερμοκρασία <sup>(26)</sup>. Σε αντίθεση με άλλα υδρόβια βακτήρια, η *L. pneumophila* για να αναπτυχθεί σε εργαστηριακό περιβάλλον χρειάζεται άλατα σιδήρου και L-cysteine <sup>(30)</sup>. Μέχρι τώρα έχουν αναγνωρισθεί 18 ορομάδες της *Legionella pneumophila*, όμως η ορομάδα 1 συσχετίζεται περισσότερο με τη νόσο <sup>(23,31)</sup>. Τέλος, ο πυρετός Pontiac έχει συνδεθεί περισσότερο με τα είδη *L. anisa*, *L. micdadei*, *L. feeleii*, αλλά και με τη *L. pneumophila* οροτύπου 1 <sup>(32,33,34)</sup>. Υπάρχουν τρία είδη Λεγεωνέλλας - *L. jordanis*, *L. oakridgensis* και *L. spiritensis*, που σπάνιες κλινικές απομονώσεις μπορούν να χάσουν την εξάρτησή τους από την L-cysteine <sup>(30)</sup>. Αυτά τα χαρακτηριστικά προκύπτουν μόνο μετά από διαδοχικά περάσματα όταν η Λεγεωνέλλα από έναν μολυσμένο ξενιστή μολύνει έναν δεύτερο. Αυτή η διαδικασία συχνά καταλήγει σε μετάλλαξη των γονιδίων της Λεγεωνέλλας, που δεν είναι ουσιώδη για επιβίωση. Είδη τα οποία δεν είναι εξαρτώμενα από την L-cysteine, μεγαλώνουν πιο σθεναρά σε εργαστηριακό περιβάλλον με την παρουσία L-cysteine <sup>(26)</sup>.

Νέες πιθανολογούμενες αποικίες της *L. pneumophila* δείχνουν χαρακτηριστικό πρασινίζοντα, μπλε ή ροζ – μοβ ιριδισμό. Οι πιο ώριμες αποικίες, δηλαδή αυτές που είναι τουλάχιστον 3 – 4 ημερών, έχουν συνεχή περιφέρεια και είναι κυρτές, με διάμετρο 3 έως 4 mm και στην περιφέρειά τους θυμίζουν θρυμματισμένο γυαλί. Σε αυτές τις αποικίες ο πολύς ο ιριδισμός χάνεται <sup>(26,35)</sup>.



Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα βακτήρια της Λεγεωνέλλας είναι Gram-αρνητικά με λεπτό κυτταρικό τοίχωμα, μα παρόλο που συμβαίνει αυτό στην διαδικασία χρώσης Gram χρωματίζονται αχνά όταν neutral red ή σαφρανίνη χρησιμοποιούνται ως αντιχρώση. Αυτά τα χαρακτηριστικά του βακτηρίου της Λεγεωνέλλας είναι πιθανόν να οφείλονται στη σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων τους, τα οποία περιέχουν μεγάλες ποσότητες πλευρικών αλυσίδων των λιπαρών οξέων των κυττάρων και ουμπιγκουινόνες με πλευρικές αλυσίδες των 9 – 14 μονάδων ισοπρενίου (isoprene) <sup>(36,37)</sup>. Οι δοκιμασίες – προφίλ λιπαρών οξέων και ουμπιγκουινόνης έχουν χρησιμοποιηθεί για απομόνωση Λεγεωνέλλας σε επίπεδο είδους <sup>(26,38)</sup>. Αυτό καθώς το βακτήριο της Λεγεωνέλλας ξεχωρίζει από τα άλλα ζαχαρολυτικά βακτήρια λόγω:

- Απαιτήσης για L-cysteine και άλατα σιδήρου για την αρχική απομόνωση σε θρεπτικά υλικά
- Των τελείως μοναδικών εξωκυτταρικών λιπαρών οξέων και ουμπιγκουινονών τους <sup>(23)</sup>

Πρέπει να σημειωθεί πως η χρώση Gram είναι αποτελεσματική ακόμα και όταν δείγματα παίρνονται κάτω από κανονικές αποστειρωμένες διαδικασίες, όπως σε πλευρικά υγρά, βιοψίες πνευμόνων και διατραχειακά εκπλύματα, καθώς από τέτοιους ιστούς εμφανίζονται τα βακτήρια των Λεγεωνελλών μικρά, ράβδοι Gram αρνητικοί διαφόρων μεγεθών όταν αποχρωματίζονται με βασική φουξίνη. Αυτό μπορεί να φανεί σε ιστούς που έχουν ήδη μολυνθεί από Λεγεωνέλλα <sup>(39)</sup>. Ένας άλλος εναλλακτικός τρόπος χρώσης του βακτηρίου της Λεγεωνέλλας είναι η μέθοδος εμποτισμού με άργυρο του Ντιέτερλε <sup>(40)</sup>. Υπάρχουν και άλλες μέθοδοι που είναι πιο

ευαίσθητες και πιο ειδικές για την απομόνωση Λεγεωνέλλας, οι οποίες περιλαμβάνουν χρωστικές αντισωμάτων μαζί με με φθορίζουσες χρωστικές και χρωστικές ανοσοϋπεροξειδάσης<sup>(26)</sup>.

Το βακτηρίδιο της *Legionella longbeachae* είναι ένα από τα είδη της οικογένειας *Legionellaceae*. Κυρίαρχος τόπος ανίχνευσης της είναι το χώμα και φυτόχωμα . Αναπτύσσεται σε BCYE agar εμπλουτισμένο με MWY και rimaricin όπου απαιτείται τουλάχιστον χρόνος 4 ημερών για επαρκή ανάπτυξη. Στη Λεγεωνέλλα, οι τυπικές αποικίες είναι κατά κανόνα λευκές, ιώδεις – μπλε ή πρασινοκίτρινες, με λεία υπερυψωμένη επιφάνεια, διακριτά όρια και κρυσταλλική μορφή και διαστάσεις 2 – 3mm<sup>(26)</sup>.

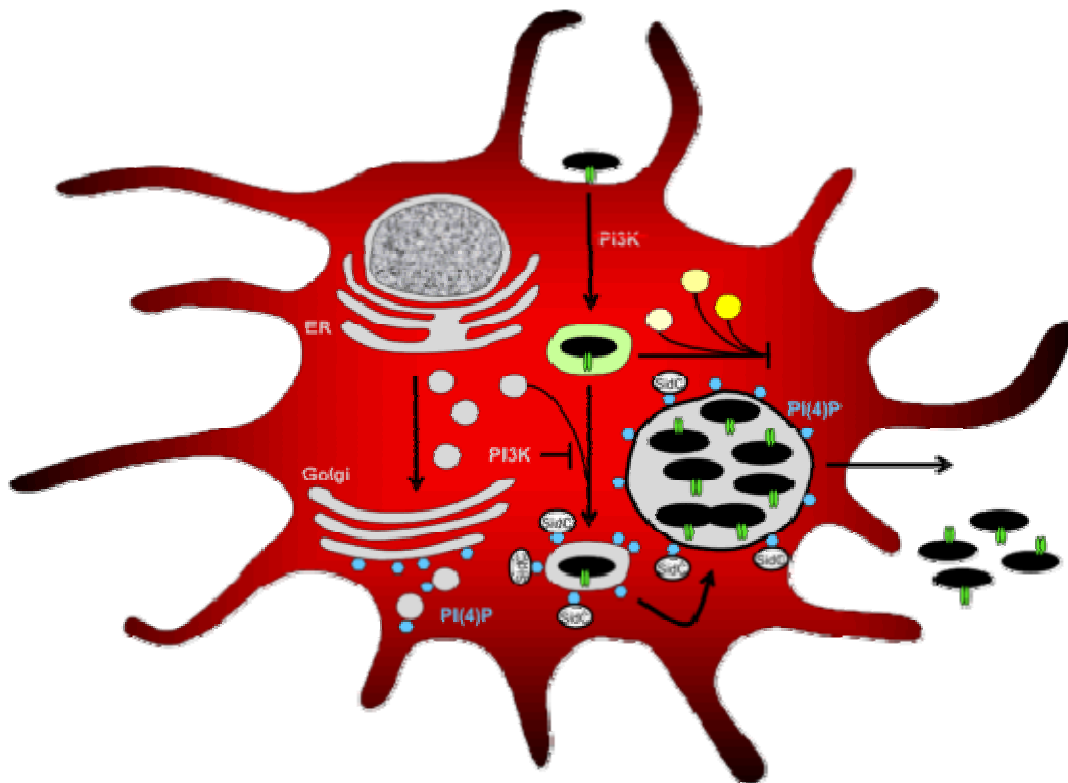
#### **1.1.1. ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΗΣ ΛΕΓΕΩΝΕΛΛΑΣ**

Όταν τα βακτήρια της Λεγεωνέλλας μπαίνουν στο γαστρικό σωλήνα, όπως όταν καταναλώνεται νερό μολυσμένο με Λεγεωνέλλα, ο οργανισμός προστατεύεται με κατάλληλους μηχανισμούς έτσι ώστε να αποτραπεί η είσοδος του νερού στο αναπνευστικό σύστημα. Το κροσσωτό επιθήλιο του αναπνευστικού συστήματος που κρατά την αναπνευστική οδό καθαρή από σωματίδια ή σταγονίδια που περιέχουν βακτήρια. Σε ασθενείς που καπνίζουν ή σε άρρωστους, αυτή η διαδικασία δεν ολοκληρώνεται σωστά και είναι πιο εύκολο για τα βακτήρια να προσπεράσουν τα προστατευτικά αντανακλαστικά του οργανισμού και να εισέλθουν στο αναπνευστικό σύστημα. Τα βακτήρια της Λεγεωνέλλας μπορούν να προσκολληθούν σε κύτταρα της αναπνευστικής οδού και στη συνέχεια εισέρχονται και πολλαπλασιάζονται μέσα στα κύτταρα της αναπνευστικής οδού.

Όταν η Λεγεωνέλλα καταφέρει να περάσει μέσα στους πνεύμονες, τα λευκά κύτταρα του αίματος (ουδετερόφιλα, μακροφάγα) θα μεταναστεύσουν προς τη Λεγεωνέλλα σε μία προσπάθεια να την εγκολπώσουν (φαγοκυττάρωση) και να την καταστρέψουν. Τα κυψελιδικά μακροφάγα κύτταρα είναι τα πιο σημαντικά <sup>(17)</sup>. Αυτά εγκολπώνουν την Λεγεωνέλλα, η οποία μπορεί να δραπετεύσει από τον μηχανισμό αυτών των κυττάρων που προσπαθεί να την καταστρέψει και να πολλαπλασιαστεί μέσα σε αυτά <sup>(41)</sup>. Η ανάπτυξη συνεχίζεται μέχρι στο κύτταρο να γίνει ρήξη και να ελευθερωθούν τα βακτήρια. Τα βακτήρια της Λεγεωνέλλας διασπείρονται στους πνεύμονες μόνο και μόνο για να γίνει εγκόλπωση από άλλα κύτταρα και να ξαναγίνουν τα ίδια βήματα. Ταυτόχρονα, άλλα λευκά κύτταρα αίματος προστρέχουν, παρόλο που τα βακτήρια της Λεγεωνέλλας μπορούν να κρυφτούν από αυτά σε κομμάτια της αναπνευστικής οδού και μέσα στα κυψελιδικά μακροφάγα. Για τους λόγους αυτούς, η Λεγεωνέλλα ονομάζεται ενδοκυτταρικό παθογόνο <sup>(23,42)</sup>.



*Εικ. 2. Μορφολογία βακτηρίου Λεγεωνέλλας από μικροσκόπιο*



Εικ.3. Τρόπος εγκόλπωσης του βακτηρίου της Λεγεωνέλλας από το κύτταρο και η διαδρομή του μέχρι τη ρήξη του κυττάρου

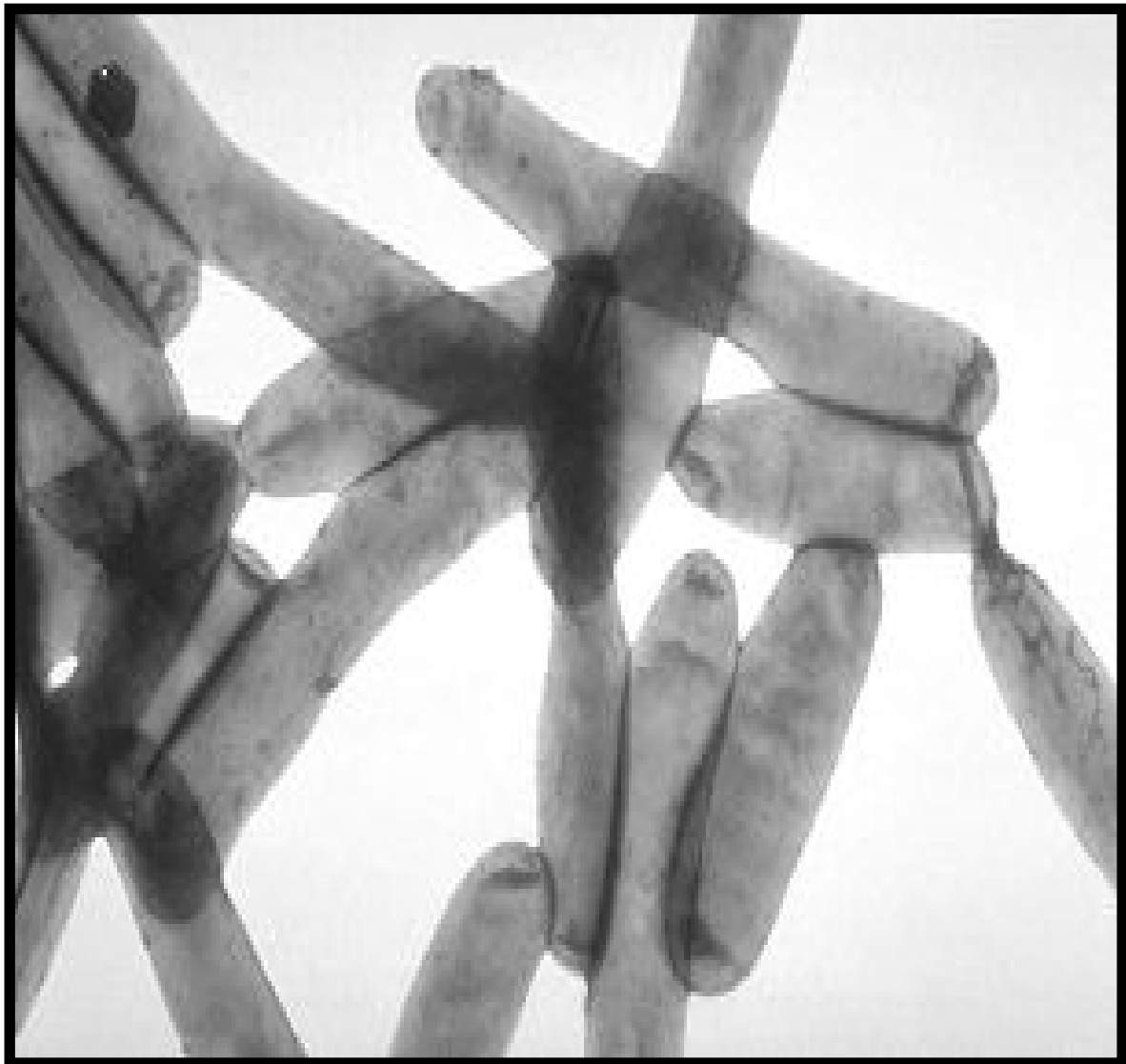
## 1.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Οι μελέτες υβριδοποίησης DNA, καθώς επίσης και η σύνθεση λιπαρών οξέων, έδειξαν ότι τα βακτηρίδια που προκάλεσαν την επιδημική έκρηξη πνευμονίας του 1976 πρέπει να ταξινομηθούν ως νέο είδος. Στο πρώτο διεθνές συμπόσιο για τη νόσο των λεγεωνάριων, που πραγματοποιήθηκε το 1978, τα βακτηρίδια έλαβαν το όνομα *Legionella pneumophila* και έγιναν μέλος της νέας οικογένειας Legionellaceae <sup>(3)</sup>. Το έγγραφο της EPA (1985) με τα κριτήρια της *Legionella* συζητά τις ταξινομικές προσεγγίσεις και τις διαγνωστικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για να ταξινομήσουν τα είδη *Legionella* <sup>(2)</sup>.

Είκοσι οκτώ από τα 48 είδη *Legionella* έχουν συνδεθεί με τους ασθενείς με πνευμονία <sup>(2)</sup>. Η πλειοψηφία των ανθρώπινων μολύνσεων (70% - 90%) προκαλείται από *Legionella pneumophila*, ειδικά από τις οροομάδες 1 και 6 <sup>(2)</sup>. Στον πίνακα 1 καταγράφονται τα είδη *Legionella* <sup>(2,28,43)</sup>.

Τουλάχιστον πενήντα δύο είδη και περί τους εβδομήντα δύο ορότυπους έχουν αναγνωρισθεί. Η *Legionella pneumophila* είναι το πιο κοινό είδος το οποίο απομονώνεται <sup>(44)</sup>.

Στο παράρτημα υπάρχει δένδρογραμμα της Λεγεωνέλλας.



Εικ.4. Μορφή του βακτηρίου από μικροσκόπιο

ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ	
Βασιλείο βακτηριδίων	Βακτήρια (Bacteria)
Phylum	Proteobacteria
Τάξη (class)	Gamma Proteobacteria
Τάξη (order)	<i>Legionellales</i>
Οικογένεια	<i>Legionellaceae</i>
Γενος	<i>Legionella</i> <sup>(28,43)</sup>
ΕΙΔΗ	
<i>Legionella adelaidensis</i>	<i>Legionella lansingensis</i>
<i>Legionella anisa</i>	<i>Legionella londiniensis</i>
<i>Legionella beliardensis</i>	<i>Legionella longbeachae</i>
<i>Legionella birminghamensis</i>	<i>Legionella lytica</i>
<i>Legionella bozemanii</i>	<i>Legionella maceachernii</i>
<i>Legionella brunensis</i>	<i>Legionella micdadei</i>
<i>Legionella busanensis</i>	<i>Legionella moravica</i>
<i>Legionella cherrii</i>	<i>Legionella nautarum</i>
<i>Legionella cincinnatiensis</i>	<i>Legionella oakridgensis</i>
<i>Legionella donalddsonii</i>	<i>Legionella parisiensis</i>
<i>Legionella drancourtii</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Legionella drozanskii</i>	<i>Legionella quateirensis</i>
<i>Legionella erythra</i>	<i>Legionella quinlivanii</i>
<i>Legionella fairfieldensis</i>	<i>Legionella rowbothamii</i>
<i>Legionella fallonii</i>	<i>Legionella rubrilucens</i>
<i>Legionella feeleei</i>	<i>Legionella sainthelensi</i>
<i>Legionella geestiana</i>	<i>Legionella santicrucis</i>
<i>Legionella genomospecies 1</i>	<i>Legionella shakespearei</i>
<i>Legionella gratiana</i>	<i>Legionella spritensis</i>
<i>Legionella gresilensis</i>	<i>Legionella steigerwaltii</i>
<i>Legionella hackeliae</i>	<i>Legionella taurinensis</i>
<i>Legionella impletisoli</i>	<i>Legionella tusconensis</i>
<i>Legionella israelensis</i>	<i>Legionella wadsworthii</i>
<i>Legionella jamestowniensis</i>	<i>Legionella waltersii</i>
<i>Candidatus Legionella jeonii</i>	<i>Legionella worsleiensis</i>
<i>Legionella jordanis</i>	<i>Legionella yabuuchiae</i> <sup>(28)</sup>

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Βακτηριολογική κατάταξη *Legionella* spp, αλφαβητικά

### 1.2.1. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΛΕΓΕΩΝΕΛΛΑΣ

Για την ταυτοποίηση και επιβεβαίωση των αποικιών Λεγεωνέλλας, ακολουθείται η ίδια διαδικασία, είτε το δείγμα είναι κλινικό είτε περιβαλλοντικό. Όπως έχει ήδη αναφερθεί νέες πιθανολογούμενες αποικίες *L. pneumophila* δείχνουν χαρακτηριστικό πρασινίζοντα, μπλε ή ροζ – μοβ ιριδισμό. Οι πιο

ώριμες αποικίες, δηλαδή αυτές που είναι τουλάχιστον 3 – 4 ημερών, εμφανίζουν συνεχή περιφέρεια και είναι κυρτές, με διάμετρο 3 έως 4 mm και στην εμφάνιση θυμίζουν θρυμματισμένο γυαλί στην περιφέρειά τους. Σε αυτές τις αποικίες ο πολύς ο ιριδισμός χάνεται. Θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μία επόμενη επιβεβαίωση με τη χρήση άγαρ που δεν περιέχει κυστεΐνη για να αποδειχτεί η εξάρτηση από την L – cystein. Στην εικόνα 27, στο 8.2. φαίνεται η μορφή αποικίας Λεγεωνέλλας.

Είναι πολύ σημαντικά για την επιδημιολογική έρευνα η γρήγορη ταυτοποίηση και η ξεχωριστή επιβεβαίωση για *L.pneumophila* ορομάδας 1, η ανίχνευση άλλων ορομάδων και τέλος για κάποια άλλα παθογόνα είδη.

Επίσης είναι διαθέσιμα στο εμπόριο αντιδραστήρια κροκίδωσης (latex) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για επιβεβαίωση. Οι ύποπτες αποικίες αναμιγνύονται χωριστά σε μιας χρήσης



Εικ. 5. Χρησιμοποίηση Latex για την ταυτοποίηση είδους ή ορότυπου *Legionella spp*

κάρτα αντίδρασης. Κάθε αντιδραστήριο είναι ευαισθητοποιημένο σε αντισώματα ειδικά για τις ορομάδες ή είδη Λεγεωνέλλας. Στην περίπτωση παρουσίας ομόλογων αντιγόνων, τα σωματίδια από latex συσσωματώνονται και μπορούν να δώσουν καθαρή, ορατή, θετική αντίδραση μέσα σε λίγα λεπτά<sup>(45)</sup>.

Θετική αντίδραση με ειδικούς αντιορούς έναντι γνωστών *Legionellae* είναι επιβεβαιωμένα *Legionellae*. Τα διάφορα είδη οροομάδων *L. pneumophila* μπορεί να έχουν διασταυρούμενη αντίδραση <sup>(46)</sup>, και όταν η απομόνωση αποτυχαίνει να αντιδράσει με ειδικούς αντιορούς σε όλες τις γνωστές *Legionellae* θα πρέπει να αξιολογηθεί και τελικά να θεωρηθεί ως πιθανό νέο είδος. Μια πιο λεπτομερής ταυτοποίηση μπορεί να γίνει σε ειδικά εργαστήρια αναφοράς.

Μικροβιολογικά στελέχη από δείγματα περιβάλλοντος και κλινικές απομονώσεις κλινικών στελεχών μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με μοριακές τεχνικές, όπως είναι η ανάλυση έπειτα από πέψη του βακτηριακού DNA με περιοριστικά ένζυμα με ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (pulsed – field gel electrophoresis=PFGE) ή μέθοδοι βασισμένες σε PCR. Ο πιο ακριβής τρόπος επιδημιολογικής σύγκρισης περιβαλλοντικών και κλινικών απομονώσεων στελεχών είναι η χρήση 2 μεθόδων για ταξινόμηση παράλληλα κατά τύπο γονότυπων και φαινοτύπων. Ένας διεθνής αναγνωρισμένος τρόπος ταξινόμησης κατά τύπο χρησιμοποιώντας αυξανόμενα πολυμορφικά επιμήκη κομμάτια (amplified fragment length polymorphism=AFLP) προτυποποιήθηκε με πολυκυτταρικές μελέτες Λεγεωνέλλας από 11 χώρες και συντονίστηκαν από την Ευρωπαϊκή ομάδα εργασίας για τις λοιμώξεις από Λεγεωνέλλα (EWGLI). Αυτή η μέθοδος επιτρέπει τα αποτελέσματα των διαφόρων εργαστηρίων να είναι συγκρίσιμα.

### **1.3. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΝΟΣΟΥ ΛΕΓΕΩΝΑΡΙΩΝ**

Η *Legionella* spp είναι βακτήριο όπως έχει ήδη αναφερθεί, το οποίο μπορεί να εισπνευστεί είτε από μολυσμένα σταγονίδια νερού είτε από



μολυσμένη σκόνη φυτοχωμάτων και λιπασμάτων με χώμα, όπου μπορεί να προκαλέσει μόλυνση του πνεύμονα ή και ένα είδος πνευμονίας <sup>(47,48)</sup>. Δηλαδή πρόκειται για οξεία βακτηριακή λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. Είναι μια δυνητικά θανατηφόρος πνευμονία <sup>(49)</sup>. Τα πιθανά ποσοστά θανάτου όσων έρχονται αντιμέτωποι με τη συγκεκριμένη νόσο, είναι μεταξύ 13% και 15% <sup>(48)</sup>.

Τα συμπτώματα συνήθως είναι παρόμοια με αυτά μιας γρίπης:

- υψηλός πυρετός
- πονοκέφαλος (συχνά σφοδρός)
- αδυναμία αναπνοής
- πόνος μυών
- μη παραγωγικός βήχας
- ρίγη
- εμετός

Εκτός αυτών των συμπτωμάτων, η πνευμονία μπορεί να συνοδεύεται και από προβλήματα άλλων οργάνων όπως:

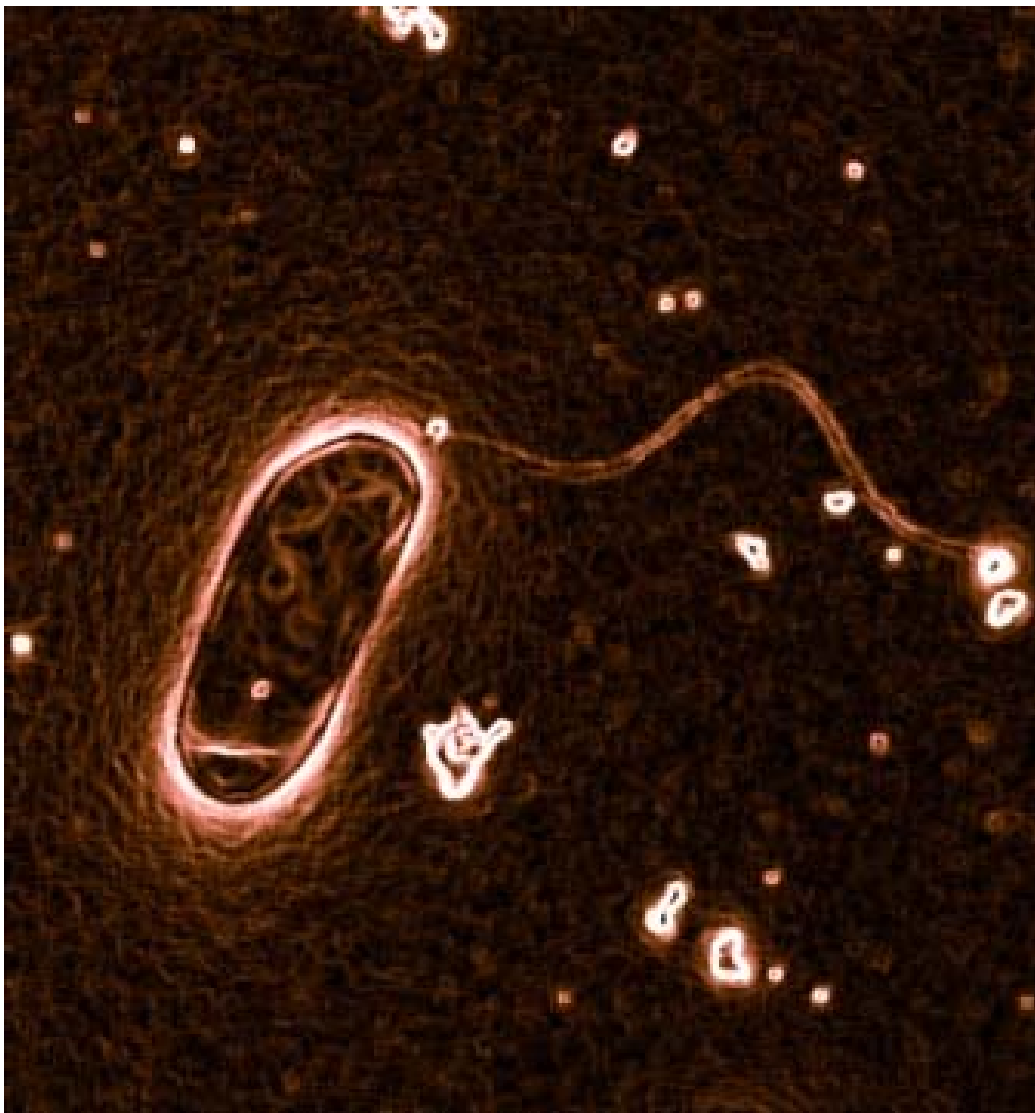
- στον εγκέφαλο: δημιουργία διανοητικών διαταραχών, όπως σύγχυση, παραισθήσεις, απώλεια μνήμης
- στα νεφρά: δημιουργία νεφρικής ανεπάρκειας
- στο παχύ έντερο: διάρροιες <sup>(2,17,27,28,44,49,51,52)</sup>

Από την στιγμή της μόλυνσης με το βακτήριο, τα συμπτώματα κάνουν 2 – 10 μέρες να εμφανιστούν <sup>(23)</sup>. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα συμπτώματα ξεκινούν μετά από 5 ή 6 ημέρες <sup>(51)</sup>.

Τις πρώτες μέρες οι ασθενείς νιώθουν κουρασμένοι και αδύναμοι. Οι περισσότεροι ανεβάζουν και υψηλό πυρετό ο οποίος μπορεί να υπερβεί και

τους 39,5 °C. Το πρώτο κλινικό σημείο μόλυνσης πνευμόνων είναι ο βήχας, ο οποίος μπορεί να γίνει και παραγωγικός. Τα συμπτώματα από το γαστροεντερικό σύστημα είναι συχνά, με πρώτο τη διάρροια. Πολλοί ασθενείς έχουν ναυτία, εμετό και στομαχικές ενοχλήσεις. Άλλα κοινά συμπτώματα είναι ο πόνος στο στήθος, μυϊκοί πόνοι, πονοκέφαλοι και αδυναμία αναπνοής όπως έχει ήδη αναφερθεί <sup>(23)</sup>.

Στις Ηνωμένες Πολιτείες η νόσος των Λεγεωναρίων μολύνει 8.000 με 18.000 άτομα κάθε χρόνο <sup>(28)</sup>.



Εικ. 6. Βακτήριο Λεγεωνέλλας από μικροσκόπιο

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΔΙΑΓΝΩΣΗ

### 2.1. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα κλινικά συμπτώματα της Λεγεωνέλλας είναι όμοια με αυτά άλλων μορφών πνευμονίας <sup>(26)</sup>. Έτσι χρειάζονται μέθοδοι ταυτοποίησης Λεγεωνέλλας που να είναι ταυτόχρονα ακριβείς αλλά και τα αποτελέσματα έτοιμα σε σύντομο χρονικό διάστημα έτσι ώστε η θεραπεία να αρχίσει έγκαιρα εάν παραστεί ανάγκη. Η διάγνωση γίνεται, μέσω ειδικών εργαστηριακών δοκιμών σε ειδικά εργαστήρια <sup>(23)</sup>. Για αυτό το λόγο θα πρέπει να υπάρξουν νέες δοκιμές για να μη χρειάζονται ειδικά εργαστήρια. Εύλογο θα είναι να γίνονται αυτές οι δοκιμές σε πάσχοντες που ανήκουν σε κατηγορία υψηλού κινδύνου.

Ιδανικά θα έπρεπε σε κάθε ασθενή που έχει συμπτώματα πνευμονίας, είτε μοιάζουν είτε όχι με αυτά της Λεγεωνέλλας, να γίνονται δοκιμές για το αν πάσχει ή όχι από τη νόσο των Λεγεωναρίων. Οι δοκιμές αυτές θα είναι καλό να πραγματοποιούνται σε άτομα υψηλού κινδύνου σε αυτήν τη νόσο (άτομα ανοσοκατεσταλμένα, άνω των 40, που μπορεί να εκτέθηκαν σε βακτήρια Λεγεωνέλλας, μη ανταποκρινόμενα σε βήτα – λακταμικά αντιβιοτικά <sup>(53)</sup> .

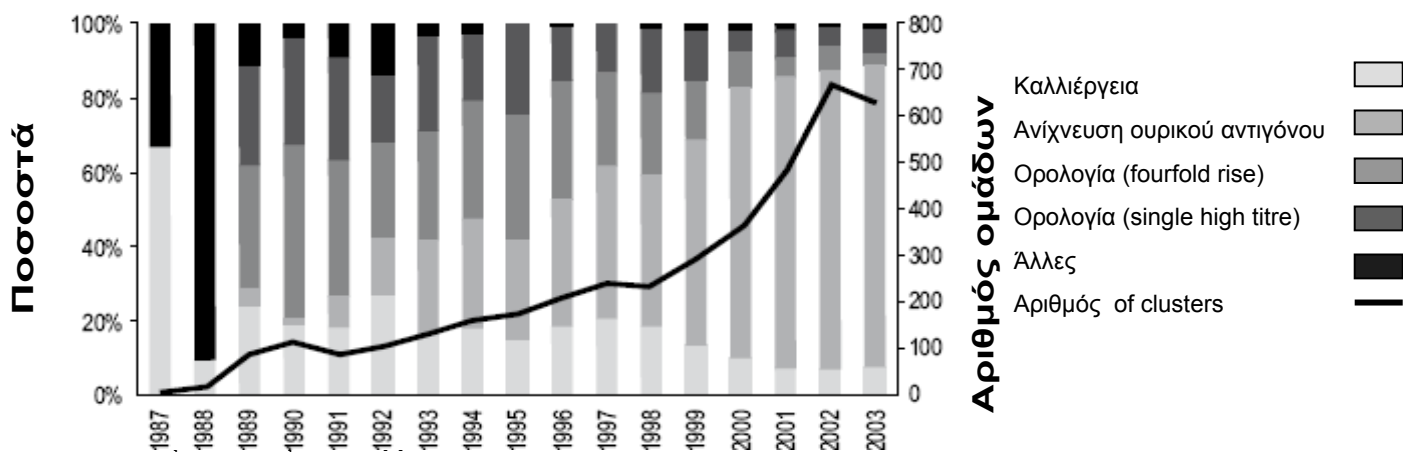
Παρόλο που υπάρχουν μοριακές γενετικές και ανοσολογικές μέθοδοι, η διάγνωση της νόσου Λεγεωναρίων είναι ευχερής είναι αποτελεσματική μόνο για *L. pneumophila* ορομάδας 1. Από το 1995, οι διαγνωστικές δοκιμές έχουν αλλάξει σημαντικά, όμως η ταυτοποίηση άλλων ορομάδων του ίδιου είδους ή η ταυτοποίηση άλλων ειδών της Λεγεωνέλλας δεν έχουν ακόμα τελειοποιηθεί <sup>(54)</sup> .

Κάποιες εργαστηριακές μέθοδοι διάγνωσης Λεγεωνέλλας, που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής:

- Ανίχνευση αντιγόνων στα ούρα
- Ταυτοποίηση βακτηρίου με τη χρησιμοποίηση ταξινομημένης κατά ζεύγος ορολογίας
- Απομόνωση βακτηρίου από καλλιέργεια
- Ανίχνευση βακτηριακού DNA χρησιμοποιώντας αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)
- Ανίχνευση βακτηρίου σε ιστό ή σε σωματικά υγρά μέσω μικροσκοπίου ανοσοφθορισμού

Πρέπει να σημειωθεί πως η Λεγεωνέλλα δεν ανήκει στην φυσιολογική χλωρίδα του στοματοφάρυγγα του ανθρώπινου οργανισμού. Έτσι η απομόνωσή της όταν γίνεται από τα πτύελα ή τις διάφορες βρογχικές εκκρίσεις θεωρείται διαγνωστική <sup>(55)</sup>.

Επιπλέον τα θρεπτικά υλικά τα οποία είναι κατάλληλα για την ανάπτυξη της και συνεπώς για την ανίχνευσή της, θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να αναστέλλουν την ανάπτυξη της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπινου οργανισμού <sup>(55)</sup>.



Εικ. 7. (Σχεδιάγραμμα) Μέθοδος διάγνωσης κατά χρόνο αρχής της νόσου <sup>(26)</sup>

Για την εικόνα (Εικ. 7.) :

Ο υψηλότερος αριθμός περιπτώσεων της νόσου Λεγεωναρίων σε ταξιδιώτες δημοσιεύτηκε από το Ευρωπαϊκό Σχέδιο Επιτήρησης για τη νόσο των Λεγεωναρίων που σχετίζεται με τα ταξίδια, ήταν το 1999. Η μεγαλύτερη παρακολούθηση και η αύξηση χρήσης της δοκιμής αντιγόνου Λεγεωνέλλας ούρων για την ανίχνευση *Legionella pneumophila* οροομάδας 1 είναι η αιτία αυτής της υψηλής καταγραφής <sup>(26)</sup>.

Η δοκιμή ανίχνευσης των τιμών της *Legionella* στα ούρα είναι σημαντικά πιο ευαίσθητη για περιστατικά νόσου των Λεγεωναρίων που αποκτήθηκαν στην κοινότητα και για το ταξίδι, από ότι για νοσοκομειακά περιστατικά, επειδή η δοκιμή αυτή είναι περισσότερο ευαίσθητη για στελέχη *Legionella pneumophila* οροομάδας 1 που σχετίζονται με τον πυρετό Πόντιακ από ότι τα στελέχη που δεν σχετίζονται με αυτών. Στην δοκιμή αυτή γίνεται χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων (MAb) MAb2 ή Dresden MAb3/1 <sup>(26)</sup>.

<b>Σύγκριση μεθόδων εργαστηριακών διαγνώσεων για την νόσο της Λεγεωνέλλας</b>				
<b>ΜΕΘΟΔΟΣ</b>	<b>ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (%)</b>	<b>ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ (%)</b>	<b>ΣΧΟΛΙΑ</b>	<b>ΑΝΑΦΟΡΕΣ</b>
<b>Καλλιέργεια</b>				
Πτύελα	<b>5 - 70</b>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Άριστη Μέθοδος</li> <li>✓ 2 - 4 μέρες και κάποιες φορές έως 14</li> <li>✓ Υψηλή ειδικότητα</li> </ul>	Edelstein&Meyer-1994/ Stout&Yu-1997/ Harrison-1998, Maiwald, Helbig&Luk-1998/ Fields, Benson&Besser-2002/ Luk, Helbig&Schuppler-2002
BAL* ή Διατραχειακό έκπλυμα	<b>30 - 90</b>	100		
Βιοψία πνευμόνων	<b>90 - 99</b>	100		
Αίμα	<b>10 - 30</b>	100		
<b>Ορολογία</b>				
Ορομετατροπή (1)	<b>70 - 90</b>	95 - 99	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ (1)Ορομετατροπή μερικές φορές έως 3-9 εβδομάδες</li> <li>✓ (2)Μόνο για L.p. * οροομάδα1, έλλειψη για τα υπόλοιπα</li> </ul>	Edelstein&Meyer-1994/ Plouffe-1995/ Stout&Yu-1997/ Harrison-1998/ Fields, Benson&Besser-2002/ Luk, Helbig&Schuppler-2002/ Uldum&Molbak-2002
Ενιαίο (single) δείγμα	<b>Άγνωστο</b>	50 - 70		

Δοκιμή αντιγόνου Λεγεωνέλλας ούρων (2)	75 – 99	99 – 100	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ (2)Πολλή γρήγορη (15λεπτά-3 ώρες)</li> <li>✓ (2)Θετικά αποτελέσματα που κρατούν για καιρό</li> </ul>	
<b>Μέθοδος DFA †</b>				
Πτύελα ή BAL *	25 – 75	95 – 99	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Πολλή γρήγορη (2-4 ώρες)</li> <li>✓ Περιορισμένη ευαισθησία</li> <li>✓ Απαραίτητη η εμπειρία</li> <li>✓ Όχι επικυρωμένα αντιδραστήρια για είδη που δεν είναι pneumophila</li> </ul>	Edelstein&Meyer-1994/ Stout&Yu-1997/ Harrison-1998/ Fields, Benson & Beeser-2002
Βιοψία πνευμόνων	80 – 90	99		
<b>PCR‡</b>				
Δείγμα αναπνευστικών οδών	85 – 92	94 – 99	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Γρήγορη</li> <li>✓ Ανίχνευση όλων των ειδών</li> <li>✓ Όχι εμπορικά διαθέσιμη</li> <li>✓ Διαγνωστική ισχύς για θετικά αποτελέσματα χωρίς επιβεβαίωση από άλλες μεθόδους</li> </ul>	Fields,Benson&Besser-2002/ Luk,Helbig&Schuppler-2002/ Uldum&Molbak-2002/ Van der Zee-2002/ Roig & Rello-2003
Ούρα, ορός	33 - 70	98 - 98		

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Σύγκριση μεθόδων εργαστηριακής διάγνωσης για τη νόσο της των Λεγεωναρίων <sup>(26)</sup>

\*BAL= βρογχοπνευμονικό έκπλυμα

†DFA= άμεση ανοσοφθορική δοκιμή

\* L.p= *Legionella pneumophila*

‡PCR= αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

## 2.2. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ

Τα τελευταία χρόνια η μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η ανάπτυξη βακτηρίων σε άμεση καλλιέργεια με χρήση καλλιεργητικών θρεπτικών υλικών.

Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει και οφέλη και περιορισμούς <sup>(56)</sup>.

Για διαφοροποίηση και προσδιορισμό Λεγεωνέλλας υπάρχουν μέθοδοι που συμπεριλαμβάνουν:

- ✓ Βιοχημικά χαρακτηριστικά
- ✓ Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά

- ✓ Ορολογία
- ✓ Αντιδράσεις μονοκλωνικών αντισωμάτων
- ✓ Απαιτήσεις ανάπτυξης
- ✓ Λιπαρό οξύ και ανάλυση υδατανθράκων
- ✓ Προφίλ πρωτεϊνών
- ✓ Ουμπικουινόνες
- ✓ Διάφορες μοριακές τεχνικές

Η ταυτοποίηση *Legionellae* άλλων εκτός από *L. pneumophila* με τη χρήση βιοχημικών προφίλ, είναι δυστυχώς περιορισμένη.

Για την ανίχνευση αντιγόνων Λεγεωνέλλας γίνεται με δοκιμή αντιγόνου Λεγεωνέλλας στα ούρα με δύο τρόπους, είτε με ένζυμα ανοσολογικής δοκιμής είτε με ανοσοχρωματογραφική μέθοδος. Στην περίπτωση ανίχνευσης αντιγόνων ιστού για Λεγεωνέλλα οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η έμμεση ανοσοφθορική μικροσκόπηση, η άμεση ανοσοφθορική δοκιμή και τα ένζυμα ανοσοδοκιμής.

Μία τελευταία μέθοδος είναι η διάγνωση Λεγεωνέλλας με ανίχνευση νουκλεϊκού οξέως με δοκιμή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) <sup>(26)</sup>.

### **2.3. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ**

Κάθε κτήριο υγειονομικής περίθαλψης θα πρέπει να έχει πρόσβαση σε εργαστήριο που είναι ικανό να απομονώσει Λεγεωνέλλα από καλλιέργειες και να έχει ταυτόχρονα την δυνατότητα να χρησιμοποιήσει τη μέθοδο δοκιμής αντιγόνου Λεγεωνέλλας ούρων. Επιπλέον, οι ορολογικές μέθοδοι θα πρέπει να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διάγνωση, παρόλο που ως μέθοδος δεν

είναι η πιο εύχρηστη. Ταυτόχρονα, για διάγνωση μπορεί να ληφθεί υπόψη και η μέθοδος DFA, εφόσον είναι εξέταση ρουτίνας, ώστε να είναι δυνατή η άμεση ανίχνευση των αλλαγών των αποτελεσμάτων.

Οι συνέπειες της μη εκτίμησης ασθενών με ενδονοσοκομειακή πνευμονία σε τακτική βάση καταδεικνύονται σε μία μελέτη από τον Lerine το 1998, ο οποίος εντόπισε συρροή κρουσμάτων περιστατικών με νόσο των Λεγεωναρίων, σε ένα νοσοκομείο, σύντομα μετά την εισαγωγή της δοκιμής αντιγόνου της Λεγεωνέλλας στα ούρα. Στο νοσοκομείο είχε σημειωθεί επιδημική έκρηξη νοσοκομειακής Νόσου των Λεγεωναρίων.

Δεκαέξι χρόνια νωρίτερα και όπως απεκαλύφθη με την μοριακή τυποποίηση σε επίπεδο υπότυπου τα απομονωθέντα στελέχη από τις 2 επιδημίες ήταν ταυτόσημα. Δεν υπήρχε αύξηση στα συνολικά περιστατικά της νοσοκομειακής πνευμονίας. Το συμπέρασμα της μελέτης ήταν ότι οι λοιμώξεις για Λεγεωνέλλα να συμβαίνουν για μακρύ χρονικό διάστημα χωρίς να αναγνωρίζονται <sup>(26)</sup>.

Υπάρχουν αρκετές αναφορές που δείχνουν πως δεν χρησιμοποιούνται αρκετά συχνά οι διαγνωστικές μέθοδοι της Λεγεωνέλλας. Σε μία έρευνα (Fiore, 1999) από τα 192 νοσοκομεία που συμμετείχαν, μόνο το 60% μπορούσε να παρέχει μέθοδο ανίχνευσης Λεγεωνέλλας εκτός του νοσοκομείου και μόνο το 21% έχει καθιερώσει μεθόδους ελέγχου σε επίπεδο ρουτίνας που αφορούν έλεγχο δειγμάτων του αναπνευστικού από ασθενείς του νοσοκομείου με νοσοκομειακή πνευμονία για νόσο των Λεγεωναρίων. Το θετικό αυτής της έρευνας είναι πως φαίνεται η ανάγκη τόσο της επιτήρησης της νόσου των Λεγεωνάριων, όσο και του ελέγχου μολύνσεων σε νοσοκομεία, οίκους περίθαλψης ηλικιωμένων και άλλες τέτοιες υπηρεσίες και κτήρια <sup>(26)</sup>.



Οι εγκαταστάσεις υγειονομικής περίθαλψης πρέπει να έχουν πολιτικές που αφορούν στη μέθοδο ανίχνευσης της Λεγεωνέλλας σε ασθενείς με νοσοκομειακή πνευμονία. Αποτελεσματική διάγνωση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων είναι κρίσιμα για την ικανή και ταχεία διαχείριση μεμονωμένων περιπτώσεων και επιδημικών εκρήξεων, για τον έλεγχο της ομάδας περιστατικών, καθώς και για την προστασία άλλων ασθενών.



*Εικ. 8. Η Legionella spp, προκαλεί κυρίως πνευμονία και πυρετό Πόντιακ*

## **2.4. ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Εάν εμφανιστούν τα συμπτώματα που αναφέρθηκαν παραπάνω, λίγες μέρες μετά την επαφή με αεροζόλ από νερό, φυτοχώματα και λιπάσματα με χώμα, η γρήγορη αντιμετώπιση είναι κρίσιμης σημασίας. Τα αντιβιοτικά μπορεί να είναι αποτελεσματικά έναντι της Λεγεωνέλλα εάν η διάγνωση γίνει στα πρώτα στάδια <sup>(52,57,58)</sup>, ιδίως όταν στους ασθενείς δεν υπάρχει κάποιο νόσημα που εξασθενεί το ανοσοποιητικό τους σύστημα <sup>(23)</sup> ή διάφοροι επιβαρυντικοί παράγοντες <sup>(55)</sup>. Όσο νωρίτερα είναι σωστή η διάγνωση τόσο καλύτερα θα είναι και τα αποτελέσματα της θεραπείας <sup>(51,55)</sup>.

Υπολογίζεται πως το 1% αυτών που εισάγονται με πνευμονία στα νοσοκομεία, πάσχουν από την νόσο των Λεγεωνάριων <sup>(44)</sup>.

Σε περιπτώσεις που το ανοσοποιητικό σύστημα είναι αδύναμο, πχ από μεταμόσχευση, και γίνεται καθυστέρηση της θεραπείας, τότε υπάρχει περίπτωση η νοσηλεία σε νοσοκομείο να παραταθεί, να υπάρξουν επιπλοκές ακόμα και θάνατος <sup>(23)</sup> που μπορεί να φτάσει το 15% <sup>(55)</sup>, σε αντίθεση με τον πυρετό Pontiac στον οποίο γίνονται αναφορές για μηδενική θνητότητα <sup>(25)</sup>.

Η θεραπεία θα πρέπει να γίνει σε νοσοκομείο και σε μερικούς ασθενείς είναι απαραίτητη η νοσηλεία σε ειδικές μονάδες <sup>(51)</sup>.

Περίπου 10 - 15% των περιπτώσεων Λεγεωνέλλωσης στα νοσοκομεία, καταλήγει στον θάνατο, 'όπως ήδη έχει αναφερθεί παραπάνω, για αυτό είναι κρίσιμο η νόσος να αντιμετωπιστεί στα πρώτα της στάδια με τα κατάλληλα αντιβιοτικά, καθώς δεν είναι ευαίσθητη στην πενικιλίνη <sup>(44,52)</sup>. Επίσης δεν υπάρχει εμβόλιο για την νόσο των Λεγεωνάριων <sup>(44)</sup>.

Ο εργαστηριακός έλεγχος είναι απαραίτητος για τη σίγουρη διάγνωση <sup>(19)</sup>. Γίνονται ορολογικές δοκιμές στους ασθενείς. Το βακτήριο της Λεγεωνέλλας μπορεί να ταυτοποιηθεί και μετά την εύρεσή του σε φλέγματα ή σε υγρά του αναπνευστικού συστήματος.

Έχει βρεθεί πως σε ασθενείς που έχουν πάρει εξιτήριο νωρίτερα μπορεί να υπάρξουν σημάδια κούρασης, μειωμένης ενέργειας και συγκέντρωσης για αρκετούς μήνες. Σε μία έρευνα 122 πασχόντων από νόσο των Λεγεωνάριων που διήρκησε αρκετό διάστημα στην Ολλανδία υπήρχαν τα εξής αποτελέσματα :

- Συμπτώματα κούρασης, 75%
- Νευρολογικά συμπτώματα (προβλήματα συγκέντρωσης, δυσφορία κλπ), 75%
- Νευρομυϊκά συμπτώματα (πόνος μαζί με μυϊκή αδυναμία), 79%

- Βήχας, 48%
- Δυσκολία αναπνοής κατά την διάρκεια της άσκησης, 38%

Αυτά τα συμπτώματα επέμεναν για δεκαεφτά μήνες:

Δεν στάθηκε δυνατόν να προσδιορισθεί αν η επιμονή αυτών των συμπτωμάτων ήταν αποτέλεσμα ειδικά της νόσου των Λεγεωναρίων ή γενικότερα λόγω πνευμονίας.

Σοβαρά επακόλουθα μετά από τη νόσο των Λεγεωναρίων είναι σπάνια. Γενικότερα έχει βρεθεί πως πλήρη ανάρρωση γίνεται μέσα σε ένα χρόνο <sup>(23)</sup>.

Είναι σημαντικό στους ασθενείς που καπνίζουν να γίνει κατανοητό πως πρέπει να σταματήσουν το κάπνισμα, καθώς είναι ο πιο συχνός παράγοντας κινδύνου <sup>(23)</sup>.

Επανεπίθεση από Λεγεωνέλλα θεωρείται εξαιρετικά σπάνια περίπτωση και μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί κάτι τέτοιο. Αυτό είναι ένδειξη πως είναι πιθανό να αφήνει κάποια ανοσία η πρώτη μόλυνση από Λεγεωνέλλα <sup>(23)</sup>.

Όπως αναφέρθηκε, η θεραπεία γίνεται με αντιβιοτικά. Οι δύο πιο ισχυρές κατηγορίες αντιβιοτικών είναι οι μακρολίδες (αζιθρομυκίνη) και οι κινολόνες (κιπροφλοξάνη, λεβοφλοξάνη, μοξιφλοξάνη, γεμιφλοξάνη, τροβοφλιξάνη). Αλλά αντιβιοτικά με θετικά αποτελέσματα είναι η τετρακυκλίνη, η δοξικυκλίνη, η μινοκυκλίνη, η τριμεθοπριμ-σουλφαμεθοξαζόλη. Η ερυθρομυκίνη είναι το αντιβιοτικό που πρωτοχρησιμοποιήθηκε, όμως αντικαταστάθηκε από άλλα λιγότερο τοξικά και περισσότερο ισχυρά <sup>(23)</sup>.

Η ενδοκυτταρική εύρεση της Λεγεωνέλλας είναι σημαντικό για την θεραπεία. Πολλά αντιβιοτικά τα οποία είναι αποτελεσματικά για την πνευμονία γενικότερα, είναι αναποτελεσματικά για την νόσο των Λεγεωναρίων, καθώς

δεν μπορούν να διεισδύσουν στα κύτταρα του αναπνευστικού σωλήνα ή στα κυψελιδικά μακροφάγα. Τα νεότερα αντιβιοτικά που μπορούν να διεισδύσουν στα κύτταρα και να εξοντώσουν τα βακτήρια της Λεγεωνέλλας αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο <sup>(23)</sup>.

## 2.5. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Στον ακτινολογικό έλεγχο δυνατόν να φανεί:

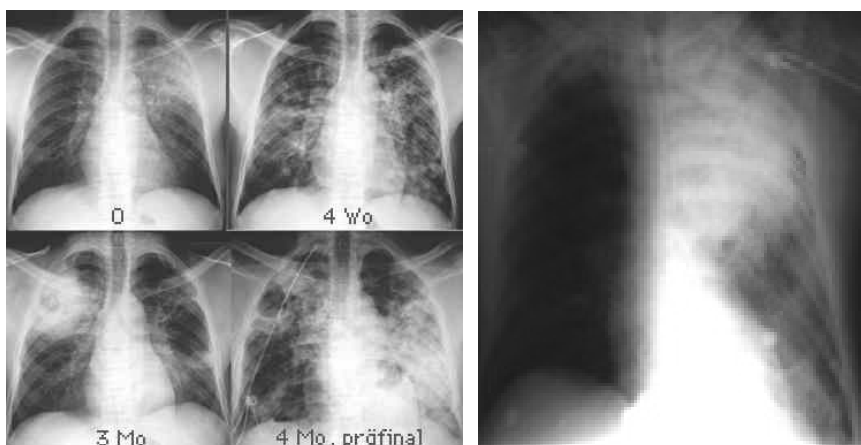
- Τμηματική ή λοβώδη πνευμονία, συνήθως μονόπλευρη και πιο σπάνια αμφιτερόπλευρη
- Πλευριτική συλλογή
- Πνευμονικό απόστημα
- Στρογγυλές πυκνώσεις (περίπτωση σηπτικών εμβόλων)

Στείρες θα βγουν οι εξετάσεις που αφορούν στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό καθώς και αυτές των κοπράνων. Στο περιφερειακό αίμα απαιτούνται:

- μέτρια λευκοκυττάρωση
- υπονατριαιμία, υποσφαιταιμία
- διαταραχές ηπατικών λειτουργιών

Τέλος, τα ούρα εμφανίζουν αιματοουρία σε μικρό βαθμό <sup>(55)</sup>.

*Εικ. 9. Εξέταση με ακτινογραφία του θώρακος για την εύρεση στοιχείων που δείχνουν Λεγεωνέλλα και δείγματα ακτινογραφίες πνευμόνων ασθενών που πάσχουν από τη νόσο των Λεγεωναρίων.*



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

### **3.1. ΓΕΝΙΚΑ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ**

Τα πρώτα στοιχεία για την ύπαρξης Λεγεωνέλλας είναι από το 1965 στην Ουάσιγκτον. Επιδημίες και σποραδικά κρούσματα της νόσου Λεγεωνάριων έχουν περιγραφεί σε όλα σχεδόν τα μέρη του κόσμου <sup>(1,2)</sup>. Μετά την μεγάλη επιδημία της Φιλαδέλφειας το 1976 ( στο Ξενοδοχείο Bellevue Stratford της Φιλαδέλφειας στην Πενσυλβάνια) <sup>(59)</sup> , που ήταν η αρχή για τη διερεύνηση της νόσου, όπου και κατέληξαν πως περιστατικά παλαιότερων επιδημικών εκρήξεων σε άλλα μέρη ανήκαν σε αυτήν την κατηγορία (πχ 1973 στο Μπένιντορμ της Ισπανίας ή το 1974 στην Φιλαδέλφεια) ξεκίνησε ένας μακρύς κατάλογος με επιδημικές εκρήξεις Λεγεωνέλλας. Με στοιχεία του European Working Group on *Legionella* Infections (EWGLI) υπήρξαν τουλάχιστον 35 περιστατικά, την τουριστική περίοδο του 1994, εκ των οποίων τα 3 ήταν θανατηφόρα. Επίσης γίνεται αναφορά στην Ελλάδα το 1990-1995, καθώς υπήρχαν 134 άτομα που επισκέφθηκαν την χώρα μας και νόσησαν (αναφέρονται 1123 κρούσματα συνδεδόμενα με ταξίδια στις ευρωπαϊκές χώρες). Επιπλέον, έχει διαγνωστεί σε Έλληνες ασθενείς, καθώς και σε αλλοδαπούς τουρίστες που επισκέφτηκαν τη χώρα μας <sup>(60)</sup>. Η διάγνωση όμως πολλών περιστατικών γίνεται στη χώρα καταγωγής των τουριστών και τα Εθνικά Κέντρα Αναφοράς της Νόσου των Λεγεωνάριων ενημερώνονται μέσω του δικτύου του European Working Group of *Legionella* Infections και για αυτό δεν είναι τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα απόλυτα αντιπροσωπευτικά.

Το 1976, κατά τη διάρκεια μιας έρευνας, λόγω επιδημικής έκρηξης Λεγεωνέλλας που σχετίστηκε με το Memoria Union στην Ιντιάνα, αρκετές

οροομάδες *L. pneumophila*, απομονωθήκαν από το λάσπη και φυτόχωμα από ένα ρυάκι εκεί κοντά. Παρόλαυτά δεν απομονώθηκε κανένα βακτήριο Λεγεωνέλλας από χώμα δίπλα στα κτήρια του νοσοκομείου ή και σε κάποια απόσταση από αυτά <sup>(61)</sup>. Είδη Λεγεωνέλλας *L. pneumophila* (από το νοσοκομείο της Ιντιάνα), *L. gormanii* και *L. jamestowniensis*, από διαφορετικές περιοχές εκεί απομονώθηκαν <sup>(14)</sup>.

Όπως έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο 1 για την μορφολογία, η Λεγεωνέλλωση είναι πνευμονία λόγω *Legionella* spp, όπου το 90% είναι *Legionella pneumophila*. Το δεύτερο είδος Λεγεωνέλλας που είναι πιο συχνό στον κόσμο είναι *Legionella longbeachae* <sup>(14)</sup>, όπου στην Αυστραλία οφείλεται το 30% των καταγραφόμενων περιπτώσεων Λεγεωνέλλας.

Το 1968, στο Πόντιακ της Πενσυλβένια έκανε τη πρώτη του εμφάνιση ο πυρετός Πόντιακ, με η αιτία ένα ελαττωματικό σύστημα κλιματισμού. Το 1973 το ίδιο είδος πυρετού που οφείλεται σε βακτήριο της Λεγεωνέλλας εμφανίστηκε στο Τζέιμς Ρίβερ στην Βιρτζίνια εξαιτίας ενός μηχανήματος καθαρισμού με δούλευε με πεπιεσμένο αέρα, που χρησίμευε για τον καθαρισμό τουρμπίνας ατμού. Το 1981 αιτία Πόντιακ πυρετού στο Βερμόντ ήταν ένα τζακούζι και την ίδια χρονιά στον Καναδά ήταν ένα ψυκτικό σύστημα βασισμένο στο νερόσε ένα εργοστάσιο συναρμολόγησης μηχανών (σε αυτήν την περίπτωση υπήρχε και *L. feeleii*). Το 1982 αιτία και στο Ρότζεστερ του Μίσιγκαν ήταν ένα τζακούζι <sup>(62)</sup>.

Η πρώτη φορά όπου σαν αίτιο πνευμονίας αναγνωρίστηκε η *Legionella longbeachae* ήταν το 1981 <sup>(63)</sup>. Από τότε υπήρχαν αρκετές σποραδικές περιπτώσεις σχετικές από Σουηδία, Γερμανία, Δανία, Καναδά. Η πρώτη φορά απομόνωσης *Legionella longbeachae* οροομάδας 1 από ασθενή στην Αυστραλία

ήταν το 1987 . Από εκείνη την στιγμή άλλες 29 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις Λεγεωνέλλωσης από *Legionella longbeachae* ορομάδα 1 ανακαλύφθηκαν στην Νότια Αυστραλία. Οι 23 από αυτές τις περιπτώσεις έγιναν Οκτώβριο 1988 – Ιανουάριο 1989 <sup>(64)</sup>.

Την άνοιξη του 1984, το Υπουργείο Υγείας της Νέας Υόρκης, ερεύνησε μία επιδημική έκρηξη 28 ατόμων με Ποντιακό Πυρετό από *L. pneumophila* ορομάδας 1 σε ένα γραφείο εργασίας στο Μανχάταν <sup>(62)</sup>.

Το 1985, στο Ηνωμένο Βασίλειο μία μεγάλη επιδημική έκρηξη που σχετίστηκε με το Γενικό Νοσοκομείο Stafford District Από 68 ασθενείς με Λεγεωνέλλα οι 22 κατέληξαν. Επιπλέον, 35 ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στο σπίτι τους και έπασχαν από Λεγεωνέλλα, είχαν επισκεφτεί το νοσοκομείο κατά τη διάρκεια του Απριλίου του 1985. Για εκείνη την επιδημική έκρηξη το BBC ανέφερε 101 μολύνσεις από Λεγεωνέλλα που ως αποτέλεσμα είχαν 28 θανάτους <sup>(65)</sup>.

Η γενετική συσχέτιση της *Legionella longbeachae* που απομονώθηκε στην Αυστραλία μέχρι το 1987, ερευνήθηκε με ανάλυση πολυμορφισμού στο μήκος των περιοριστικών θραυσμάτων (restriction fragment length polymorphism=RFLP) και ηλεκτροφόρηση με αλλοζύμη. Στην έρευνα αυτή απομονώθηκαν τα παρακάτω είδη και ορομάδες Λεγεωνέλλας :

- 11 *Legionella longbeachae* ορομάδας 1 απομονώθηκαν από ανθρώπους
- 28 *Legionella longbeachae* ορομάδας 1 απομονώθηκαν από περιβαλλοντικές πηγές
- 3 περιβαλλοντικές απομονώσεις *Legionella longbeachae* ορομάδας 2

Από την έρευνα αυτή φάνηκε η κοντινή σχέση όλων των απομονώσεων αυτών εκτός των τριών περιβαλλοντικών δειγμάτων <sup>(64,66)</sup>.

Το Ολλανδικό Εθνικό Πρόγραμμα Ανίχνευσης Επιδημικών Εκρήξεων (DNLODP) ερεύνησε όλες τις περιπτώσεις Λεγεωνέλλας από το 1987 με αφορμή έναν ασθενή που κατέληξε τον Δεκέμβριο του 2004 από *L. longbeachae*. Έτσι βγήκαν στην επιφάνεια 3 περιπτώσεις που κατέληξαν, όπως έχει ήδη ανφερθεί στην Ιστορική αναδρομή, στις 7 και 27 Αυγούστου του 2000 και στις 4 Νοεμβρίου 2004 <sup>(14)</sup>.

Το 1989 απομονώθηκε *L. longbeachae* οροομάδα 1 από φυτοχώματα και από ασθενείς με πνευμονία στην Νότια Αυστραλία <sup>(66)</sup>. Καθώς δεν βρέθηκε κάποια πηγή μόλυνσης έγιναν υποθέσεις πως η μοναδική πηγή ήταν τα φυτοχώματα <sup>(67)</sup>.

<b>Πηγή και επιπολασμός Λεγεωνέλλας σε φυτόχωμα κατασκευασμένο από Αυστραλία και Ευρώπη</b>				
Πηγή	Αριθμός κατασκευαστών	Αριθμός φυτοχωμάτων που ελέχθησαν	Επί της % με:	
			<i>L. longbeachae</i> οροομάδα 1	<i>Legionella</i> spp
<b>ΑΥΣΤΡΑΛΙΑ</b>				
Νότια Αυστραλία	6	34	16 (47)	20 (59)
Δυτική Αυστραλία	1	2	2 (100)	2 (100)
Νότια Νέα Ουαλία	2	3	2 (67)	2 (67)
Βικτόρια	4	6	6 (100)	3 (50)
<b>ΕΥΡΩΠΗ</b>				
Ηνωμένο Βασίλειο	6	14	0	0
Ελλάδα	2	4	0	0
Ελβετία	1	1	0	0

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Πηγή και επιπολασμός Λεγεωνέλλας σε φυτοχώματα Αυστραλίας και Ευρώπη που δημοσιεύτηκαν το 1990 <sup>(68)</sup>

Σε δημοσίευση του 1994 αναφέρεται πως έχει βρεθεί Λεγεωνέλλα σε πολλά δείγματα από κομπόστα χώματος, η οποία χρησιμοποιείται από ερασιτέχνες και



επαγγελματίες κηπουρούς. Το κυρίαρχο είδος Λεγεωνέλλας που απομονώθηκε είναι η *Legionella pneumophila*, εκτός τη οροομάδα 1. Επιπλέον και άλλα είδη ήταν παρόντα όπως *Legionella longbeachae* οροομάδας 1, που εμπλέκεται με τις μολύνσεις σε ανθρώπους στην Νότια Αυστραλία <sup>(69)</sup>.

Τον Μάρτιο του 1999 στην Ολλανδία, στο Μπόνκαρσελ, έγινε μία επιδημική έκρηξη σε μία έκθεση λουλουδιών που αρρώστησαν 200 άτομα και τουλάχιστον 32 κατέληξαν. Μπορεί οι άνθρωποι που κατέληξαν να ήταν περισσότεροι, καθώς ορισμένοι ήδη είχαν ταφεί πριν ταυτοποιηθεί από τι είχαν νοσήσει. Πιθανότητα η η πηγή αυτής της μόλυνσης ήταν ένας υγροποιητής <sup>(65)</sup>.

Τον Ιούλιο του 2001, στην Μούρτσια της Ισπανία, έγινε η μεγαλύτερη επιδημική έκρηξη Λεγεωνέλλας. Παραπάνω από 800 περιπτώσεις ήταν ύποπτες για νόσο των Λεγεωναρίων. Οι ασθενείς άρχισαν να εμφανίζονται στο νοσοκομείο στις 7 Ιουλίου και ο τελευταίος που νοσηλεύτηκε ήταν στις 22 του ίδιου μήνα. Από τις 800 περιπτώσεις οι 636-696 ήταν κατά εκτίμηση και οι 449 επιβεβαιώθηκαν. Τελικώς 6 άτομα κατέληξαν. Αυτό που προκάλεσε αυτήν την επιδημική έκρηξη ήταν ένας πύργος ψύξης νοσοκομείου <sup>(65)</sup>.

Την ίδια χρονιά, καταγράφει και η πρώτη γνωστή επιδημική έκρηξη της Νορβηγίας. Τότε 28 άτομα νόσησαν και 7 κατέληξαν. Στο Σάβανγκερ όπου έγινε και το περιστατικό, οι αρχές είχαν προβληματιστεί, καθώς όσοι νόσησαν και όσοι κατέληξαν έμεναν σε διαφορετικές περιοχές. Μετά από μία μεγάλη έρευνα για το αίτιο και με την λανθασμένη εντύπωση πως ήταν ένα σιντριβάνι, η πηγή ήταν ένας πύργος ψύξης ξενοδοχείου (SAS RADISSON ξενοδοχείο). Το ενδιαφέρον είναι πως μόνο 3 από τους νοσήσαντες διέμεναν σε αυτό. Η έξοδος όμως του πύργου αυτού έβγαινε προς μία διπλανή στάση λεωφορείου, όπου και εμολύνοντο άτομα

από διαφορετικά σημεία της πόλης, αλλά και από άλλες χώρες, που όμως είχαν χρησιμοποιήσει την συγκεκριμένη στάση λεωφορείων και που έτσι ενόσησαν από τη νόσο των Λεγεωναρίων <sup>(65)</sup>.

Το 2002 στο Barrow – in – Fourness στις Ηνωμένες Πολιτείες μία επιδημική έκρηξη Λεγεωνέλλας, έληξε με 6 γυναίκες και έναν άντρα θανόντες. Άλλοι 172 άνθρωποι νόσησαν τη νόσο Λεγεωναρίων <sup>(65)</sup>.

Τον Δεκέμβριο του ίδιου χρόνου, μία επιδημική έκρηξη στα νοτιοανατολικά προάστια του Χοβ, στο Μπράϊτον και στο Κρίστις Μπιτς , είχε 9 ανθρώπους που νόσησαν από Λεγεωνέλλα ( *L. longbeachae* ορρομάδα 1) και κατέληξαν 2 <sup>(70)</sup>.

Το 2004 στην Γαλλία, εξαιτίας ενός μολυσμένου πύργου ψύξης, όπου μετέφερε τα μολυσμένα σταγονίδια 6 χιλιόμετρα στον αέρα προς τα πάνω, κατέληξαν 21 άτομα από τα 86 που είχαν επιβεβαιωθεί πως έπασχαν από Λεγεωνέλλα <sup>(65)</sup>.

Μεταξύ Απριλίου και Αυγούστου του 2005, Νέα Ζηλανδία έγινε μία επιδημική έκρηξη με 20 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις νόσου των Λεγεωναρίων, από τις οποίες 3 κατέληξαν. Και σε αυτήν την περίπτωση, όπως παραπάνω, αιτία ήταν ένας πύργος ψύξης <sup>(65)</sup>.

Στη Νορβηγία, τον Μάιο του 2005, με 52 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις νόσου Λεγεωναρίων και 10 θανάτους. Πηγή μόλυνσης ήταν ένας ιονιστής <sup>(65)</sup>.

Τον Οκτώβριο του ίδιου χρόνου, τουλάχιστον 21 άνθρωποι κατέληξαν και 10 ένιωσαν αδιάθετοι, κατά τη διάρκεια μίας επιδημικής έκρηξης στο Τορόντο <sup>(65)</sup>.

Από το 2005 έως το 2007 το DNLODP ταυτοποίησε πως 6 από 37 ομάδες κρουσμάτων σχετίζονται με κάποιου είδους κήπο, χωρίς να δίνονται περισσότερες

λεπτομέρειες. Από τους 12 ασθενείς που συμμετείχαν οι 10 είχαν διαγνωστεί με *L. pneumophila* , οι 4 θετικοί στην οροομάδα 1 και 1 στην οροομάδα 3.

Στην Αυστραλία , αλλά όχι στην Ιαπωνία, έχει βρεθεί *L. pneumophila* στα φυτοχώματα <sup>(14,61,71)</sup>. Επίσης, από τη μεγαλύτερη έρευνα για τη Λεγεωνέλλα που έχει απομονωθεί από τμήματα του αναπνευστικού μόνο τα 8 είδη με 12 οροομάδες ήταν παθογόνα για τον άνθρωπο σε χρόνια αναπνευστική πνευμονοπάθεια. Οι απομονώσεις έγιναν:

- Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής 76%
- Ιταλία 10,9%
- Αυστραλία 5,1%
- Ελβετία 4,5%
- Νέα Ζηλανδία 3,6%

Από τα παραπάνω στοιχεία της έρευνας η *L. longbeachae* ήταν μόνο το 4,1% και τα 13 από αυτά προέρχονται από Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία <sup>(72)</sup>.

Από κάποια φυτοχώματα Αυστραλίας, δεκατριών κατασκευαστών, απομονώθηκαν *Legionella longbeachae* οροομάδας 1 και *Legionella* spp από το 73% από τα 45 φυτοχώματα που ελέγχθηκαν. Ταυτόχρονα, ελέγχθηκαν 19 φυτοχώματα από την Ελλάδα, την Ελβετία και την Αγγλία, το διάστημα Μάρτιος 1989 - Μάιος 1990, χωρίς να απομονωθεί *Legionella longbeachae* <sup>(61,73)</sup>.

Το 2007, στην Αυστραλία, μία επιδημική έκρηξη πιστεύεται πως ξεκίνησε από μόλυνση κατά τη διάρκεια από μίας πρωτοχρονιάτικης γιορτής και αιτία ήταν ένας πύργος ψύξης, όπου βρέθηκαν 1,400 cfu/ml *Legionella*. Τότε 7 συνολικά περιπτώσεις νόσου των Λεγεωναρίων επιβεβαιώθηκαν <sup>(65)</sup>.

Την ίδια χρονιά στη Νέα Υόρκη, 6 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις νόσου Λεγεωνάριων σημειώθηκαν σε ένα κέντρο αποκατάστασης ασθενών που νοσηλευόταν. Αυτό που θεωρήθηκε αίτιο για τη μόλυνση ήταν το σύστημα θέρμανσης του κτηρίου. Την επόμενη χρονιά, στο Ρότζεστερ, υπήρχαν 2 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις στο Γενικό Νοσοκομείο της περιοχής <sup>(65)</sup>.

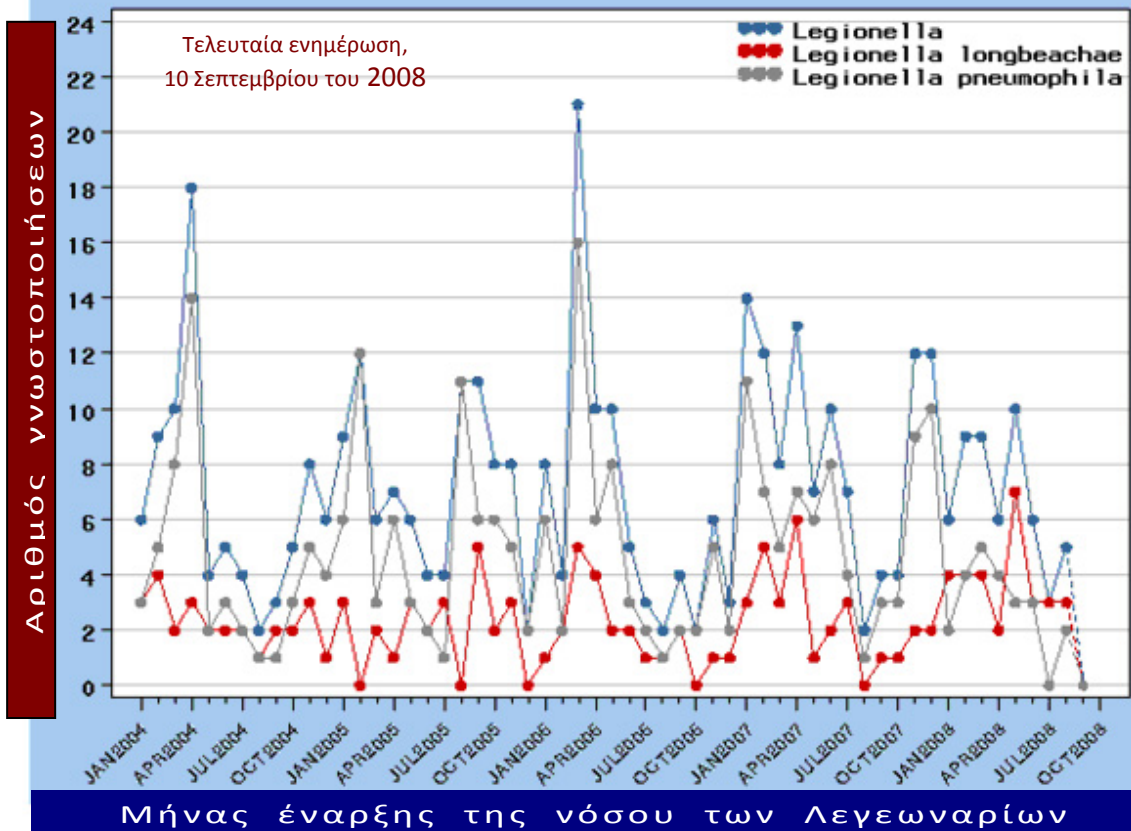
Στο Ορλάντο, το Μάρτιο του 2008, στο Κέντρο Υγείας του Όραντζ Κάουντυ, 2 άτομα που διαμέναν σε σουίτες πολυτελείας νόσησαν από νόσο των Λεγεωναρίων, πιθανότατα λόγω της πισίνας και των λουτρών χαλάρωσης όπου δεν χρησιμοποιούσαν υποχλωριώδες νάτριο για απολύμανση <sup>(65)</sup>.

Τον Ιούλιο του 2008 στην Νέα Υόρκη, στις Συρακούσες, μία επιδημική έκρηξη είχε ως αποτέλεσμα τη μόλυνση 11 ανθρώπων από Λεγεωνέλλα, με εργαστηριακή επιβεβαίωση. Ένα από αυτά τα άτομα κατέληξε. Πηγή της μόλυνσης ήταν ένας πύργος ψύξης στο Γενικό Κρατικό Νοσοκομείο. Τον επόμενο μήνα, στην Ελμίρα, υπήρξαν 10 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις Λεγεωνέλλας και 2 θάνατοι <sup>(65)</sup>.

Μόλυνση από *L.longbeachae* είναι περισσότερο συχνή στη Δυτική Αυστραλία, παρόλο που έχουν καταγραφεί και αλλού <sup>(57,74,75)</sup>, όπως στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής <sup>(76)</sup> και Ευρώπη, πχ. Ολλανδία <sup>(14)</sup>.

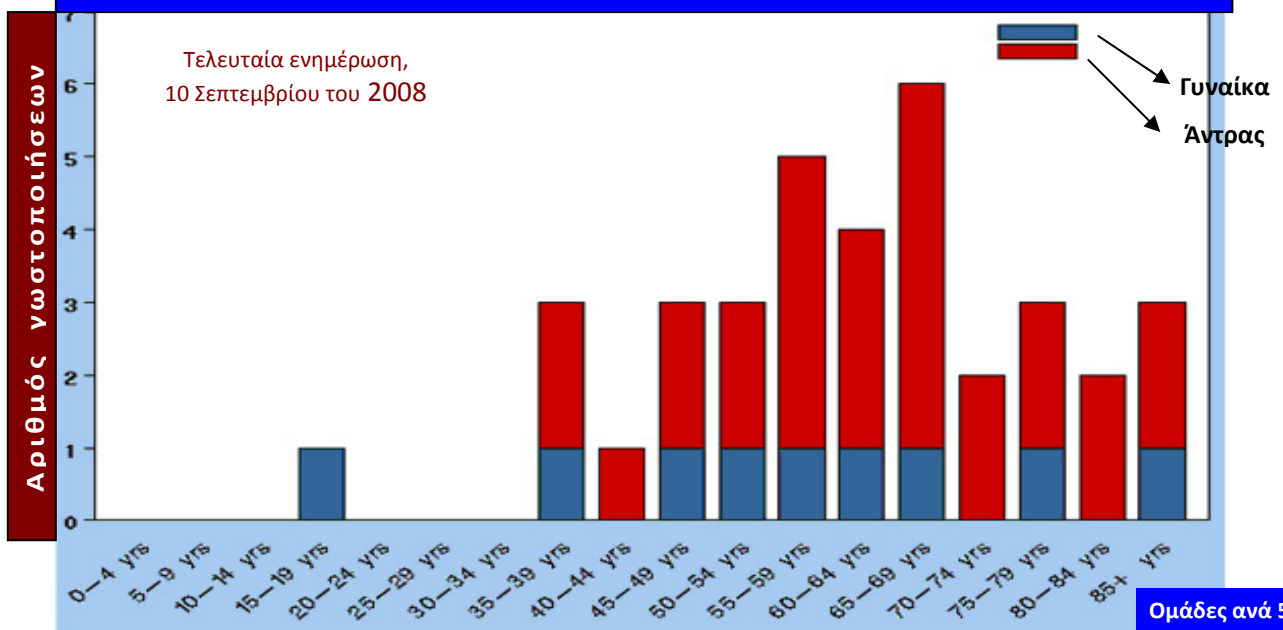
Στο σχήμα 1 φαίνεται πως πρώτη έρχεται η *Legionella pneumophila* και δεύτερη η *Legionella longbeachae*, όπως έχει ήδη αναφερθεί, σε σχέση με τη *Legionella* spp <sup>(78)</sup>. Αντίστοιχα, στο δεύτερο σχήμα, φαίνεται πόσο πιο ευαίσθητοι είναι οι άνδρες στην *Legionella* spp.

**Δήλωση κρουσμάτων Λεγεωνέλλας για τους κάτοικους της Αυστραλίας (NSW) ανά μήνα έναρξης της νόσου. Ιανουάριος 2004 – Σεπτέμβριος 2008**



Σχήμα 1. Σχεδιάγραμμα σύγκρισης Legionella spp με Legionella pneumophila και Legionella longbeachae στο NSW από τον Ιανουάριο του 2004 έως τον Σεπτέμβριο του 2008<sup>(77)</sup>

**Δήλωση κρουσμάτων Legionella longbeachae των κατοίκων της Αυστραλίας**



Σχήμα 2. Δήλωση κρουσμάτων Legionella longbeachae για τους κατοίκους της Αυστραλίας (NSW) κατά ηλικιακές ομάδες 5 ετών, φύλο, και μήνα έναρξης νόσου των Λεγεωναρίων, από 1 Σεπτεμβρίου 2007 έως 31 Αυγούστου 2008. Οι περιπτώσεις που το φύλο και η ηλικία είναι άγνωστα, δεν έχουν συμπεριληφθεί<sup>(77)</sup>.

### 3.2.ΠΩΣ ΜΕΤΑΔΙΔΕΤΑΙ

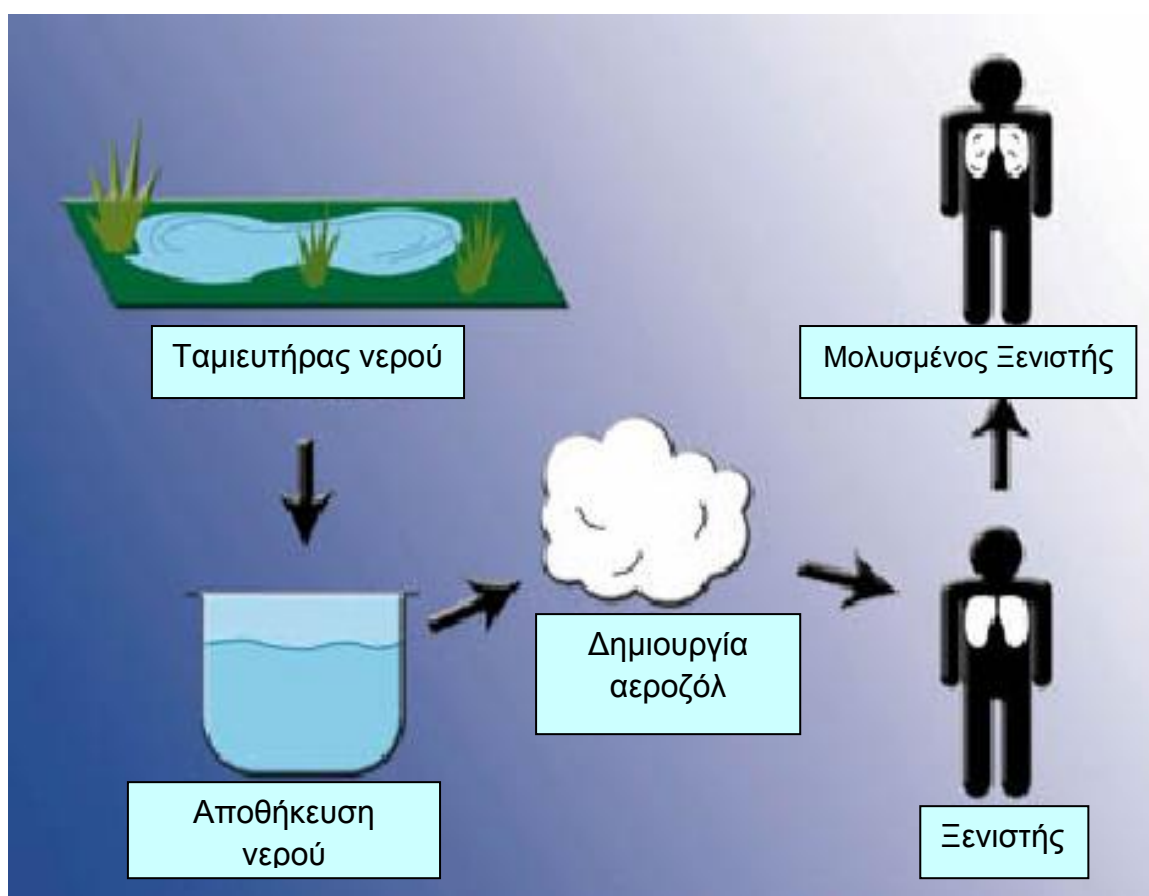
Τα νοσήματα που γενικώς προκαλούνται από οποιαδήποτε είδος Λεγεωνέλλας, ονομάζονται Λεγεωνελλώσεις (η νόσος των Λεγεωναρίων). Είναι όρος που χρησιμοποιείται για την ασθένεια που προκαλείται από την *Legionella pneumophila*. Παρόλαυτά «η νόσος των Λεγεωνάριων» έχει καταστεί ο δημοφιλής όρος που χρησιμοποιείται όταν αναφέρεται κανείς σε οποιαδήποτε σοβαρή μορφή πνευμονίας η οποία προκαλείται από οποιοδήποτε είδος Λεγεωνέλλας. Επομένως και από τη *Legionella longbeachae* η οποία μπορεί να βρεθεί στα φυτοχώματα, χώμα, τύρφη, ειδικά προστατευτικά διατήρησης υγρασίας και μείγματα ειδικά για κήπους <sup>(44)</sup>. Δεν είναι τυχαίο πως η ετοιμολογία του είδους *Legionella pneumophila*, στα ελληνικά είναι φίλος των πνευμόνων <sup>(23)</sup>. Εκτός από τη νόσο των Λεγεωναρίων, υπάρχει και ο πυρετός Πόντιακ που οφείλεται σε βακτήριο Λεγεωνέλλας.

Η Λεγεωνέλλα είναι μία μορφή πνευμονίας <sup>(58,79)</sup>, που μπορεί να είναι από ελαφριά έως ικανή να απειλήσει ακόμα και την ανθρώπινη ζωή <sup>(80)</sup>. Η περίοδος επώασης της είναι 2 – 10 μέρες.

Μέχρι σήμερα οι τρόποι μετάδοσής της *Legionella* δεν είναι πλήρως γνωστοί. Ο πιο συχνός τρόπος ώστε ένας οργανισμός να μολυνθεί από Λεγεωνέλλα είναι όταν εισπνέεται νερό το οποίο βρίσκεται σε μορφή αεροζόλ (διάμετρος 1 - 5μm) που εισπνέεται από κάποιον ευαίσθητο ξενιστή και περιέχει βακτήρια Λεγεωνέλλας (εικόνα 10) <sup>(19,79,81,82,83)</sup>.

Μελέτες όμως έχουν δείξει πως η μόλυνση από Λεγεωνέλλα επιτυγχάνεται και μέσω εισπνοής αερολυμάτων από χώμα και σκόνη, τα οποία περιέχουν μικροοργανισμούς Λεγεωνέλλας, που προέρχονται από φυτοχώματα, λιπάσματα,

προστατευτικά χώματος [(αποσυντεθειμένα φύλλα ή σεντόνια πλαστικού) τα οποία τοποθετούνται στο χώμα, για προστασία και αποτροπή από το να στεγνώσει, από το να φαγωθούν οι σπόροι ή και προστασία ριζών]. Γενικότερα, μόλυνση με το βακτήριο της Λεγεωνέλλας γίνεται εφόσον με οποιοδήποτε τρόπο με τον οποίο, το συγκεκριμένο βακτήριο να φτάσει στους πνεύμονες, ακόμα και αν αυτό συμπεριλαμβάνει ως μέσο μεταφοράς του βακτηρίου το χέρι, που έχει έρθει σε επαφή με τα παραπάνω, είτε και το στόμα<sup>(44,47,55,57)</sup>.



Εικ. 10. Σχηματοποίηση μόλυνσης ξενοστή από αεροζόλ με *Legionella spp*

Νέες ενδείξεις υποδεικνύουν και έναν άλλον τρόπο μετάδοσης της. Η αναρρόφηση που βοηθά τα βακτήρια να εισχωρήσουν στους πνεύμονες. Δηλαδή το “πνίξιμο” όπου με τα ανατακλαστικά του οργανισμού, αντί οι εκκρίσεις του στόματος να πάνε στον οισοφάγο και στη συνέχεια στο στομάχι, πάνε στους πνεύμονες. Ο προστατευτικός μηχανισμός των οργανισμών σε περίπτωση

πνιξίματος, δε λειτουργεί σωστά σε καπνίζοντες και σε όσους έχουν νοσήματα των πνευμόνων <sup>(23)</sup>.

Η *Legionella* μπορεί δυνητικά να προσβάλει τον οποιοδήποτε, αλλά είναι συχνότερη σε άτομα τα οποία:

- είναι μεσήλικα ή μεγάλα σε ηλικία (πχ. άνω των 50)
- είναι άντρες
- πάσχουν από άσθμα, διαβήτη, χρόνια προβλήματα πνευμόνων, νεοπλασματικά νοσήματα, νεφρική ανεπάρκεια και γενικότερα από χρόνια νοσήματα
- έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση οργάνων
- είναι HIV θετικά
- έχουν μειωμένο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως για παράδειγμα άτομα που μόλις συνέρχονται από κάποια αρρώστια
- βρίσκονται υπό αγωγή με κορτικοειδή ή με χημειοθεραπευτικά ή ακτινοβολίες
- καπνίζουν <sup>(47,48)</sup>

Για κανένα είδος Λεγεωνέλλας, δεν έχει καταγραφεί μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο, πχ. μέσω βήχα <sup>(47,84,85)</sup>. Επιπλέον, μετάδοση της νόσου των Λεγεωναρίων από *Legionella* spp δεν υφίσταται και από άνθρωπο σε ζώα <sup>(47)</sup>.

Στα είδη που απομονώνονται από φυτόχλωμα, ο κυρίως τρόπος μόλυνσης, είναι η εισπνοή της σκόνης που δημιουργείται από:

- **Λίπασμα**
- **Κουμαρόχλωμα**
- **Χώμα**
- **Καστανόχλωμα**



- Φυτόχωμα
- Τύρφη
- Κομπόστα
- Φυλλόχωμα
- Μείγμα για φύτεμα
- Είδη χώματος που χρησιμοποιούνται για παρόμοιους σκοπούς και που περιέχουν το βακτήριο, με δυνητική πρόκληση νόσου των Λεγεωναρίων

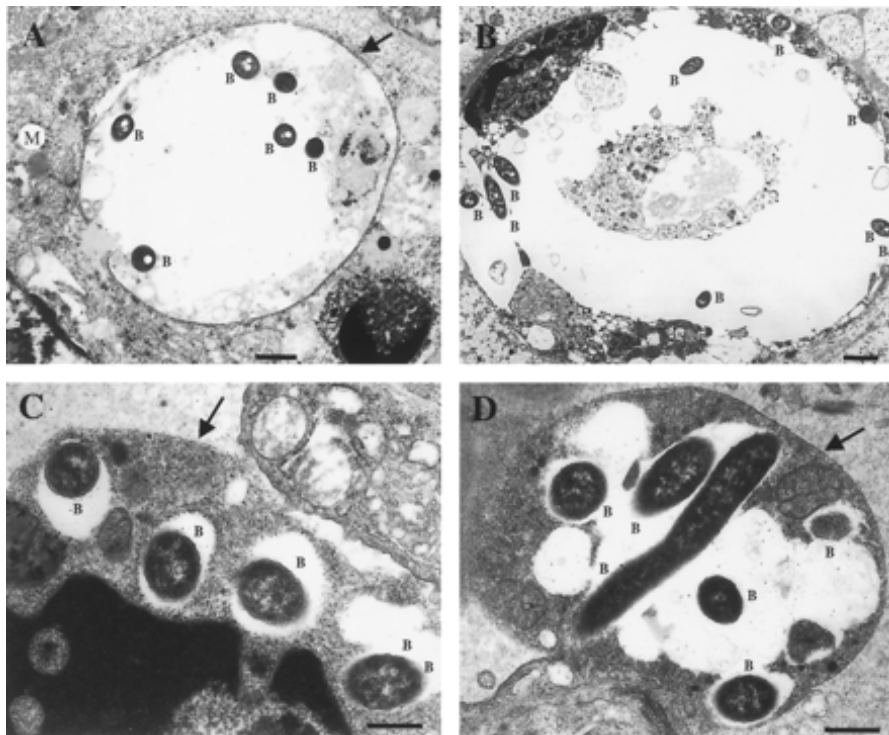
(43,44,52,84)

Στη σύγχρονη εποχή, ένα μέρος των περιστατικών με λοίμωξη από *Legionella* spp, που αφορά πηγή μόλυνσης τα παραπάνω στον πίνακα, έχει ανιχνευτεί σε άτομα που χειρίζονται φορτία ρυμουλκών των χωμάτων κηπουρικής και όχι μόνο σε άτομα που χειρίζονται χώμα τοποθετημένο σε σάκο <sup>(47)</sup>.

Έρευνες έχουν αποδείξει ότι μολύνεται μόνο το 2-5% των ατόμων που εκτέθηκαν στο βακτήριο (για παράδειγμα, η μόλυνση μπορεί να προκληθεί από τη ροή μιας βρύσης ή ενός ντους, από τον καθαρισμό μιας τουαλέτας ή από τις φυσαλίδες που ανεβαίνουν στην επιφάνεια του νερού μιας δεξαμενής spa) <sup>(49)</sup>.

Επίσης, πρέπει να αναφερθεί πως το νερό που χρησιμοποιείται ως πόσιμο ή για πλύσιμο των χεριών, περιέχει μικρούς αριθμούς του βακτηρίου και ακόμα δεν είναι γνωστή η συμβολή του στη μετάδοση, παρόλο που υπάρχουν ενδείξεις μεταφοράς από κατάποση του βακτηρίου, όμως κάτι τέτοιο είναι αρκετά σπάνιο <sup>(44)</sup>.

Στην εικόνα 12 παρουσιάζονται οι περιβαλλοντικοί παράγοντες και τα κλινικά κριτήρια για τη μετάδοση της νόσου των λεγεωνάριων <sup>(86)</sup>.

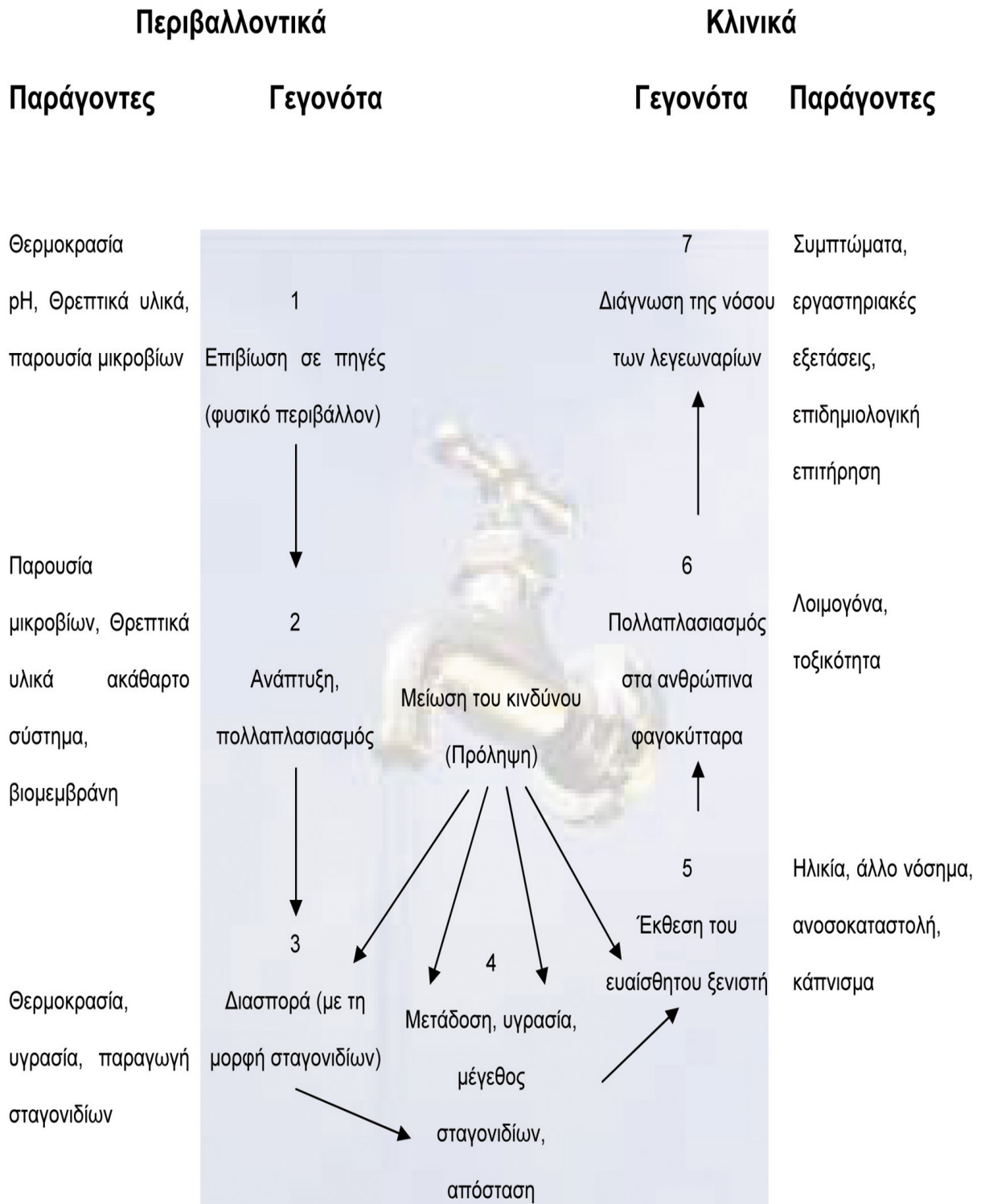


Εικ. 11. Από μικροσκόπιο: η θέση της *L. longbeachae*, οροομάδας 1, μέσα στο κύτταρο

Είναι σημαντικό να τονισθεί, όπως έχει ήδη αναφερθεί, επειδή η Λεγεωνέλλα δεν μεταδίδεται από άνθρωπο σε άνθρωπο <sup>(23,43,87)</sup>, δεν είναι απαραίτητο να ληφθούν μέτρα προφύλαξης όταν κάποιος έρχεται σε επαφή με κάποιον που πάσχει από νόσο των Λεγεωναρίων <sup>(23)</sup>. Επιπλέον, δεν υπάρχει περίπτωση κάποιος να μολυνθεί από Λεγεωνέλλα πίνοντας νερό <sup>(51)</sup>.



## ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΤΗΣ ΛΕΓΕΩΝΕΛΛΑΣ



Εικ. 12. Μετάδοση της Λεγεωνέλλας <sup>(49)</sup>

### 3.2.1. ΛΟΓΟΙ ΑΥΞΗΣΗΣ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΩΝ ΜΟΛΥΝΣΗΣ

Υπάρχουν κάποιοι παράγοντες που βοηθούν στην ανάπτυξη της πιθανότητας μόλυνσης από βακτήριο της Λεγεωνέλλας:

- Υψηλή συγκέντρωση Λεγεωνέλλας, αρκετά βακτήρια πρέπει να είναι παρόντα σε ένα αεροζόλ για να προκαλέσουν μόλυνση
- Το μέγεθος των σταγονιδίων του αεροζόλ να είναι σε τέτοιο μέγεθος που να μπορεί με την εισπνοή να φτάσει στους πνεύμονες
- Οι δυνητικοί ασθενείς:
  - να είναι μεσήλικες και κυρίως ηλικιωμένοι
  - να είναι καπνιστές ή πρώην καπνιστές
  - να έχουν χρόνιες αρρώστιες
  - να είναι με ανοσοκαταστολή
  - να καταναλώνουν υψηλές ποσότητες αλκοόλ
  - να είναι άντρες ( έχουν υψηλότερο κίνδυνο μόλυνσης και κυρίως όσοι είναι άνω των 50)
  - να είναι καθαριστές για πύργους ψύξης, ιαματικά λουτρά-κέντρα κλπ
  - να χειρίζονται φυτόχωμα ή μείγματα για φύτεμα κλπ

Ο κίνδυνος να νοσήσει κάποιος από την νόσο των Λεγεωναρίων μπορεί να μειωθεί αρκετά, όπως θα αναφερθεί αναλυτικότερα παρακάτω, με τον προσεκτικό σχεδιασμό, την καλή κατασκευή και τη σωστή προσεκτική συντήρηση πύργων ψύξης, συστημάτων αέρα χειροκίνητα, κυκλοφορίας ζεστού νερού και άλλων πιθανών πηγών αεροζόλ, και τα ίδια βήματα για τον χειρισμό φυτοχωμάτων.

Τρόποι μόλυνσης από Λεγεωνέλλα από χώμα ή φυτόχωμα μπορεί να οφείλονται σε :

- Άνοιγμα εμπορικών προϊόντων κοντά στο πρόσωπο χωρίς τη χρήση προστατευτικής μάσκας για τη μύτη και το στόμα
- Ψέκασμα επιφανειακό φυτών με προωθητήρα για να τα διατηρεί φρέσκα
- Το σκάλισμα του χώματος με τρόπο που να δημιουργεί σκόνη <sup>(23,52,57)</sup>.



Εικ. 13. Ένα έργο τέχνης που μπορεί να είναι αιτία μόλυνσης *Legionella spp*

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΔΙΑΣΠΟΡΑ *LEGIONELLA* SPP**

### **4.1. ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΕΤΑΙ Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ *LEGIONELLA* SPP ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΜΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ**

Οι μικροοργανισμοί Λεγεωνέλλας στο περιβάλλον μπορούν να ανιχνευτούν στο νερό, όπως ποτάμια και λίμνες, όπως επίσης και είδη σε χώμα – φυτόχωμα, όπως φυτοχώματα φυτών εσωτερικού και εξωτερικού χώρου <sup>(44,49,88)</sup>. Το βακτήριο της Λεγεωνέλλας μπορεί να επιζήσει σε ένα πλήθος συνθηκών και κυρίως σε περιβάλλον υγρό και ζεστό με:

- Θερμοκρασίες: 0 – 63°C
- pH: 5,0 – 8,5
- COD (χημικά απαιτούμενο οξυγόνο στο νερό): 0,2 – 15 ppm

Ο πιο καθοριστικός παράγοντας πολλαπλασιασμού της Λεγεωνέλλας είναι η θερμοκρασία. Παρόλο που τα βακτήρια της Λεγεωνέλλας έχουν βρεθεί σε νερά θερμοκρασίας 60°C, ο έντονος πολλαπλασιασμός του βακτηρίου γίνεται σε θερμοκρασίες 20 – 45°C και συγκεκριμένα στους 35 – 43°C. Μεγάλης διάρκειας στους 50°C ή μικρότερη έκθεση σε υψηλότερες θερμοκρασίες είναι επαρκής για την καταστροφή των βακτηρίων <sup>(27,44)</sup>. Η Λεγεωνέλλα και άλλοι μικροοργανισμοί μπορούν να βρεθούν σε στερεές επιφάνειες υδάτινου περιβάλλοντος συνεισφέροντας τους και αποτελώντας τμήματα βιοφίλμ <sup>(2,27)</sup>.

Η παρουσία διάφορων πρωτόζωων, οργανικών ουσιών και αλγών σε υγρό περιβάλλον προσφέρουν εύφορο έδαφος ανάπτυξης – πολλαπλασιασμού της Λεγεωνέλλας και ευνοούν την επιβίωση της για αρκετό χρονικό διάστημα <sup>(49)</sup>.

Είναι εντυπωσιακό να υπογραμμιστεί πως η ανάπτυξη άλλων οργανισμών στηρίζεται στην ύπαρξη ιζημάτων και στη δημιουργία διαφόρων προϊόντων <sup>(23)</sup>, καθώς και μικρές συγκεντρώσεις συγκεκριμένων μετάλλων όπως ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος και το κάλιο που δρουν ως καταλυτικοί παράγοντες (απότομη αύξηση) για την ανάπτυξη Λεγεωνέλλας <sup>(44)</sup>. Έτσι η δημιουργία τέτοιων προϊόντων και στοιχείων από τα υλικά που κατασκευάζονται τα συστήματα ύδρευσης μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη Λεγεωνέλλας <sup>(2,23,27)</sup>. Για παράδειγμα, το πλαστικό που χρησιμοποιείται στην ένωση σωληνώσεων νερού ακόμα και το γαλβανισμένο σίδηρο που έχει χρησιμοποιηθεί για κάποιες σωληνώσεις <sup>(44)</sup>.

Επιπλέον, το χώμα είναι πλούσιο σε αρκετούς μικροοργανισμούς που βοηθούν στην ανάπτυξη των φυτών. Αλλά όπως ο τέτανος, έτσι και η Λεγεωνέλλα μπορούν να βρεθούν σε φυτοχώματα και σε υπόστρωμα οργανικών πρώτων υλών, συμπεριλαμβανομένων και έτοιμων προϊόντων για τον κήπο (φυτοχώματα, εμπλουτιστικά κλπ). Αυτά τα προϊόντα μπορούν να επαναμολυνθούν ακόμα και μετά την αποστείρωση <sup>(80)</sup>.

Γενικά, η ανάπτυξη της Λεγεωνέλλας στηρίζεται στα συστήματα ύδρευσης ως αποτέλεσμα του συνδυασμού θερμοκρασιών <sup>(21)</sup>, περιβαλλοντικής μικροχλωρίδας, ιζημάτων, χημικών συστατικών του νερού στα συστήματα που δημιουργήθηκαν από ανθρώπινο χέρι. Επίσης, βοηθάει η στασιμότητα του νερού <sup>(44)</sup>.

Καθώς τα βακτήρια της Λεγεωνέλλας μπορούν να βρεθούν σε φυσικές πηγές νερού, σε συστήματα κυκλοφορίας νερού, σε ψυκτικά συστήματα και σε χώματα και μείγματα για φυτά, είναι αναπόφευκτη η επαφή τους με τον άνθρωπο. Κάτω από ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης της Λεγεωνέλλας, συμβαίνει αύξηση του αριθμού των βακτηρίων που μπορούν να βρεθούν σε αυτά τα μέρη <sup>(44)</sup>. Στοιχεία από έρευνες

δείχνουν πως η μόλυνση μπορεί να μεταφερθεί μέχρι και 8 χιλιόμετρα μακριά από ένα μολυσμένο πύργο ψύξης, εάν υπάρχουν οι κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες <sup>(1)</sup>.

Ό,τι συμβαίνει στο νερό, το ίδιο γίνεται και στο φυτόχλωμα. Όταν τα οργανικά υλικά είναι ζεστά και υγρά, είναι δυνατόν να δημιουργήσουν ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη Λεγεωνέλλας. Σωροί από κομμένα ξύλα, όπως αυτά κλαδέματος, προσφέρουν υπόβαθρο για τέτοια ανάπτυξη. Η ζέστη που δημιουργείται από την αποσύνθεση βοηθά την ανάπτυξη σε μεγάλο βαθμό των βακτηρίων της Λεγεωνέλλας. Εδώ, πρέπει να τονιστεί η ανάγκη προσοχής του οποιουδήποτε χειρίζεται τέτοια οργανικά υλικά, είτε σε επαγγελματικό επίπεδο, είτε σε οικιακό επίπεδο <sup>(48)</sup>.

#### **4.1.1. ΠΡΟΤΥΠΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΛΕΓΕΩΝΕΛΛΑΣ**

Για την ανίχνευση Λεγεωνέλλας από δείγματα που προέρχονται από το περιβάλλον υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι. Το 1998 από τον Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης ISO 11731 (International Organization for Standardization), ανέπτυξαν ένα διεθνές πρότυπο για την ενοποίηση όλων αυτών των διαφορετικών στρατηγικών. Αυτό το πρότυπο χρησιμοποιείται από αρκετά Ινστιτούτα για αποδοτική αποκατάσταση και ανίχνευση Λεγεωνέλλας (ISO, 2004) <sup>(26)</sup>.

Επίσης, είναι σημαντικό να αναφερθεί η απομόνωση *Legionellae* με την βοήθεια αμοιβάδων. Η καλλιέργεια της λεγεωνέλλας μαζί με αμοιβάδες έχει ως αποτέλεσμα την απομόνωσή της από διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα. Αυτό οφείλεται στο ότι οι αμοιβάδες θεωρούνται ξενιστές της λεγεωνέλλας και γενικότερα ως μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες απομονώσεις μικροοργανισμών σε



καλλιέργειες κυττάρων ενός είδους <sup>(89,90)</sup>. Αυτός ο τρόπος είναι ο καλύτερος για απομόνωση της λεγεωνέλλας από χώματα τα οποία έχουν μολυνθεί από βιομηχανικά απόβλητα <sup>(91)</sup>.

<b>ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ ΤΗΣ ΛΕΓΕΩΝΕΛΛΑΣ</b>	
<b>70-80 °C</b>	Θερμοκρασιακό εύρος απολύμανσης βακτηρίου Λεγεωνέλλας
<b>66 °C</b>	Το βακτήριο Λεγεωνέλλας θανατώνεται σε 2 λεπτά
<b>60 °C</b>	Το βακτήριο Λεγεωνέλλας θανατώνεται σε 32 λεπτά
<b>55 °C</b>	Το βακτήριο Λεγεωνέλλας θανατώνεται σε 5 - 6 ώρες
<b>50-55 °C</b>	Το βακτήριο Λεγεωνέλλας επιζεί, αλλά δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί
<b>20-50 °C</b>	Θερμοκρασιακό εύρος ανάπτυξης βακτηρίου Λεγεωνέλλας
<b>35-46 °C</b>	Ιδανικό θερμοκρασιακό εύρος ανάπτυξης βακτηρίου Λεγεωνέλλας
<b>Κάτω από 20 °C</b>	Το βακτήριο Λεγεωνέλλας επιζεί αλλά είναι σε κατάσταση αδράνειας και ασφαλώς δεν πολλαπλασιάζεται

ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Θερμοκρασίες που επηρεάζουν την επιβίωση του βακτηρίου της Λεγεωνέλλας <sup>(28)</sup>

## 4.2. ΣΗΜΕΙΑ ΑΝΕΥΡΕΣΗΣ *LEGIONELLA* SPP (ΣΗΜΕΙΑ ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΟΥ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ)

Οι οργανισμοί Λεγεωνέλλας στο περιβάλλον μπορούν να ανιχνευτούν σε:

➤ **Υδάτινα σώματα:**

- Ποτάμια
- Λίμνες
- Ρυάκια
- Υπόγεια νερά
- Αρτεσιανές πηγές <sup>(44)</sup>

➤ **Μερικά είδη χώματος:**

- Φυτόχωμα
- Καστανόχωμα
- Τύρφη
- Κουμαρόχωμα
- Καστανόχωμα
- Κακτόχωμα
- Compost
- Μείγματα για φύτεμα <sup>(44)</sup>

➤ **Διάφορα υλικά που έχουν βρεθεί σε συστήματα νερού όπως:**

- Πλαστικά
- Λάστιχα (κυρίως αυτά που χρησιμοποιούνται στις ενώσεις σωληνώσεων) <sup>(44)</sup>
- Ξύλο

Επιπλέον, τα βακτήρια της Λεγεωνέλλας μπορούν να βρουν επιφάνειες για ανάπτυξη και προστασία σε:

- Οργανικά ιζήματα
- Ανόργανα ιζήματα
- Υγρά κατασταλάγματα
- Λάσπη
- Υπολείμματα προϊόντων
- Άλατα

Προσοχή πρέπει να δοθεί όταν υπάρχει σε τεχνητό περιβάλλον κάποιο από τα παραπάνω και αποκοπεί τμήμα του και επιμολύνει και άλλο σημείο.

Εύρεση του βακτηρίου της Λεγεωνέλλας σε συσσώρευση (και ιδιαίτερα αν συντρέχουν τα παραπάνω) γίνεται σε:

- Πύργους ψύξης (δεν έχει σημασία αν είναι σε οροφή ή σε υπόγειο χώρο)<sup>(49)</sup>
  - Συστήματα κυκλοφορίας ζεστού νερού
  - Συσκευές θέρμανσης
  - Νερό στους 20°C - 45 °C
  - Ιαματικές πηγές
  - Υγροποιητές
  - Ατμοποιητές
  - Ψεκαστήρες, νεφοποιητές
  - Εξαμιστικούς συμπυκνωτές<sup>(49,27)</sup>
  - Ντουζιέρες
  - Βρύσες



Εικ. 14. Μέσα μόλυνσης *Legionella* spp



- Ποτιστήρια (μπαλκονιών, κήπων κλπ)
- Κλιματιστικά
- Τεχνητά συστήματα ραντίσματος
- Εγκατάστασης πλυσίματος αυτοκινήτων
- Υπερυψωμένες δεξαμενές (όπου δημιουργείται αεροζόλ για χρήση)
- Δεξαμενές νερού (πχ. πισίνες, δεξαμενές υδρομαλάξεων όπως τα spa, δηλαδή το αν το νερό είναι κρύο ή ζεστό δεν παίζει κάποιο σημαντικό ρόλο, όσον αφορά στην αποθήκευσή του κατά τέτοιο τρόπο)
  - Χαμάμ, Jacuzzi
  - Εξοπλισμοί και συστήματα αναπνευστικών συσκευών
  - Οδοντιατρικός εξοπλισμός
  - Μέρη όπου διαβρέχονται φρούτα και λαχανικά για να φαίνονται φρέσκα (πχ σε υπεραγορές και λαϊκές)
    - Συντριβάνια, τεχνητοί καταρράκτες (και περισσότερη προσοχή πρέπει να δίνεται σε αυτά που είναι σε εσωτερικούς χώρους)
- Οδοντιατρεία <sup>(92)</sup>
- Εργοστάσια παραγωγής πλαστικού
- Ορυχεία
- Οικοδομές
- Υπόγειους συρμούς
- Κατασκευές σιδηροδρόμων <sup>(20)</sup>
- Κλπ <sup>(2,27,44,49,51,57,71)</sup>

Τα κλιματιστικά τα οποία χρησιμοποιούν αντί νερό παγωμένο αέρα, δεν συμπεριλαμβάνονται στον κατάλογο επικίνδυνων σημείων ανεύρεσης Λεγεωνέλλας <sup>(44)</sup>.

### 4.3. ΧΩΜΑ

Τα διάφορα χώματα που χρησιμεύουν στην ανθοκομία γενικότερα στην Ελλάδα:

- Δασοχώματα (κουμαρόχωμα, ρεικόχωμα, το οποίο περιέχει ρετσίνι, σχοινόχωμα, καστανόχωμα, τσιπουρόχωμα κλπ)
- Φυλλόχωμα ή Φυτόχωμα (από ποώδη και άλλα τρυφερά φυτά, χλόη, αποσυνθεμένα, χωνεμένα)
- Φυτόχωμα κορμού δέντρων
- Τσιπουρόχωμα
- Κοπρόχωμα θερμοσπορείων
- Τύρφη
- Η τελείως χωνεμένη κοπριά
- Κοκκινόχωμα
- Χώμα κήπου ή αγρού
- Χώμα χλωροτάπητος
- Καθαρή ποταμίσια άμμος
- Λάσπη ποταμιών (σε ελάχιστες περιπτώσεις)
- Τεχνητά υλικά
- Ξυλοκάβουνο
- Κομπόστα
- Χούμος<sup>(93,94)</sup>



Εικ. 15. Φυτόχωμα



Εικ. 16. Χρήση χώματος για φυτά εσωτερικού – εξωτερικού χώρου

Θεωρώντας σημαντική τη διαφοροποίηση όλων αυτών των χωμάτων που χρησιμοποιούνται στην χώρα μας, θα γίνει μία μικρή ανάλυση τους.

**Δασοχώματα:** είναι τα φυλλοχώματα και φυτοχώματα τα οποία δημιουργούνται από την αποσύνθεση των φυτών και των κλαδιών που υπάρχουν στο ανώτερο τμήμα φύλλων και κλαδιών στα δάση. Η σύστασή τους διαφέρει, ανάλογα τον τόπο στον οποίο βρίσκονται τα δάση, αλλά και από την σύσταση των δασών. Έχει σημασία το πόσο φρέσκα είναι για την ανάλογη κατακράτηση νερού. Έχουν τη δυνατότητα να χωνεύουν εύκολα και είναι πλούσια σε αφομοιώσιμο κάλιο και φώσφορο και σε εύκολα νιτροποιούμενο άζωτο. Ορισμένα από αυτά είναι: οξυάς, καπρίνου, φτελιάς, δρυός, σφεδάμου, καστανιάς κουμαρόχωμα, σχινόχωμα, χαρουπόχωμα, ελατόχωμα, πευκόχωμα, φυτόχωμα βρύων. Από αυτά, χρησιμοποιούνται τα 7 τελευταία <sup>(94)</sup>.

**Φυλλόχωμα ή φυτόχωμα:** είναι τα ποώδη φυτά, τα χόρτα, τα φύλλα που έχουν σαπίσει, τα οποία μπορούν να βρεθούν και σε έναν κήπο. Ανάλογα τα συστατικά αυτά, εξαρτάται και το pH του. Μπορεί να χουμοποιηθεί σε διάφορους βαθμούς και να χρησιμοποιηθεί ανάλογα και επιπλέον είναι πλούσιο σε οργανικά στοιχεία.

**Φυτόχωμα κορμού δένδρων:** το πιο γνωστό τέτοιο χώμα στην Ελλάδα είναι το καστανόχωμα και προτιμάται κυρίως καθαρό και όχι νοθευμένο. Πρέπει να αναφερθεί πως δεν περιέχει ασβέστη και είναι σημαντικό να είναι χωνευμένο όχι σε μεγάλο βαθμό. Καμιά φορά βρίσκεται ανακατεμένο με φυλλόχωμα καστανιάς.

**Τσιπουρόχωμα:** υπάρχει σε ορισμένα μέρη της Ελλάδας και είναι κατάλληλο για φυτά γλαστρών. Δε δίνει μεγάλη διαπερατότητα.

**Κοπρόχωμα θερμοσπορείων:** τα συστατικά του για τη δημιουργία του μέσω χουμοποίησης συνήθως είναι φύλλα ειδικά για παραγωγή θερμότητας,

αχυροστρωμνή και κόπρος αλόγου. Έχει pH 6-7,5, μεγάλη περιεκτικότητα σε ασβέστη και είναι πλούσιο σε στοιχεία.

**Τύρφη:** είναι οργανικής προελεύσεως και σύστασης καύσιμο ίζημα που σχηματίζεται περισσότερο ή λιγότερο αποσυντεθειμένων και χουμιωμένων φυτικών συστατικών στα έλη και σε συνθήκες έλλειψης ατμοσφαιρικού αέρα. Γίνεται εισαγωγή από το εξωτερικό (Αγγλία, Ιρλανδία, Σκωτία, Καναδάς, Εσθονία, Γερμανία, Ολλανδία, Πολωνία). Υπάρχουν πολλά είδη ανάλογα την προέλευσή τους, αλλά και τον βαθμό απανθρακώσεως της φυτικής ύλης (καθώς είναι και είδος ορυκτού άνθρακα που προήλθε από ατελή απανθράκωση φυτικών οργανισμών). Κατά άλλους μεγάλο μέρος συντίθεται από οργανική ύλη. Στερείται μεταλλικών στοιχείων και ανάλογα με την επιθυμητή οξύτητα προστίθεται ή όχι ασβέστης. Θεωρείται και βελτιωτικό δομής εδάφους <sup>(95,96,97)</sup>.

**Η τελείως χωνεμένη κοπριά:** η καλά χωνευμένη κόπρος και λαμβάνει μέρος σε διάφορα μείγματα. Καλύτερη είναι η αλογίσια, λόγω σπανιότητας χρησιμοποιείται η γιδίσια και η αγελαδινή αποκλείεται. Είναι λιπαρό, πλούσιο και έχει pH περίπου 6.

**Χώμα κήπου ή αγρού:** σύσταση ανάλογη με την προέλευση

**Χώμα χλωροτάπητος:** είναι η χουμοποίηση χλωροταπήτων 20x30 εκ και πάχους 15 εκ.. Σπάνια χρησιμοποιούν μόνο προϊόντα από χουμοποίηση ποσότητας αυτού.

**Καθαρή ποταμίσια άμμος:** πρέπει να είναι αρκετά χονδρή με πυριτική προέλευση. Υπάρχει περίπτωση χρήσης άμμου ασβεστολιθικής προελεύσεως.

**Τεχνητά υλικά:** τέτοια είναι ο περλίτης (πέτρωμα κοκκιώδες χαλαζιακό, διογκωμένο τεχνητά ελαφρύ, ηφαιστειακής προελεύσεως) και ο βερμικουρλίτης

(μοιάζει με τον περλίτη στην προέλευση και στην μορφή με μεγαλύτερη υδατοχωρητικότητα).

**Ξυλοκάρβουνο:** σε διάφορα μείγματα προστίθενται μικρά τεμάχια ξυλοκάρβουνου, έτσι ώστε να γίνονται πιο πορώδες.

**Κομπόστα:** είναι τα σαπισμένα φυτά σε συνδυασμό με κοπριά. (φυτικά υλικά που σαπίζουν με τη βοήθεια μικροοργανισμών). Οπτικά μοιάζει με υγιές χώμα κήπου. Είναι πλούσιο και έχει σκούρο χρώμα. Επιπλέον, γίνεται και από απορρίμματα κήπου, αλλά και αποφάγια κουζίνας όπου και αποσυντίθενται <sup>(95)</sup>.

**Χούμος:** προέρχεται από αποσυντεθημένη οργανική ύλη. Όταν προστίθεται έδαφος, έχει τη δυνατότητα να κρατά τις θρεπτικές ουσίες. Για παράδειγμα, μία πράσινη κοπριά με χώμα γίνεται χούμος. Η διαφορά με την κομπόστα είναι πως η κομπόστα διασπάται για να παραχθεί χούμος. <sup>(93,94,95)</sup>

Οι κατηγορίες χωμάτων που βρέθηκε, κατά την έρευνά μας, ότι ως επί το πλείστον χρησιμοποιούνται στον Νομό Αττικής:

- Δικό τους προϊόν – μείγμα χώματος
- Κακτόχωμα
- Κακτόχωμα
- Καστανόχωμα
- Κομπόστα
- Κουμαρόχωμα
- Τύρφη
- Φυλλόχωμα
- Φυτόχωμα για γλάστρες και φυτά εσωτερικού χώρου
- Φυτόχωμα για οξύφυλλα φυτά
- Φυτόχωμα για φυτά και λαχανικά εξωτερικών χώρων



**ΕΙΔΟΣ ΧΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΩΝ ΓΙΑ *LEGIONELLA* spp) ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΣΤΗΚΑΝ**

**ΚΑΙ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ**

ΠΕΡΙΧΟΜΕΝΑ ΦΥΤΟΧΩΜΑΤΩΝ		ΕΙΔΟΣ ΦΥΤΟΧΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ																					
		ΦΥΤΟΧΩΜΑΤΑ								ΚΑΚΤΟΧΩΜΑ	ΚΑΣΤΑΝΟΧΩΜΑ				ΚΟΥΜΑΡΟΧΩΜΑ	ΚΟΜΠΟΣΤΑ		ΤΥΡΦΟΧΩΜΑ	ΤΥΡΦΟΚΟΜΠΟΣΤΑ	ΙΔΙΟΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ			
		1	5	6	10	11	13	17	21	2	4	7	8	22	9	12	19	18	20	3	14	15	16
ΤΥΡΦΕΣ	Ελαφρά αποσυντεθημένη τύρφη	-	-	-	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	+	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Ξανθιά τύρφη	+	-	-	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	+	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	+	-	-	+	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Μαύρη τύρφη	+	-	-	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	+	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Τύρφη	-	+	-	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	-	+	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	+	-	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Ελαφρώς αποσυντεθημένη άσπρη τύρφη	-	-	-	Δ.Γ.	+	-	Δ.Γ.	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Υψηλής αξίας παγωμένη μαύρη τύρφη	-	-	-	Δ.Γ.	+	-	Δ.Γ.	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Ισορροπημένο μείγμα τύρφης	-	-	-	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	-	+	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Ελαφρά αποσυντεθημένη ξανθιά τύρφη	-	-	-	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	+	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.

	Υψηλού βαθμού αποσύνθεσης μαύρη τύρφη	-	-	-	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	+	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Μαύρη τύρφη χουμώδη	-	-	-	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	-	-	+	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Ανάμιξη ελαφρώς και πλήρης αποσυντεθημένης τύρφης	-	-	-	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	+	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
ΠΕΤΡΩΜΑΤΑ	Ηφαιστειακή πέτρα	-	-	-	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	+	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Κόκκοι ελαφρόπετρας	-	-	-	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	+	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Άμμος	-	-	-	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	+	+	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Άργιλος	-	-	-	Δ.Γ.	+	-	Δ.Γ.	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	+	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Δολομήτης	-	-	-	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	-	-	+	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Περλίτης	-	+	+	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	+	-	+	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	+	-	-	-	+	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Ανθρακικό ασβέστιο	+	-	-	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
ΧΩΜΑΤΑ	Φυλλόχωμα	-	+	-	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Κουμαρόχωμα	-	-	+	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	-	+	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	+	-	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.

	Κοκκινόχωμα	-	-	+	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	-	+	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Σχινόχωμα	-	-	+	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	-	+	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
ΛΙΠΑΣΜΑΤΑ-ΚΟΜΠΟΣΤΕΣ	Εμπλουτισμένο με οργανικές ουσίες και θρεπτικά συστατικά	-	-	-	Δ.Γ.	-	+	Δ.Γ.	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Οργανική ουσία	-	-	-	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	+	-	-	-	+	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Πράσινα απομεινάρια κομπόστας	-	-	-	Δ.Γ.	+	-	Δ.Γ.	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Κομπόστα	-	-	-	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	+	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Κοπριά-Λίπασμα	+	-	-	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	-	+	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Συνθετικό λίπασμα	-	+	-	Δ.Γ.	-	-	Δ.Γ.	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	-	-	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.	Δ.Γ.
	Δεν αναγράφεται στη συσκευασία	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Δ.Γ.	Δ.Γ.
Άγνωστη σύνθεση	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. Είδος χύματος των δειγμάτων (θετικών και αρνητικών για *Legionella* spp) που εξετάστηκαν σε περιεκτικότητα τους σε διάφορα συστατικά  
 -:Δεν έχει, +:Περιέχει, Δ.Γ: Δεν γνωρίζουμε, □ : Αρνητικό για *Legionella* spp, □ : Θετικό για *Legionella* spp

#### 4.4. ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΣΗΜΕΙΩΝ ΓΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Η επιλογή των κατάλληλων σημείων για δειγματοληψία εξαρτάται από το κατά πόσο η δειγματοληψία αφορά σε συλλογή δειγμάτων για λόγους ρουτίνας ή για τη διερεύνηση μίας επιδημικής έκρηξης. Η χρήση της PCR για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων των Λεγεωνελλών στο περιβάλλον έχει αποδειχτεί χρήσιμη σε ορισμένες έρευνες επιδημικών εκρήξεων Λεγεωνελλώσεως και φαίνεται να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την εξάλειψη επιδημιολογικός και γεωγραφικός ενεχόμενων πηγών μόλυνσης. Αναπτύσσοντας ποσοτικές μέθοδοι για τον καθορισμό του εάν μία πηγή του περιβάλλοντος έχει φορτίο πάνω από το επιθυμητό ή το ανώτατο αποδεκτό όριο όσον αφορά τη Λεγεωνέλλα περιγράφεται από το Ballard και τους άλλους, το 2000<sup>(26,98)</sup>.

Η χρήση της PCR για την ανίχνευση Λεγεωνελλών στο περιβάλλον δείχνει ότι μέχρι το 80% γλυκών νερών είναι θετικό, σε σχέση με μόνο 20-40% όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος της καλλιέργειας για να ανιχνευτεί η Λεγεωνέλλα. Αυτή η διαφορά μπορεί να αποδοθεί στη παρουσία μη βιώσιμων ή τραυματισμένων μικροοργανισμών Λεγεωνέλλας, βιώσιμες αλλά μη καλλιεργήσιμες Λεγεωνέλλες ή και παρουσία νέων ειδών Λεγεωνέλλας.

Ο αριθμός και τα είδη των σημείων που θα πρέπει να ελεγχθούν για ανίχνευση Λεγεωνελλών πρέπει να καθορίζονται πάνω σε εξατομικευμένη για κάθε σύστημα βάση. Αυτό λόγω της ποικιλότητας των υδραυλικών συστημάτων, των συστημάτων θέρμανσης, αερισμού και κλιματισμού στους διάφορους χώρους που θα πρέπει ενδεχομένως να δειγματοληπτηθούν πχ. :

- ✓ Δημόσιες εγκαταστάσεις
- ✓ Νοσοκομεία
- ✓ Εργαστηριακές εγκαταστάσεις
- ✓ Ξενοδοχεία

✓ Οικιακά περιβάλλοντα

✓ κλπ

✓ Οίκοι ευγηρίας

Γενικά οποιαδήποτε πηγή που μπορεί να παράγει αεροζόλ μπορεί να θεωρηθεί μία δυνητική πηγή μετάδοσης Λεγεωνέλλας. <sup>(26)</sup>.

Γίνονται οι τρέχουσες έρευνες, οι οποίες στηρίζονται σε άλλα περιβάλλοντα, πχ. Χώμα, για να προσδιοριστούν τα πιο επικίνδυνα σημεία από αυτά τα περιβάλλοντα ώστε να γίνεται η κατάλληλη επιλογή σημείων, τρόποι δειγματοληψίας και αριθμό δειγμάτων.



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΡΟΛΗΨΗ Κ' ΕΛΕΓΧΟΣ**

### **5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Η πρόληψη και ο έλεγχος είναι δύο ζητήματα πολύ σημαντικά σε κάθε τομέα εργασίας και έρευνας. Όπως σε κάθε επάγγελμα ή σε κάθε εργασία πρέπει και εδώ να λαμβάνονται μέτρα πρόληψης για την αποφυγή τραυματισμού ή και βλάβης του ανθρώπινου οργανισμού. Σε αυτό το κεφάλαιο θα αναφερθούν τεχνικές αποφυγής μόλυνσης από *Legionella* spp.

### **5.2. ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΛΗΨΗΣ**

Είναι αρκετά σημαντικό ο οποιοσδήποτε ασχολείται με δειγματοληψία νερού, με συντήρηση τεχνητών μέσων που το νερό σε οποιοδήποτε στάδιο του μπορεί να βρεθεί σε μορφή αεροζόλ καθώς και με φύτεμα, πότισμα φυτών ή οτιδήποτε έχει να κάνει με χώμα που αφορά φυτά και λαχανικά πρέπει να παίρνει προληπτικά μέτρα για την αποφυγή μόλυνσης από Λεγεωνέλλα. Φυσικά, ένα πρώτο σημαντικό στάδιο θα ήταν όλοι όσοι καπνίζουν να σταματήσουν, καθώς και όσοι καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες αλκοόλ να το ελαττώσουν, καθώς εμφανίζονται επιρρεπείς στη νόσο των Λεγεωναρίων. Ταυτόχρονα, όσοι ανήκουν στην κατηγορία των ατόμων με υψηλό κίνδυνο μόλυνσης (όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3, εκεί που αναφέρονται οι λόγοι αύξησης πιθανοτήτων μόλυνσης) θα πρέπει να είναι πιο προσεχτικοί<sup>(23)</sup>. Θα πρέπει να επισημανθεί η απουσία εμβολιασμού για τη Λεγεωνέλλα και για αυτό είναι σημαντικό να ληφθούν μέτρα που μειώνουν τον κίνδυνο μόλυνσης από τον μικροοργανισμό<sup>(51)</sup>.

Τα περιβαλλοντικά δείγματα Λεγεωνέλλας θα πρέπει να λαμβάνονται από άτομα τα οποία:

- ✓ είναι έμπειρα
- ✓ να γνωρίζουν την οικολογία της Λεγεωνέλλας
- ✓ να γνωρίζουν τη γενική αξιολόγηση του κινδύνου, τόσο για τον εαυτό τους, όσο και για τους άλλους
- ✓ έχουν περάσει ειδική εκπαίδευση (κυρίως για να επιλέγουν δείγματα που είναι πιθανό να περιέχουν τον μεγαλύτερο αριθμό βακτηρίων)

Υπάρχουν περιπτώσεις που είναι υποχρεωτική η χρήση αναπνευστικού εξοπλισμού. Όμως, καθώς η Λεγεωνέλλα συσχετίζεται συνήθως με τον κεντρικό κλιματισμό (πύργοι ψύξης), πριν ληφθούν από αυτά δείγματα, μπορούν να απενεργοποιηθούν και έτσι δεν υπάρχει κίνδυνος. Βέβαια, δε συμβαίνει το ίδιο με συστήματα υγρής ψύξης, που συνήθως χρησιμοποιούνται για ψύξη σε ορισμένες εργοστασιακές διεργασίες, όπου και πρέπει να ληφθούν μέτρα προστασίας πριν τη λήψη δειγμάτων. Επιπλέον εάν παρά τα μέτρα προστασίας δεν μπορεί να ληφθεί με ασφάλεια δείγμα, θα πρέπει η μηχανική διάταξη που κάνει την ψύξη να γίνει ασφαλής, όσο πιο σύντομα γίνεται <sup>(26)</sup>.

Αρκετές χώρες και περιοχές έχουν καταρτίσει οδηγίες για τη λήψη δειγμάτων. Μέσω του Internet είναι διαθέσιμες όλες οι πληροφορίες και συμβουλές για τις μεθόδους αυτές. Επίσης, είναι διαθέσιμες οδηγίες της Ευρώπης και Ηνωμένου Βασιλείου.

Για τα είδη του μικροβίου στα οποία οφείλεται η μόλυνση λόγω επαφής ανθρώπου - φυτοχώματος υπάρχουν συμπληρωματικά μέτρα πρόληψης, καθώς η μόλυνση μπορεί να μη γίνει μόνο κατά τη διάρκεια δειγματοληψίας των φυτοχωμάτων

(η οποία διαφέρει από αυτήν του νερού), αλλά και κατά τη διάρκεια της εργασίας. Για τους κηπουρούς, για όσους ασχολούνται με τον κήπο τους, με τις γλάστρες τους ή τα κτήματα τους, τους αγρότες, τους ανθοπώλες, όσους εργάζονται σε θερμοκήπιο και γενικότερα για όσους εργαζομένους σε χώρους που υπάρχει ή και έρχονται σε επαφή με φυτοχώματα, υπάρχουν κάποια μέτρα προστασίας που πρέπει να ακολουθούν. Αυτά είναι:

- Ελαχιστοποίηση της σκόνης που δημιουργείται κατά την εργασία στον κήπο-κτήμα κλπ
- Πότισμα κήπου- γλαστρών κλπ με νερό σε μικρή ένταση εκτόξευσης (να μην σηκώνεται χώμα και δημιουργεί σκόνη αναπνεύσιμη)
- Να μην ανακινούνται οι συσκευασίες που περιέχουν φυτοχώμα, τύρφη κλπ.
- Να υγραίνονται τα φυτοχώματα πριν από την χρήση τους (σε περίπτωση εμπορικού προϊόντος, να γίνεται μία μικρή εγκοπή στη συσκευασία και με τη βοήθεια λάστιχου να διαβρέχεται το εσωτερικό της)
- Να ανοίγονται οι συσκευασίες των φυτοχωμάτων αργά και μακριά από το πρόσωπο
- Να επιβεβαιώνεται πως ο χώρος εργασίας (θερμοκήπιο, αποθήκη φυτών κλπ) αερίζεται καλά
- Να φοριέται κατάλληλη μάσκα προστασίας αναπνοής (να καλύπτεται το στόμα και η μύτη) με την οποία να ελαττώνεται ο κίνδυνος εισπνοής σκόνης που μπορεί να περιέχει βακτήρια της Λεγεωνέλλας ή των



σταγονιδίων νερού από τα διάφορα είδη ποτίσματος που μπορεί και αυτά να περιέχουν βακτήρια Λεγεωνέλλας

- Σε περίπτωση ανάπτυξης συμπτωμάτων γριπώδους συνδρομής τα οποία χειροτερεύουν να συμβουλευθούν το γιατρό τους (συγκεκριμένα αντιβιοτικά μπορούν να βοηθήσουν εάν δοθούν νωρίς) (44,51,52,57,84,99,100,101).

Σύμφωνα με τον Dr. Paul Van Buynder, ο οποίος είναι σύμβουλος στο Department of Health Principal Medical της Δυτικής Αυστραλίας υπάρχουν πέντε βασικά βήματα που πρέπει κάποιος να ακολουθήσει για να αποφύγει την μόλυνση από *L. longbeachae*. Αυτά είναι:

- Διάβασμα των προειδοποιήσεων στα έτοιμα προς χρήση φυτοχώματα και μείγματα για φύτεμα, πριν τη χρήση
- Πάντα να φοριούνται γάντια κατά το χειρισμό του χώματος, φυτοχώματος ή του μίγματος χώματος για φυτά
- Αποφυγή εισπνοής των παραπάνω, φορώντας κατάλληλη μάσκα προστασίας αναπνοής
- Προσεκτική ύγρανση των παραπάνω ειδών χώματος, όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν
- Καλό πλύσιμο χεριών μετά το χειρισμό των παραπάνω ειδών χωμάτων, ακόμα και εάν έχουν φορεθεί γάντια <sup>(47,102)</sup>.

Πρέπει να τονιστεί ότι στην Αυστραλία, πάνω στις συσκευασίες φυτοχωμάτων υπάρχουν ειδικές ενδείξεις προειδοποίησης για την *L. longbeachae* <sup>(43)</sup>.

Σε περίπτωση που κάποιος χειριστεί τέτοια είδη φυτοχωμάτων και εφόσον εντός σε 2 με 10 μέρες εμφανίσει:

- Ξαφνική υψηλή θερμοκρασία ή πυρετό
- Ξερό βήχα
- Απώλεια όρεξης
- Αδυναμία αναπνοής
- Κρυάδες, πόνοι μυών και πονοκέφαλοι <sup>(47)</sup>

θα πρέπει να επισκεφτεί το γιατρό του όσο πιο γρήγορα γίνεται, ως προληπτικό μέτρο, καθώς σε περίπτωση μόλυνσης, όσο πιο νωρίς αρχίσει η αντιμετώπισή της, τόσο πιο αποτελεσματική είναι η θεραπεία της. Όπως έχει ήδη αναφερθεί ένας τρόπος που έχει αρχίσει να εδραιώνεται για τον τρόπο μόλυνσης είναι ο τρόπος μέσω εισρόφησης. Έτσι θα πρέπει να δίνεται προσοχή για τη μόλυνση, από το χέρι στο στόμα, για αυτό, έστω προληπτικά τα χέρια θα πρέπει να πλένονται πολύ καλά, μετά από χειρισμούς τέτοιων οργανικών υλικών και να φοριούνται γάντια. Για να μην όμως δημιουργηθεί πρόβλημα ευαισθησίας στο πλαστικό των γαντιών, μια καλή ιδέα θα ήταν η χρήση γαντιών από δέρμα, που θα πλένονται συχνά <sup>(48)</sup>.

Είναι πολύ σημαντικό θέμα η μείωση της πιθανότητας μόλυνσης. Ορισμένοι μπορεί να θελήσουν να «απολυμάνουν» τα φυτοχώματα πριν τη χρήση τους ή ακόμα και να αγοράζουν αποστειρωμένα προϊόντα. Θα πρέπει να αναφερθεί πως και αποστείρωση να γίνει των χωμάτων, η Λεγεωνέλλα μπορεί να ξανά αναπτυχθεί, καθώς η επιμόλυνση γίνεται εύκολα. Θα πρέπει να δίδεται φροντίδα ώστε ο χώρος στον οποίο γίνεται η αποθήκευση των προϊόντων χώματος, να μην ευνοεί την

ανάπτυξη της Λεγεωνέλλας. Ο χώρος αυτός θα πρέπει να αερίζεται, η θερμοκρασία να μην ανεβαίνει και να διατηρείται καθαρός <sup>(57)</sup>.

Είναι σημαντικό ο κάθε ένας να προσέχει και να είναι υπεύθυνος για τις κινήσεις του και για την μείωση της επικινδυνότητας μόλυνσης. Κυρίως όσοι ανήκουν στην ομάδα των ανθρώπων που διατρέχουν περισσότερο κίνδυνο. Είναι πολύ πιο ασφαλής μία στάση υπευθυνότητας παρά η υιοθέτηση μίας στάσης σιγουριάς, πολλές φορές θεωρούν ότι έχουν εμπειρία και ότι λόγω αυτής εφαρμόζουν χαλαρότερα μέτρα προφύλαξης, γεγονός που τους οδηγεί σε λοιμώξεις από Λεγεωνέλλα <sup>(48)</sup>.



*Εικ. 17. Τα μέτρα πρόληψης είναι πολύ σημαντικά για την προστασία από Legionella spp*

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ Κ' ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΕΡΕΥΝΑΣ**

### **6.1. ΣΚΟΠΟΣ**

Αυτή η διπλωματική εργασία στοχεύει στην απομόνωση *Legionella* spp σε περιβάλλοντα φυτόχωμα που δεν υπάρχουν δεδομένα απομάκρυνσης του μικροβίου στη χώρα μας, αλλά και με ελάχιστες εξαιρέσεις και στον Ευρωπαϊκό χώρο, όπως πχ. Το χώμα και ιδιαίτερα το φυτόχωμα σε διάφορες μορφές του, για χρήση τόσο σε οικιακό περιβάλλον όσο και σε επαγγελματικό. Η απομόνωσή του από τέτοια περιβάλλοντα, θα συνεισφέρει μια ακόμη πιθανή πηγή μόλυνσης, ιδίως για περιστατικά νόσου των Λεγεωναρίων της κοινότητας που δεν εξηγούνται από τις μέχρι σήμερα γνωστές οδούς και πηγές μόλυνσης. Σκοπός είναι, στην περίπτωση που βρεθεί το βακτήριο της Λεγεωνέλλας, να υπάρξει ενημέρωση των ανθρώπων που κινδυνεύουν, η κατάρτιση μέτρων πρόληψης και ελέγχου και η γνωστοποίηση των σωστών μέτρων πρόληψης.

### **6.2. ΔΕΙΓΜΑ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Το σύνολο των δειγμάτων που πρέπει να μελετηθούν, αφορά σε φυτοχώματα, τα οποία είτε είναι έτοιμα προς χρήση (εσωτερικού – εξωτερικού χώρου), είτε τα φτιάχνουν ιδιώτες για χρήση επαγγελματική – προσωπική. Ο Νομός εντός του οποίου διεξάγεται η έρευνα αυτής τη διπλωματικής έρευνας είναι η Αττική.

### 6.2.1. ΕΡΕΥΝΑ ΕΥΡΕΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Το πρώτο βασικό βήμα για την συγκεκριμένη έρευνα είναι η εύρεση ολοκληρωμένης λίστας των φυτωρίων, ανθοπωλείων, θερμοκηπίων που πωλούν ή χρησιμοποιούν φυτοχώματα διαφόρων ειδών έτοιμα προς πώληση αλλά ή/και ιδιοπαρασκευής τους. Η έρευνα ήταν δυσχερής και ο σχετικός κατάλογος του Υπουργείου Γεωργίας που βρισκόταν ήδη στο διαδίκτυο, ήταν αρκετά ελλιπής. Επιπλέον γινόταν συνέχεια μεταβολές σε αυτόν τον κατάλογο, καθώς συμπεριλαμβάνοντο μόνο όσες επιχειρήσεις τέτοιου είδους δεν είχαν πρόβλημα με τις άδειες τους. Έτσι πολλά φυτώρια, ανθοπωλεία και θερμοκήπια δεν υπήρχαν καθόλου στον κατάλογο. Για αυτόν τον λόγο χρειάστηκε παραπάνω έρευνα που περιλάμβανε τα εξής βήματα:

- Χρήση Χρυσού Οδηγού από το έτος 2000 έως και το 2007 και τηλεφωνήματα σε όσα αφορούσαν τις συγκεκριμένες κατηγορίες
- Χρήση Χρυσού Οδηγού διαδικτυακά
- Χρήση διαδικτύου εύρεσης σελίδων για
  - Σελίδες συλλογής φυτωρίων, ανθοπωλείων και θερμοκηπίων
  - Μεμονωμένες σελίδες φυτωρίων, ανθοπωλείων και θερμοκηπίων
- Ψάξιμο «πόρτα – πόρτα» (ψάξιμο σε περιοχές για ότι δεν είχε καταγραφεί στην λίστα)

Η έρευνα απεδείχθει αρκετά χρονοβόρα, χρόνος πολύτιμος για την έκβαση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας. Μετά από μία πιο πλήρη λίστα, έπρεπε να γίνει κατηγοριοποίηση ανάλογα με τις περιοχές στις οποίες έπρεπε να ληφθούν τα δείγματα. Για αυτό το λόγο ο Νομός Αττικής χωρίστηκε:

- Κέντρο Αθήνας
- Νότια Προάστια
- Βόρεια Προάστια
- Ανατολικά Προάστια
- Δυτικά Προάστια
- Θριάσιο
- Μαραθώνας

Δεύτερο σημαντικό ζήτημα υπήρξε ο εντοπισμός των κατηγοριών φυτοχωμάτων που χρησιμοποιούνται και έτσι επαναλήφθηκε η ανάλογη με την προαναφερόμενη διαδικασία. Σημειώνεται πως το Υπουργείο Γεωργίας (το Τμήμα Ανθοκομίας και το Τμήμα Λιπασμάτων), δεν ήταν σε θέση να δώσει πληροφορίες σε σχέση με το συγκεκριμένο θέμα. Επιπλέον, έγιναν τηλέφωνα σε όλα τα φυτώρια κλπ., ώστε να αποκλειστούν όλα όσα δεν πουλούσαν φυτόχωμα ή δεν χρησιμοποιούσαν κάποιο δικό τους. Και αυτό το στάδιο υπήρξε εξίσου χρονοβόρο και πολύ δύσκολο.

Οι διάφορες εμπορικές ονομασίες των φυτοχωμάτων εκτός αυτών που παρασκευάζουν τα δικά τους μείγματα, είναι οι παρακάτω:

- |  |   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• ANTHEMIS</li> <li>• APRILIA MIX</li> <li>• BELLAFIORI</li> <li>• BIOTERR</li> <li>• BLUMENERDE</li> <li>• FLORABELLA</li> <li>• FLORAPOT</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• GIARDINI</li> <li>• HOMOFARM</li> <li>• HYPOT</li> <li>• KEKKILA PEAT</li> <li>• KLASMANN PROTGROUND –D</li> <li>• MIKSKAAR      PROFESSIONAL</li> <li>                                     SUBSTRATE</li> </ul> |
|--|---|

- POLYHUM
- PROPEAT PEAT
- SUPER ΧΩΜ
- TERFLOR
- TORF COMPOST
- TRAYSUBSTRAT
- TYPERFLOR
- TYPICAL BRILL
- ΚΑΣΤΑΝΟΧΩΜΑ ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ
- ΑΝΘΟΡΜΟΝ
- ΖΩΝΤΑΝΟ ΦΥΣΙΚΟ ΧΩΜΑ
- ΠΟΥΛΗΜΕΝΟΣ
- ΤΥΠΕΡΦΥΛ



Εικ. 18. Φυτοχώματα που κυκλοφορούν στην αγορά του Νομού Αττικής

Τα είδη λοιπόν χρώματος κηπουρικής που διακινούνται στο εμπόριο είναι τα εξής:

1. Δημιουργία κάθε επιχειρηματία
2. Κακτόχωμα
3. Καστανόχωμα
4. Κομπόστα
5. Κουμαρόχωμα
6. Τύρφη
7. Φυλλόχωμα (μόνο σε ένα φυτώριο βρέθηκε)
8. Φυτόχωμα εξωτερικού χώρου
9. Φυτόχωμα εσωτερικού χώρου
10. Φυτόχωμα για οξύφυλλα

Από αυτά η ποσότητα που θα ελεγχθεί είναι ανάλογη της ποσότητας που κυκλοφορεί σε σχέση με την οικονομική δυνατότητα που υπάρχει και μέσα στα χρονικά περιθώρια έκβασης της διπλωματικής εργασίας. Τα δείγματα θα είναι από κάθε περιοχή και θα επιλεγθούν από μαγαζιά με ζυγό νούμερο τηλεφώνου.

### **6.3. ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ**

Ταυτόχρονα με τα παραπάνω, γίνονταν η έρευνα για την εύρεση μεθοδολογίας για την εργαστηριακή απομόνωση του βακτηρίου της Λεγεωνέλλας. Με την βοήθεια του διαδικτύου, και μετά από βήματα που θα αναλυθούν, βρέθηκε η εργαστηριακή μεθοδολογία απομόνωσης *Legionella* spp από φυτόχωμα, η οποία τροποποιήθηκε και διαφοροποιήθηκε εν συνέχεια.

Με τους καταλόγους έτοιμους από το πού πρέπει να γίνουν οι αγορές φυτοχωμάτων αλλά και ποια φυτοχώματα πρέπει να ερευνηθούν και με την



μεθοδολογία απομόνωσης *Legionella* spp από φυτόχλωμα, ξεκινά το επόμενο στάδιο της έρευνας αυτής της διπλωματικής εργασίας που αφορά εργαστηριακό μέρος της.

Το επόμενο βήμα, που αφορά την έρευνα για το εργαστηριακό κομμάτι, είναι η αγορά των απαραίτητων θρεπτικών υλικών που χρειάζονται για τη διαδικασία της μεθοδολογίας απομόνωσης του βακτηρίου της Λεγεωνέλλας. Μετά από τις κατάλληλες προμήθειες η εργαστηριακή τεχνική αρχίζει.

#### **6.4. ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΣΜΟΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ**

Υπήρχαν αρκετά ζητήματα που έπρεπε να λυθούν κατά την διεξαγωγή των σταδίων έρευνας της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, από οικονομικά θέματα μέχρι την συμπλήρωση διάφορων καταλόγων (πχ. φυτοχωμάτων και φυτωρίων) που δεν υπήρχαν πουθενά,. Για το λόγο αυτό, παρακάτω, γίνεται ανάλυση σε κάθε ένα από αυτά τα προβλήματα, ώστε να είναι καλύτερη η κατανόησή τους.

##### **6.4.1. ΣΥΝΟΛΟ ΦΥΤΩΡΙΩΝ – ΑΝΘΟΠΩΛΕΙΩΝ – ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΩΝ**

Σε αυτό το κεφάλαιο, στο τμήμα 6.2.1. που αφορά την έρευνα εύρεσης δείγματος αναφέρονται εκτενώς τα προβλήματα που βγήκαν στην πορεία, σε σχέση με το σύνολο φυτωρίων, ανθοπωλείων και θερμοκηπίων στην Αττική.

##### **6.4.2. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Όπως και στην παραπάνω παράγραφο, έτσι και εδώ, τα προβλήματα που υπήρξαν για το σύνολο δειγμάτων μελέτης, αναφέρονται σε αυτό το κεφάλαιο, στο τμήμα 6.2.1. που αφορά την έρευνα εύρεσης.

#### **6.4.3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ *LEGIONELLA* SPP ΑΠΟ ΦΥΤΟΧΩΜΑ**

Ταυτόχρονα με την εύρεση των παραπάνω, γινόταν και έρευνα για την μεθοδολογία απομόνωσης της *Legionella* spp από φυτόχωμα. Καθώς δεν υπάρχει ελληνική βιβλιογραφία για το συγκεκριμένο θέμα, η προσπάθεια έγινε διαδικτυακά. Δεν βρισκόταν όμως τίποτα που να αφορούσε στο συγκεκριμένο θέμα. Έτσι ξεκίνησε μία έρευνα για το ποιος μπορεί να βοηθήσει πάνω στο συγκεκριμένο θέμα. Με τη χρήση ηλεκτρονικής αλληλογραφίας και μετά από αρκετό διάστημα βρέθηκε ο ερευνητής που εκτός από επικοινωνία σύστησε και άλλους κατάλληλους επιστήμονες.

Μετά από αυτές τις κινήσεις υπήρχε συνεργασία με σημαντικούς ερευνητές του κλάδου, οι οποίοι προσέφεραν την βοήθεια τους. Έτσι, τελικά, υποδείχθηκε σχετική μεθοδολογία, αλλά και υπήρξε η δυνατότητα για συνεχή επικοινωνία για οποιοδήποτε πρόβλημα πάνω στην τεχνική απομόνωσης που ήταν απαραίτητη για τη διεξαγωγή αυτής της διπλωματικής εργασίας.

#### **6.4.4. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ**

Μετά από την εύρεση της μεθοδολογίας, έπρεπε να γίνουν οι αγορές των υλικών για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών που ήταν απαραίτητα για την διεξαγωγή του εργαστηριακού μέρους της διπλωματικής εργασίας. Τα πρώτα προβλήματα αφορούσαν στο υλικό που ονομάζεται NATAMYCIN ή αλλιώς PIMARICIN, απαραίτητο για τη μη ανάπτυξη μυκήτων από το φυτόχωμα στα θρεπτικά υλικά ανάπτυξης *Legionella* spp. Η αγορά αυτού του προϊόντος εμποδίστηκε από τις απαγορευτικές τιμές του. Έγινε μία σειρά προσπαθειών για την εύρεση αξιόπιστου και οικονομικά πιο προσιτού ίδιου προϊόντος. Μετά από αρκετή

έρευνα και με συνεχή επικοινωνία με τους επιστήμονες από το εξωτερικό επετεύχθει η προμήθεια προϊόντος που περιείχε natamycin και μπορούσε να χρησιμοποιηθεί.

Το δεύτερο μεγάλο πρόβλημα σε θρεπτικό υλικό, εμφανίστηκε με την αγορά του MWY. Ένα συμπλήρωμα απαραίτητο, για τη Παρασκευή του θρεπτικού υλικού, του οποίου η αγορά είχε επίσης σημαντική οικονομική επιβάρυνση. Αυτό ήταν ένα δεύτερο σοβαρό οικονομικό πρόβλημα όπου σε συνδυασμό με το πρώτο έπρεπε ο εργαστηριακός έλεγχος σε αριθμό δειγμάτων να μειωθεί δραματικά. Ευτυχώς όμως που τα αποτελέσματα απέδωσαν σε είδος αν και όχι σε αριθμούς.

#### **6.4.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Με την πρώτη ματιά φάνηκε πόσο δύσκολο ήταν το θέμα αυτής της διπλωματικής εργασίας. Ελληνική βιβλιογραφία για το συγκεκριμένο θέμα δεν υπάρχει, μόνο γενικά για την *Legionella pneumophila* και τον Pontiac πυρετό που σχετίζεται με αυτήν. Η βοήθεια του διαδικτύου ήταν σημαντική για αυτό το εγχείρημα. Έγινε προσπάθεια και σε νοσοκομεία για την εύρεση στοιχείων ασθένειας από *Legionella longbeachae*, κάτι το οποίο αποδείχθηκε άκαρπο.

Λόγω όλων των παραπάνω χρειαζόταν μεγάλη προσπάθεια και πολλές ώρες έρευνας στο διαδίκτυο. Η κάθε πληροφορία ήταν απαραίτητη, καθώς δεν υπήρχε κάτι στον Ελληνικό χώρο που να μπορούσε να χρησιμοποιηθεί, για λεπτομέρειες που αφορούν τη μόλυνση από *Legionella* spp από φυτόχωμα, ούτε καν τρόποι προστασίας. Για το λόγο αυτό αυτή η διπλωματική εργασία στηρίχθηκε σε διαδικτυακές πληροφορίες, άρθρα, λεπτομέρειες, συνομιλίες και επικοινωνία με τους πιο ειδικούς επιστήμονες παγκοσμίως πάνω στο θέμα Λεγεωνέλλας (που αφορούσε και στην *Legionella longbeachae*).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ**

### **7.1. ΣΚΟΠΟΙ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ**

Σκοπός της εργαστηριακής τεχνικής είναι η χρήση μεθόδου που θα κάνει δυνατή την απομόνωση και την ανίχνευση βακτηρίων Λεγεωνέλλας από το χώμα. Η μέθοδος αυτή θα περιέχει και βήματα από την μέθοδο που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και την αρίθμηση της *L. pneumophila* σε νερό και σε άλλα περιβαλλοντικά δείγματα (πχ. ιζήματα, λάσπη, φυσικά νερά, νερό πόσιμο κλπ).

### **7.2. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ**

Τα μέτρα προφύλαξης είναι αυτά που λαμβάνονται συνήθως κατά την διάρκεια αναλύσεων. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται λευκές μπλούζες, γάντια και απλές μάσκες. Ιδιαίτερη προσοχή στις αυξημένες θερμοκρασίες (από τον κλίβανο αποστείρωσης, το ηλεκτρικό μάτι, τη λυχνία Bünsen και το υδατόλουτρο) χρησιμοποιούνται σε διάφορα στάδια της μεθόδου, τα οποία θα αναφερθούν παρακάτω.

### **7.3. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ**

Η διαδικασία δειγματοληψίας που αφορά στην απομόνωση *Legionella* spp από το νερό διαφέρει από την λήψη δειγμάτων φυτοχωμάτων. Το σημαντικό είναι η μεταφορά του φυτοχώματος όπως πουλιέται από το φυτώριο, ανθοπωλείο ή θερμοκήπιο στο μικροβιολογικό εργαστήριο. Σε περίπτωση όμως που θα έχει ενδιάμεση στάση και δεν θα μπορεί να μεταφερθεί όπως έχει, θα ακολουθηθεί μία διαδικασία που αναφέρεται σε αυτό το κεφάλαιο της εργαστηριακή τεχνική (7.9.1.).

Υπάρχουν περιπτώσεις δειγματοληψίας φυτοχώματος που χρησιμοποιούνται σε θερμοκήπια ή ακόμα και σε φυτώρια, τα οποία δεν είναι προϊόντα έτοιμα προς χρήση, άλλα προϊόντα τα οποία τα ετοιμάζουν ή και τα φτιάχνουν τελείως μόνοι τους ιδιοκτήτες φυτωρίων, ανθοπωλείων και θερμοκηπίων. Τότε θα πρέπει με ένα καθαρό και απολυμασμένο φτυαράκι να μπει ποσότητα δείγματος ίση με 1 κιλό σε αποστειρωμένη σακούλα κατευθείαν για τη μεταφορά του. Η ποσότητα αυτή εξασφαλίζει την ασφάλεια και για την περίπτωση που χρειαστεί να γίνει έλεγχος μεγαλύτερης ποσότητας, αλλιώς η συνιστώμενη ποσότητα είναι περίπου στα 500 γρ. Επίσης, το χώμα θα πρέπει να μην είναι μόνο από ένα σημείο αλλά από διάφορα, έτσι ώστε να είναι πιο αντικειμενική, αλλά και πιθανότερη η απομόνωση του βακτηρίου.

Συγκριτικά φαίνεται η ευκολία της δειγματοληψίας φυτοχώματος σε σχέση με το νερό για τον έλεγχο εύρεσης βακτηρίου Λεγεωνέλλας. Όμως και στα δύο συνιστάται προσοχή και λήψη των απαραίτητων μέτρων προστασίας.

Δεν ήταν εύκολο να εντοπιστούν και να συλλεγούν δείγματα από όλες τις κατηγορίες φυτοχωμάτων που κινούνται στον Νομό Αττικής. Με την βοήθεια του διαδικτύου, το ψάξιμο σε ανθοπωλεία, φυτώρια, θερμοκήπια σε όλο τον Νομό και κάποιων ελληνικών βιβλίων έγινε εφικτό να έχουμε στα χέρια μας έναν κατάλογο με τα φυτοχώματα αυτά ώστε να γίνει σωστά η στατιστική επιλογή των ανάλογων αυτιών χώρων από των οποίων θα μαζευτούν τα δείγματα για αυτήν την διπλωματική.

## 7.4. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ - ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (ΥΛΙΚΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ)

### 7.4.1. BUFFERED CHARCOAL YEAST EXTRACT AGAR MEDIUM (BCYE)

- ACES ρυθμιστικό διάλυμα
- Υδροξείδιο καλίου (KOH) 5,0 γρ
- Πυροφωσφορικός Σίδηρος[Fe<sub>4</sub>(P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)<sub>3</sub>] 125,0 γρ
- Κυστεΐνη HCl 200,0 γρ
- α - κετογλουταρικό 0,5 g

Το άγαρ αυτό έχει συγκεκριμένες οδηγίες από τον κατασκευαστή για την παρασκευή του, όπως όλα τα άγαρ <sup>(103)</sup>. [Βλέπε Παράρτημα 4.1. και 4.2.]

### 7.4.2. MODIFIED WADOSKY YEE AGAR (MWY)

Παρεχόμενο φιαλιδίων (κάθε φιαλίδιο είναι ικανοποιητικό για 100 ml του βασικού υλικού *Legionella* BCYE-A):

- Γλυκίνη 0,3 g
- Πολυμιξίνη B 5,000 IU
- Ανισομυκίνη 8mg
- Βανκομυκίνη 100 μg
- Μπλε Βρωμοθυμόλη 1mg
- Μοβ Βρωμοκρεσόλη 1mg

Το άγαρ αυτό έχει συγκεκριμένες οδηγίες από τον κατασκευαστή για την παρασκευή του, όπως όλα τα άγαρ <sup>(103)</sup>. [Βλέπε Παράρτημα 2.]

#### **7.4.3. BUFFERED CHARCOAL YEAST EXTRACT AGAR MEDIUM with selective supplements (GVPC)**

Είναι η ίδια διαδικασία παρασκευής με το BCYE. Η διαφορά είναι κάποια παραπάνω υλικά, 3 αντιβιοτικά και γλυκίνη. Στο υπόστρωμα η τελική συγκέντρωση , ανά λίτρο, είναι:

- Γλυκίνη 1,5 γρ
- Πολυμιξίνη Β 40000 IU
- Βανκομυκίνη HCl 0,5 mg
- Κυκλοεξιμίδιο 40,0 mg

Το άγαρ αυτό έχει συγκεκριμένες οδηγίες από τον κατασκευαστή για την παρασκευή του, όπως όλα τα άγαρ <sup>(103)</sup>. [Βλέπε Παράρτημα 3.1. και 3.2.]

#### **7.4.4. DILUTE RINGER'S SOLUTION**

Χρησιμοποιούνται ταμπλέτες διαλύματος Ringer's ¼ strength. Για να χρησιμοποιηθεί το διάλυμα, θα πρέπει να γίνει αραίωση σε αναλογία 1:10. Το τελικό διάλυμα θα πρέπει να είναι διάλυμα Ringer's 1:40. Το υλικό σύμφωνα με τις οδηγίες θα πρέπει να αποστειρωθεί στους 121 +/- 1 °C για 20+/-1 λεπτά.

#### **7.4.5. NATAMYKINΗ ή αλλιώς ΠΙΜΑΡΙΣΙΝΗ (natamycin ή pimaricin)**

Είναι ουσία αντιμυκητιστακή που βοηθά στο να μην αναπτυχθούν μύκητες από το χώμα πάνω στα θρεπτικά υλικά. Είναι βασικό συστατικό που χωρίς αυτό θα γινόταν αδύνατη η ανάπτυξη και η απομόνωση αποικιών Λεγεωνέλλας, καθώς οι μύκητες θα καταλάμβαναν τον χώρο στα τρυβλία. Διατίθεται από φαρμακευτικές

εταιρίες, αλλά και από εταιρίες με προϊόντα συντήρησης τροφίμων (κρέατος και κυρίως τυριού, με πρόσμιξη λακτόζης). [Βλέπε Παράρτημα 1.1., 1.2. και 1.3.]



*Εικ. 19. Τα τυριά είναι τα κυρίως προϊόντα που χρειάζονται για την συντήρηση τους ναταμυκίνη*

#### **7.5. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΡΙΚΟΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΕΠΙΣΤΡΩΣΗΣ ΤΡΥΒΛΙΩΝ**

Κατά τη διάρκεια της έρευνας έγινε και έλεγχος ποιότητας έτοιμων θρεπτικών υλικών που χρησιμοποιούνται και συγκεκριμένα του *Legionella* selective agar, αλλά και των κρίκων επιφανειακής επίστρωσης τρυβλίων. Στόχος είναι ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας αποστείρωσης αυτών των υλικών, αλλά και της στειρότητας των θρεπτικών υλικών, όπως επίσης της σωστής εργαστηριακής τεχνικής.

Για τον έλεγχο ποιότητας για την αποστείρωση των έτοιμων τρυβλίων με *Legionella* selective agar, χρησιμοποιήθηκαν 5 τρυβλία με έτοιμο θρεπτικό υλικό τα οποία τοποθετήθηκαν σε κλίβανο επώασης στους 37°C, για 10 ημέρες. Ο έλεγχος για τυχόν ανάπτυξη μυκήτων έγινε πρώτα μετά από 4 μέρες και στη συνέχεια ανά 1 έως 3 ημέρες. Με αυτόν τον τρόπο εξετάζετο όχι μόνο αν η αποστείρωση όπως έρχονται συσκευασμένα είναι σωστή και διαρκεί, αλλά και η καθαρότητα του κλιβάνου επώασης και οι τυχόν επιμολύνσεις που δύναται να κάνει. Επιπλέον, κάθε φορά



που ενοφθαλμιζόταν οποιοδήποτε θρεπτικό υλικό αντίστοιχο υλικό, χωρίς ενοφθαλμισμό, επωάζετο μαζί με τα εμβολιασμένα θρεπτικά υλικά για τον έλεγχο στεριότητας, αλλά και των διαδικασιών καλής εργαστηριακής πρακτικής.

Ενδεικτικά παραθέτουμε παρακάτω πίνακες με τέτοιου είδους ελέγχους.

<b>ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗΣ ΕΤΟΙΜΩΝ ΤΡΥΒΛΙΩΝ ΜΕ <i>Legionella selective agar</i></b>						
No τρυβλίου	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΕΣ					
	25/07/08	28/07/08	30/07/08	01/08/08	04/08/08	05/08/08
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Έλεγχος ποιότητας αποστείρωσης έτοιμων θρεπτικών υλικών

⊕: Θετικό / ⊖: Αρνητικό για την ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων στο θρεπτικό υλικό

Από τα αποτελέσματα του ελέγχου ποιότητας, φαίνεται πως δεν υπήρξε ανάπτυξη βακτηρίων ή μυκήτων στα έτοιμα αποστειρωμένα τρυβλία με *Legionella selective agar* και πως ο κλίβανος επώασεως δεν επιμόλυνε τις καλλιέργειες.

Αντίστοιχα, έγινε και ποιοτικός έλεγχος των κρίκων επιφανειακής επίστρωσης τρυβλίων και του απιονισμένου-αποστειρωμένου νερού (Υ.Α.Α.= Ύδωρ απιονισμένο και αποστειρωμένο) που χρησιμοποιείται για τη μέθοδο αυτής της εργασίας. Ο τρόπος αυτού του ελέγχου ήταν ο ίδιος με τον παραπάνω, μόνο που στα 5 έτοιμα τρυβλία με *Legionella selective agar* επιστρώθηκε Υ.Α.Α. με τη χρήση κρίκων επιφανειακής επίστρωσης τρυβλίων και σε περιβάλλον προσομοίωσης εργασίας.

Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε κλίβανο επώασης στους 37°C, για 10 ημέρες. Ο έλεγχος για τυχόν ανάπτυξη βακτηρίων ή μυκήτων έγινε πρώτα μετά από 4 μέρες και στη συνέχεια ανά 1 έως 3 ημέρες. Με αυτόν τον τρόπο ελέγχεται και η ποιότητα αποστείρωσης των κρίκων επιφανειακής επίστρωσης τρυβλίων αλλά και του Υ.Α.Α.

<b>ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗΣ ΕΤΟΙΜΩΝ ΤΡΥΒΛΙΩΝ ΜΕ <i>Legionella selective agar</i> με επίστρωση Υ.Α.Α. με τη χρήση κρίκων επιφανειακής επίστρωσης τρυβλίων</b>						
No τρυβλίου	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΕΣ					
	25/07/08	28/07/08	30/07/08	01/08/08	04/08/08	05/08/08
1	-	-	-	+	++	+++
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 7. Έλεγχος ποιότητας αποστείρωσης έτοιμων θρεπτικών υλικών και κρίκων επιφανειακής επίστρωσης τρυβλίων

+: Θετικό / -: Αρνητικό για την ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων στο θρεπτικό υλικό

+: 1 αποικία μύκητα 1,5 εκατοστό

++ : αύξηση μεγέθους μύκητα στα 3,5 εκατοστά

+++ : αύξηση μεγέθους μύκητα στα 4,5 εκατοστά

Καθώς στην προηγούμενη ποιότητα ελέγχου τα έτοιμα τρυβλία με *Legionella selective agar* βγήκαν καθαρά τα αποτελέσματα και εφόσον μόνο σε ένα τρυβλίο υπήρχε πρόβλημα, φαίνεται πως πιθανόν αυτό οφείλετο στο περιβάλλον στο οποίο έγινε η επίστρωση με Υ.Α.Α. Άρα, θα πρέπει όλες οι διαδικασίες να γίνονται με μεγάλη προσοχή και κοντά στη λυχνία Bünsen.

Επίσης γινόταν ενοφθαλμισμός τρυβλίων με στελέχη 3 κατηγοριών Λεγεωνέλλας, *Legionella pneumophila* οροομάδων 1 και 2-15 και *Legionella Group 3*

(*Legionella longbeachae* οροομάδες 1 και 2, *Legionella bozemanii* οροομάδες 1 και 2, *Legionella dumoffii*, *Legionella gormanii*, *Legionella jordanis*, *Legionella micdadei*, *Legionella anisa*) για τον έλεγχο ποιότητα της καλής ανάπτυξης πρωτύπων στελεχών (βλέπε 7.9.5. την 1<sup>η</sup> τροποποίηση).

## **7.6. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ**

Η προετοιμασία των φυτοχωμάτων έχει αναφερθεί παραπάνω, δηλαδή ο τρόπος επεξεργασίας για τη μεταφορά τους. Η προετοιμασία για την επεξεργασία και την καλλιέργεια τους θα αναφερθεί στον υπότιτλο «ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ».

Πέραν του απαραίτητου εργαστηριακού εξοπλισμού που προϋποτίθεται να υπάρχει, πρέπει να έχουν προπαρασκευαστεί και τα ακόλουθα :

- Θρεπτικά υλικά
- Διάλυμα Ringer's
- Αποστειρωμένο, απιονισμένο νερό
- HCl-KCl

Για την αρχική επεξεργασία του μείγματος των φυτοχωμάτων, χρησιμοποιήθηκαν μπουκάλια νερών, αναψυκτικών και χυμών, συσκευασίας 500ml. Αυτά όμως για να χρησιμοποιηθούν πρέπει να καθαριστούν, να απολυμανθούν. Παράλληλα εκτός από αυτές τις διαδικασίες έγιναν και έλεγχοι αποτελεσματικότητας εξυγίανσης τους σε διάφορα στάδια της έρευνας για να είναι γνωστό κατά πόσο οι διαδικασίες αυτές είναι αποτελεσματικές.

### **7.6.1. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το βακτήριο της *Legionella* spp είναι Gram (-). Έχει την ικανότητα ανάπτυξης σε θρεπτικό υλικό που έχει σαν βάση Buffered Charcoal Yeast Extract ( BCYE ). Σε αυτό το θρεπτικό υλικό μπορούν να προστεθούν και άλλα εμπλουτιστικά υλικά που βοηθούν την ανάπτυξη του βακτηρίου, στην περίπτωση απομόνωσης του βακτηρίου αυτού από φυτόχλωμα..

Τα θρεπτικά υλικά που θα χρησιμοποιηθούν έτοιμα είναι:

- *Legionella* selective agar
- *Legionella* agar

Τα θρεπτικά υλικά που παρασκευάζονται:

- BCYE (με rimaricin και MWY)
- GVPC (με rimaricin)
- Yeast extra agar (Για τον έλεγχο αποτελεσματικότητας εξυγίανσης των μπουκαλιών που χρησιμοποιούνται για την τοποθέτηση των μειγμάτων φυτοχλωμάτων για να γίνει η επεξεργασία πριν την καλλιέργειά τους)
- Nutrient agar (Για επιβεβαίωση ύπαρξης αποικιών Λεγεωνέλλας στις καλλιέργειες)

#### **A. BCYE**

Το BCYE μαζί με rimaricin και MWY είναι ένα από τα θρεπτικά υλικά με τα οποία γίνεται η καλλιέργεια των δειγμάτων μετά την επεξεργασία τους. Τα βήματα για την παρασκευή του είναι τα εξής:

##### **1° Βήμα**

Με τη βοήθεια ογκομετρικού σωλήνα τοποθετούνται 900ml απιονισμένο νερό και ένας μαγνήτης, σε ένα ογκομετρικό μεγάλο δοχείο.

## **2° Βήμα**

Με τη χρήση μιας σπάτουλας, ενός κομματιού λαδόκολλας και ζυγού ακριβείας για μέτρηση υλικού, μετρούνται 25γρ από Agar Base *Legionella* (το κομμάτι λαδόκολλας τοποθετείται πάνω στο ζυγό ακριβείας και στη συνέχεια ο ζυγός μηδενίζεται αμέσως μετά τη χρήση σπάτουλας λαμβάνεται η ποσότητα του υλικού και ζυγίζεται). Κατόπιν το ζυγισμένο υλικό αδειάζεται στο παραπάνω ογκομετρικό δοχείο.

## **3° Βήμα**

Γίνεται ακριβώς ό,τι και στο δεύτερο βήμα, μόνο που αυτή τη φορά το υλικό είναι το rimaricin και η ποσότητα που χρησιμοποιείται είναι 1-1,25γρ.

## **4° Βήμα**

Τοποθετείται αλουμινόχαρτο πάνω στο στόμιο του ογκομετρικού δοχείου πριν ανάψει η ηλεκτρική θερμική πλάκα με μαγνητικό αναδευτήρα. Το ογκομετρικό δοχείο στη συνέχεια με τη βοήθεια της ηλεκτρικής θερμικής πλάκας φτάνει σε τέτοια θερμοκρασία μέχρι να φουσκώσει το υλικό, οπότε και απομακρύνεται. Κατά τη θέρμανση του υλικού μέσω του μαγνητικού αναδευτήρα θα πρέπει να αναδεύεται με μέτρια ταχύτητα.

## **5° Βήμα**

Μόλις το θρεπτικό υλικό φουσκώσει και κατέβει από την ηλεκτρική θερμική πλάκα με μαγνητικό αναδευτήρα, θέλει καλό χειροκίνητο ανακάτεμα και στη συνέχεια μπαίνει σε υγρό κλίβανο για αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά. Το αλουμινόχαρτο είναι καλό να ανασηκωθεί λίγο και το ογκομετρικό δοχείο να μπει σε κάποιο ταψί έτσι, ώστε αν φουσκώσει πολύ να μην χυθεί μέσα στον κλίβανο και τον λερώσει.

## 6° Βήμα

Αφού το υλικό έχει βγει και έχει κρυώσει (να έχει φτάσει περίπου στους 50°C), θα πρέπει να μπουν τα συμπληρώματα ώστε να είναι ολοκληρωμένο. Τα συμπληρώματα αυτά για αυτό το θρεπτικό υλικό, για την συγκεκριμένη έρευνα ήταν το *Legionella* BCYE α-growth supplement και το *Legionella* MWY selective supplement, τα οποία θα συμπληρωθούν σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχει ο κατασκευαστής. [Βλέπε Παράρτημα 2, 4.1. και 4.2.]

## 7° Βήμα

Σε στείρες συνθήκες το έτοιμο, ολοκληρωμένο πια θρεπτικό υλικό μοιράζεται σε τρυβλία με προσοχή (γίνεται επίφλεξη στην επιφάνεια των τριβλύων για να μην υπάρχουν φουσκάλες που δεν ευνοούν τη σωστή επίστρωση του επεξεργασμένου δείγματος). Στη συνέχεια αποθηκεύεται σε ψυγείο, και σε θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός ενός μηνός<sup>(103)</sup>.

**Προσοχή!** Να γίνεται αναγραφή σε κάθε τρυβλίο το υλικό που περιέχει και την ημερομηνία παραγωγής του.

## **B. GVPC**

Το GVPC μαζί με rimaricin είναι το δεύτερο από τα θρεπτικά υλικά πάνω στα οποία γίνεται η καλλιέργεια των δειγμάτων μετά την επεξεργασία τους. Τα βήματα για την δημιουργία του είναι τα ίδια με το BCYE εκτός από το 6° όπου είναι το εξής:

## 6° Βήμα

Αφού πια το υλικό έχει βγει και έχει κρυώσει (να έχει φτάσει περίπου στους 50°C), θα πρέπει να μπουν τα συμπληρώματα ώστε να ολοκληρωθεί το υλικό. Τα

συμπληρώματα για αυτό το θρεπτικό υλικό, για τη συγκεκριμένη έρευνα ήταν το *Legionella* BCYE α-growth supplement (όπως και στο BCYE) και το *Legionella* GVPC selective supplement, τα οποία προστίθενται σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχει ο κατασκευαστής <sup>(103)</sup>. [Βλέπε Παράρτημα 3.1, 3.2., 4.1. και 4.2.]

### **Γ. Yeast extra agar**

Το Yeast extra agar είναι ένα από τα θρεπτικά υλικά με τα οποία γίνεται η αποτελεσματικότητα εξυγίανσης των μπουκαλιών. Τα βήματα για την παρασκευή του είναι τα εξής:

#### **1<sup>ο</sup> Βήμα**

Με τη βοήθεια ογκομετρικού σωλήνα τοποθετείται 1 Lt απιονισμένο νερό και ένας μαγνήτης, σε ένα ογκομετρικό μεγάλο δοχείο.

#### **2<sup>ο</sup> Βήμα**

Με τη χρήση μιας σπάτουλας, ενός κομματιού λαδόκολλας και ζυγού ακριβείας για μέτρηση υλικού, μετρούνται 23γρ από Yeast Extract Agar, στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε της εταιρίας LAB M™ (το κομμάτι λαδόκολλας τοποθετείται πάνω στο ζυγό ακριβείας και στη συνέχεια ο ζυγός μηδενίζεται αμέσως μετά τη χρήση σπάτουλας λαμβάνεται η ποσότητα του υλικού και ζυγίζεται). Κατόπιν το ζυγισμένο υλικό αδειάζεται στο παραπάνω ογκομετρικό δοχείο.

#### **3<sup>ο</sup> Βήμα**

Τοποθετείται αλουμινόχαρτο πάνω στο στόμιο του ογκομετρικού δοχείου πριν ανάψει η ηλεκτρική θερμική πλάκα με μαγνητικό αναδευτήρα. Το ογκομετρικό δοχείο στη συνέχεια με τη βοήθεια της ηλεκτρικής θερμικής πλάκας φτάνει σε τέτοια θερμοκρασία μέχρι διαλυθεί η σκόνη, οπότε και απομακρύνεται. Κατά τη θέρμανση

του υλικού μέσω του μαγνητικού αναδευτήρα θα πρέπει να αναδεύεται με μέτρια ταχύτητα.

#### **4° Βήμα**

Μόλις το θρεπτικό υλικό είναι έτοιμο και κατέβει από την ηλεκτρική θερμική πλάκα με μαγνητικό αναδευτήρα, θέλει καλό χειροκίνητο ανακάτεμα και στη συνέχεια μπαίνει σε υγρό κλίβανο για αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά. Το αλουμινόχαρτο είναι καλό να ανασηκωθεί λίγο και το ογκομετρικό δοχείο να μπει σε κάποιο ταψί έτσι, ώστε αν φουσκώσει πολύ να μην χυθεί μέσα στον κλίβανο και τον λερώσει.

#### **5° Βήμα**

Αφού το υλικό έχει βγει και έχει κρυώσει (να έχει φτάσει περίπου στους 47 - 50°C), θα πρέπει να τοποθετηθεί μέσα σε απολυμασμένα βιδωτά φιαλίδια και εφόσον πήξει είναι έτοιμο για αποθήκευση και μελλοντική χρήση.

### **Δ. Nutrient agar**

Το Nutrient agar είναι ένα από τα θρεπτικά υλικά με τα οποία γίνεται η αποτελεσματικότητα εξυγίανσης των μπουκαλιών. Τα βήματα για την παρασκευή του είναι τα εξής:

#### **1° Βήμα**

Με τη βοήθεια ογκομετρικού σωλήνα τοποθετείται 1 Lt απιονισμένο νερό και ένας μαγνήτης, σε ένα ογκομετρικό μεγάλο δοχείο.

#### **2° Βήμα**

Με τη χρήση μιας σπάτουλας, ενός κομματιού λαδόκολλας και ζυγού ακριβείας για μέτρηση υλικού, μετρούνται 28γρ από Yeast Extract Agar, στη συγκεκριμένη



περίπτωση χρησιμοποιήθηκε της εταιρίας LAB M™ (το κομμάτι λαδόκολλας τοποθετείται πάνω στο ζυγό ακριβείας και στη συνέχεια ο ζυγός μηδενίζεται αμέσως μετά τη χρήση σπάτουλας λαμβάνεται η ποσότητα του υλικού και ζυγίζεται). Κατόπιν το ζυγισμένο υλικό αδειάζεται στο παραπάνω ογκομετρικό δοχείο.

### **3° Βήμα**

Τοποθετείται αλουμινόχαρτο πάνω στο στόμιο του ογκομετρικού δοχείου πριν ανάψει η ηλεκτρική θερμική πλάκα με μαγνητικό αναδευτήρα. Το ογκομετρικό δοχείο στη συνέχεια με τη βοήθεια της ηλεκτρικής θερμικής πλάκας φτάνει σε τέτοια θερμοκρασία μέχρι διαλυθεί η σκόνη, οπότε και απομακρύνεται. Κατά τη θέρμανση του υλικού μέσω του μαγνητικού αναδευτήρα θα πρέπει να αναδεύεται με μέτρια ταχύτητα.

### **4° Βήμα**

Μόλις το θρεπτικό υλικό είναι έτοιμο και κατέβει από την ηλεκτρική θερμική πλάκα με μαγνητικό αναδευτήρα, θέλει καλό χειροκίνητο ανακάτεμα και στη συνέχεια μπαίνει σε υγρό κλίβανο για αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά. Το αλουμινόχαρτο είναι καλό να ανασηκωθεί λίγο και το ογκομετρικό δοχείο να μπει σε κάποιο ταψί έτσι, ώστε αν φουσκώσει πολύ να μην χυθεί μέσα στον κλίβανο και τον λερώσει.

### **5° Βήμα**

Αφού το υλικό έχει βγει και έχει κρυώσει (να έχει φτάσει περίπου στους 47 - 50°C), θα πρέπει να μοιραστεί σε αποστειρωμένα τρυβλία. Όταν το υλικό στα τρυβλία πήξει αποθηκεύεται σε ψυγείο και είναι έτοιμο για μελλοντική χρήση.

### 7.6.2. ΔΙΑΛΥΜΑ RINGER'S (1/4)

Το διάλυμα Ringer's solution χρησιμοποιείται για την επεξεργασία ενός μέρους των δειγμάτων πριν την καλλιέργειά τους. Είναι σε ταμπλέτες (MERCK, Γερμανικό προϊόν, η συντήρησή τους γίνεται σε ψυγείο) και για να είναι έτοιμο προς χρήση γίνονται τα εξής βήματα:

#### 1<sup>ο</sup> Βήμα

Με τη βοήθεια ενός μεγάλου ογκομετρικού σωλήνα μετρούνται 500ml απιονισμένο νερό και τοποθετούνται σε έναν ογκομετρικό δοχείο μαζί με μία ταμπλέτα διαλύματος Ringer's και έναν ειδικό μαγνήτη.

#### 2<sup>ο</sup> Βήμα

Το ογκομετρικό δοχείο με το μείγμα τοποθετείται πάνω σε ειδική ηλεκτρική θερμική πλάκα με μαγνητικό αναδευτήρα και επιλέγονται μετρίου βαθμού θερμοκρασία και ταχύτητα ανάδευσης.

Σε τρία λεπτά περίπου η ταμπλέτα διαλύεται.

#### 3<sup>ο</sup> Βήμα

Μόλις διαλυθεί η ταμπλέτα, από τα 500ml γίνεται αραιώση των 100ml 1:10 (100ml μείγματος και 900ml απιονισμένο νερό). Συνολικά μπορούν από αυτά τα 500ml να γίνουν 5000ml διάλυμα Ringer's. Πρέπει να γίνεται καλή ανάδευση.

#### 4<sup>ο</sup> Βήμα

Οι έτοιμες αραιώσεις μπαίνουν σε ογκομετρικά ειδικά φιαλίδια που κλείνουν βιδωτά. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε υγρό κλίβανο για αποστείρωση στους 121 °C για 15 λεπτά.

## 5<sup>ο</sup> Βήμα

Μόλις βγουν από τον κλίβανο και κρυώσουν τα φιαλίδια, διατηρούνται σε ψυγείο.

**Προσοχή!** Να αναγράφεται η ημερομηνία παραγωγής του επάνω στα φιαλίδια.

### 7.6.3. ΥΔΩΡ ΑΠΙΟΝΙΣΜΕΝΟ – ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ (ΥΑΑ)

Το Υ.Α.Α. χρησιμοποιείται για:

- την επεξεργασία ενός μέρους των δειγμάτων πριν την καλλιέργειά τους
- την αραίωση των επεξεργασμένων δειγμάτων
- την τελική έκπλυση των μπουκαλιών κατά τη διαδικασία εξυγίανσής τους
- την παρασκευή των θρεπτικών υλικών
- την παρασκευή του διαλύματος Ringer's

Το απιονισμένο νερό τοποθετείται σε ειδικές ογκομετρικές φιάλες που βιδώνουν και αποστειρώνεται σε υγρό κλίβανο στους 121 °C για 15 λεπτά. Μόλις ολοκληρωθεί η αποστείρωσή τους, οι ογκομετρικές φιάλες, διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου.

### 7.6.4. ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ HCl-KCl (0,2M)

Το ρυθμιστικό διάλυμα HCl – KCl πρέπει να είναι σε pH 2,2 και 0,2M. Για το σκοπό αυτό χρειάζεται 3,9ml 0.2M HCl και 25ml 0.2M KCl. Το pH 2.2 ρυθμίζεται με την προσθήκη 1M KOH <sup>(103)</sup>.

## 7.6.5. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΜΠΟΥΚΑΛΙΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

### ΕΞΥΓΙΑΝΣΗ

Τα μπουκάλια πρέπει να καθαριστούν πολύ καλά με σαπούνι και νερό και ξεπλένονται με άφθονο νερό. Η τελική έκπλυση γίνεται με Υ.Α.Α. . Μόλις στεγνώσουν, εισάγεται καθαρό οινόπνευμα στο κάθε μπουκάλι και ανακινείται αρκετά καλά ώσπου να πάει παντού το οινόπνευμα. Μόλις το οινόπνευμα εξατμιστεί, τα μπουκάλια ανοιχτά τοποθετούνται σε κλίβανο για εξυγίανση στους 37 °C για τουλάχιστον 3 ημέρες. Με την ίδια διαδικασία γινόταν και η εξυγίανση των βιδωτών πωμάτων.

Στη συνέχεια, μετά το τριήμερο, αφού βιδωθούν σφιχτά και προσεχτικά τα μπουκάλια, αποθηκεύονται σε κατάλληλο χώρο.

### ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΞΥΓΙΑΝΣΗΣ

Για να γίνει έλεγχος της αποτελεσματικότητας της εξυγίανσης αυτών των μπουκαλιών ακολουθείται η εξής διαδικασία:

#### 1<sup>ο</sup> Βήμα

Χρησιμοποιείται έτοιμο yeast extra agar που είναι σε φιαλίδια και έχει ήδη αποστειρωθεί. Τοποθετούνται σε μεγάλο δοχείο, όπως μία κατσαρόλα, και προστίθεται νερό, το οποίο στο ύψος θα φτάνει κάτω από τα πώματα των μπουκαλιών. Τα πώματα δεν πρέπει να είναι τελείως κλειστά. Βράζουμε το νερό βάζοντας το δοχείο σε ηλεκτρική εστία και τα φιαλίδια ανακινούνται συνεχώς μέχρι να λιώσει τελείως το υλικό.

**Προσοχή!** Η ποσότητα του yeast extra agar που θα χρησιμοποιηθεί, θα είναι τόσο όσο χρειάζεται για να γεμίσει δύο τρυβλία για το κάθε μπουκάλι (πχ. για τον έλεγχο ενός μπουκαλιού χρειάζεται ποσότητα yeast extra agar όση χωράει σε δύο τρυβλία).

### 2<sup>ο</sup> Βήμα

Σε κάθε μπουκάλι που ελέγχεται τοποθετείται η αντίστοιχη ποσότητα yeast extra agar, όση χωρά σε 2 τρυβλία και γίνεται αρκετά καλή ανακίνηση. Αυτό γίνεται για να ελεγχθεί ολόκληρο το μπουκάλι, κάθε πτυχή του, ακόμα και το πώμα.

### 3<sup>ο</sup> Βήμα

Το yeast extra agar από κάθε μπουκάλι χωρίζεται σε δύο αποστειρωμένα τρυβλία (τα οποία και θα σημανθούν κατάλληλα και με την ημερομηνία). Τα τρυβλία αυτά θα μπουν σε επωαστικούς κλίβανους, αφού έχει κρυώσει και έχει πήξει το υλικό. Από το κάθε μπουκάλι, το ένα τρυβλίο επωάζεται στους 37°C για 48 ώρες και το άλλο στους 22°C για 72 ώρες, για μεσόφιλα και ψυχρόφιλα βακτήρια αντίστοιχα.

**Προσοχή!** Τα τρυβλία στους επωαστικούς κλίβανους τοποθετούνται με το υλικό προς τα πάνω.

## **7.7. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ - ΥΛΙΚΑ**

Χρησιμοποιείται ο συνήθης εξοπλισμός των εργαστηρίων:

- Μέτρα ατομικής προστασίας:
  - Ποδιά
  - Γάντια
  - Μάσκα

(είναι απαραίτητο τα μαλλιά να είναι μαζεμένα και για λόγους ασφάλειας, αλλά και για να μη μολυνθούν οι καλλιέργειες)

- Υγρός κλίβανος (υψηλή αποστείρωση στους 121 °C για δεκαπέντε λεπτά)

- Επωαστικός κλίβανος στους 37 °C
- Επωαστικός κλίβανος στους 44 °C, για την μέθοδο εξυγίανσης μπουκαλιών
- Επωαστικός κλίβανος στους 37 °C και στους 22 °C, για τον έλεγχο εξυγίανσης μπουκαλιών
- Μικροσκόπιο
- Υδατόλουτρο στους 50 °C
- Ζυγός ακριβείας
- Ψυγείο
- Ηλεκτρικό μάτι με μαγνητισμό
- Votrex
- Μαγνήτες (για ταυτόχρονο ζέσταμα και ανακάτεμα)
- Ογκομετρικοί σωλήνες διαφόρων χωρητικότητων και σχημάτων
- Πιπέτες και ειδικά ρύγχη (tips)
- Λύχνος Bünsen
- Στυλεοί
- Τρυβλία
- Μπουκάλια ή βάζα, τα οποία τα αποστειρώνουμε
- Sterilin των 25 ml (ειδικά φιαλίδια μικρής χωρητικότητας)
- Στατώ για να στέκονται όρθια τα sterilin
- Ειδικά ξύλινα ή μεταλλικά πεπλατυσμένα μαχαίρια μεταφοράς υλικών που είναι σε μορφή σκόνης
- Λαδόκολλα
- Αλουμινόχαρτο
- Χρονόμετρο
- Μαρκάδοροι διαρκείας, κυρίως σε ασημένιο χρώμα
- Οινόπνευμα, καθαρό

- Σαπούνι
- Απιονισμένο – αποστειρωμένο και απλό νερό
- Διάλυμα Ringer's (εάν υπάρχουν ταμπλέτες Ringer's, μπορεί να φτιαχτεί)
- Ρυθμιστικό διάλυμα HCl-KCl (0,2M – pH 2.2)
- *Legionella* BCYE agar
- Pimaricin
- *Legionella* BCYE α-Growth supplement
- *Legionella* MWY selective supplement
- *Legionella* GVPC selective supplement
- Yeast extra agar
- Nutrient agar
- *Legionella* agar (έτοιμο προς χρήση)
- *Legionella* selective agar (έτοιμο προς χρήση)
- Brain Heart Infusion Broth
- 20% γλυκερόλη
- Αντιδραστήρια εμπορίου κροκίδωσης, το λεγόμενο Latex (με υλικά ανίχνευσης *Lp1*, *Lp2-15* και *L Group3*)
- κλπ

#### **7.8. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**

Θα πρέπει να γίνει επεξεργασία πρώτα των δειγμάτων ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για καλλιέργεια πάνω σε συγκεκριμένα θρεπτικά υλικά (BCYE+MWY+rimaricin και GVPC+rimaricin). Σε περίπτωση που υπάρχουν ύποπτες αποικίες μετά το πέρας 4 ημερών από την καλλιέργεια, ένα τμήμα τους θα ενοφθαλμισθεί σε Nutrient agar. Εάν τα αποτελέσματα είναι θετικά για Λεγεωνέλλα (όχι ανάπτυξη σε Nutrient agar) γίνεται επιβεβαίωση με τα αντιδραστήρια εμπορίου

κροκίδωσης, ειδικά για οροομάδες και διάφορα είδη Λεγεωνέλλας, αφού έχει γίνει εμβολιασμός των αποικιών σε BCYE. Στη συνέχεια μπορούμε, να πάρουμε μέρος από τις επιβεβαιωμένες για Λεγεωνέλλα αποικίες να το καταψύξουμε στους -80°C.

## **7.9. ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η εύρεση της μεθόδου για την απομόνωση *Legionella* spp από το χώμα είναι δυσχερής. Μετά από μακρόχρονη και συστηματική προσπάθεια στάθηκε δυνατή η επικοινωνία με τους κυριότερους ερευνητές με εμπειρία στο θέμα (Michio Koide, Paul H. Edelstein και Martha A. C. Edelstein).

Η μέθοδος περιλαμβάνει την άμεση απομόνωση *Legionella* spp από φυτόχωμα αλλά μετά από εμπλουτισμό. Για λόγους που σχετίζονται με τα χρονικά περιθώρια για την ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας εδώ θα χρησιμοποιηθεί μόνο η άμεση απομόνωση. Τα βήματα και στις δύο μεθόδους είναι ακριβώς τα ίδια. Η μόνη διαφορά είναι πως για την μέθοδο εμπλουτισμού υπάρχει ένα επιπλέον στάδιο το οποίο θα αναφερθεί παρακάτω <sup>(104)</sup>.

### **7.9.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**

Μετά από στατιστική επιλογή στο από πού θα αγοραστούν τα φυτοχώματα, θα χρειαστεί μία επεξεργασία για τη μεταφορά τους στο μικροβιολογικό εργαστήριο, καθώς ο όγκος τους δυσκολεύει την μεταφορά τους και την αποθήκευσή τους στο εργαστήριο, δεδομένου ότι μόνο τα 500 γρ. χρειάζονται για τη δοκιμή.

Όσα θα χρειαστούν για την επεξεργασία των δειγμάτων για τη μεταφορά τους είναι τα εξής:



- Αποστειρωμένες σακούλες, τις οποίες έχει προμηθευτεί το εργαστήριο
- Μεταλλικό φτυαράκι κήπου (χωρίς χρώμα, για να ,η γίνετε επιμόλυνση στα δείγματα από τρίμματα μπογιάς)
- Γκαζάκι
- Ζυγός ακριβείας, πχ. τροφίμων σε αυτήν την περίπτωση
- Καθαρό οινόπνευμα
- Νερό και σαπούνι

Από κάθε φυτόχωμα η ποσότητα που μεταφέρεται όπως αναφέρθηκε είναι 500 γρ. Με τη βοήθεια από το φτυαράκι θα μεταφερθεί η επιθυμητή ποσότητα στις αποστειρωμένες σακούλες. Αυτό που πρέπει να επισημανθεί είναι πως ανάμεσα σε κάθε αλλαγή φυτοχώματος και την πρώτη φορά το φτυαράκι θα πρέπει να πλένεται καλά με νερό και σαπούνι και να απολυμαίνεται με οινόπνευμα και τη φλόγα από το γκαζάκι. Έτσι, δε γίνεται επιμόλυνση στο φυτόχωμα, αλλά και μεταφορά διαφόρων συστατικών από το ένα φυτόχωμα στο άλλο. Κατά τη διάρκεια επεξεργασίας των δειγμάτων, για τη μεταφορά τους, το γκαζάκι παραμένει αναμμένο ώστε το περιβάλλον εργασίας να είναι προστατευμένο. Το φυτόχωμα ζυγίζεται και θα σφραγίζεται. Δε θα πρέπει να παραλείπεται η αναγραφή η σήμανση του δείγματος ώστε να αποφευχθούν τυχόν λάθη. Παράλληλα καταρτίζεται κατάλογος που αναφέρει λεπτομέρειες για το κάθε δείγμα.

Στη συνέχεια μεταφέρονται τα δείγματα στο μικροβιολογικό εργαστήριο για την επεξεργασία τους. Από αυτά θα χειριστούμε περίπου 200 gr (100 γρ για την άμεση μέθοδο, και 100 γρ ανάλογα με τις τεχνητές μεθόδους μόλυνσης για συγκρίσεις).

### **7.9.2. ΒΑΣΙΚΑ ΒΗΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ**

Για την υιοθέτηση της τελικής μεθοδολογίας έγιναν δοκιμές αλλάζοντας τις αραιώσεις και ταυτόχρονα τεχνητές μολύνσεις δεδομένου ότι δεν υπήρχε κανένας άλλος τρόπος για να γίνουν συγκρίσεις.

Από κάθε δείγμα χώματος, κάτω από άσηπτες συνθήκες, λαμβάνονταν 50 γρ. χώματος τα οποία ετίθετο σε άσηπτο περιέκτη με 200 ml Υ.Α.Α., στη συνέχεια άλλα 50 γρ. ετίθετο σε άλλο άσηπτο περιέκτη που περιείχε 200 ml διαλύματος Ringer. Κατόπιν γινόταν ανάδευση των περιεκτών για 2 λεπτά και αφήνονται να ηρεμήσουν για τριάντα λεπτά. Τα βήματα που θα πρέπει να γίνουν και για τα δύο υποδείγματα, είναι τα εξής <sup>(103)</sup>:

1. Λαμβάνονται 2ml και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 50 °C για μισή ώρα
    - α. Από τα 2ml χρειάζεται το 1ml
    - β. Από το 1ml γίνονται αραιώσεις 1:10, 1:100 και 1:1000
    - γ. Από κάθε αραιώση χρησιμοποιείται το 1ml
    - δ. Από το κάθε 1ml παίρνονται 2 διαφορετικά 0,1ml
      - Το ένα 0,1ml χρησιμοποιείται για επώαση σε BCYE άγαρ με MWY και rimaricin
      - Το άλλο 0,1ml χρησιμοποιείται για επώαση σε GVPC άγαρ με rimaricin
- (104)

**ΠΡΟΣΟΧΗ!** Η επώαση γίνεται στους 37 °C για 4 ημέρες και ο έλεγχος διαρκεί τουλάχιστον 10 ημέρες.

2. Λαμβάνονται 2ml, στα οποία προστίθενται 2ml 0,2M HCL-KCl .  
Αναμειγνύονται και αφήνονται ένα τέταρτο σε ηρεμία.

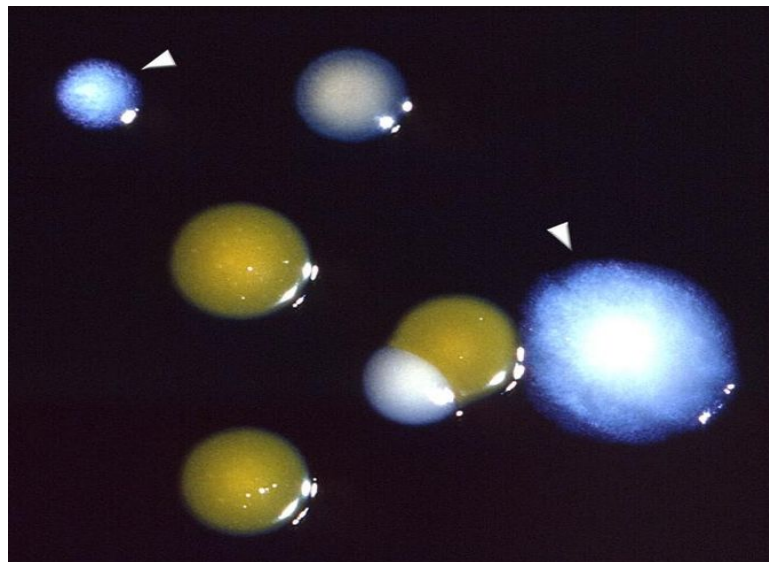
α. Από το παραπάνω μείγμα γίνονται αραιώσεις 1:10, 1:100 και 1:1000. Από κάθε αραιώση χρησιμοποιείται 1ml. Για κάθε νέο μείγμα μετά τη μίξη δεν χρειάζεται επιπλέον ηρεμία.

β. Από κάθε μείγμα λαμβάνονται 2 διαφορετικά 0,2ml

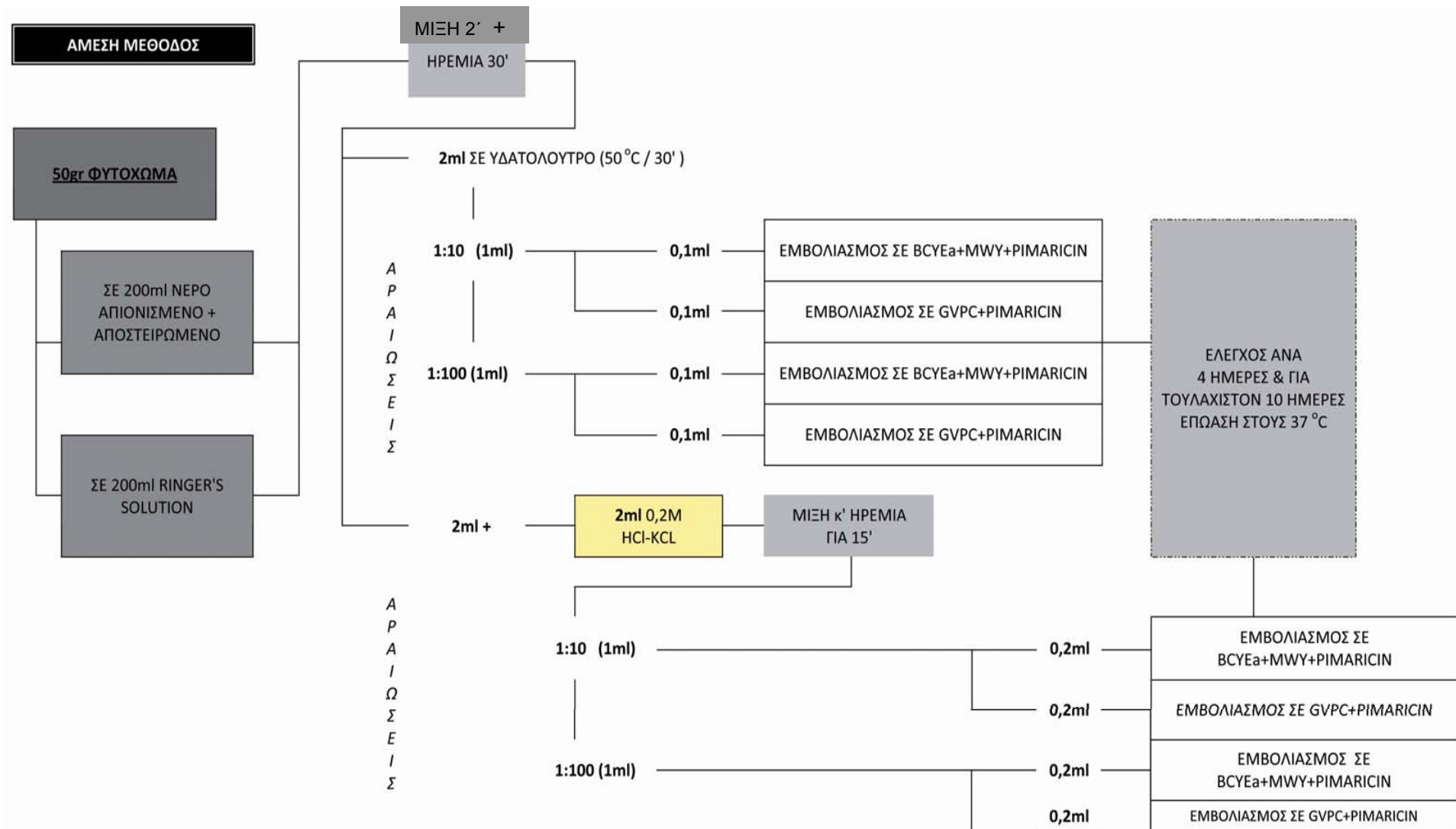
- Το ένα 0,2ml χρησιμοποιείται για επώαση σε BCYE άγαρ με MWY και rimaricin
- Το άλλο 0,2ml χρησιμοποιείται για επώαση σε GVPC άγαρ με rimaricin

(104)

**ΠΡΟΣΟΧΗ!** Η επώαση γίνεται στους 37 °C για 4 ημέρες και ο έλεγχος διαρκεί τουλάχιστον 10 ημέρες.



Εικ. 20. Μορφή αποικίας *Legionella pneumophila*  
(με τα βέλη) σε θρεπτικό υλικό



ΠΙΝΑΚΑΣ 8. Διάγραμμα βασικής ροής μεθοδολογίας απομόνωσης *Legionella spp* από φυτόχωμα

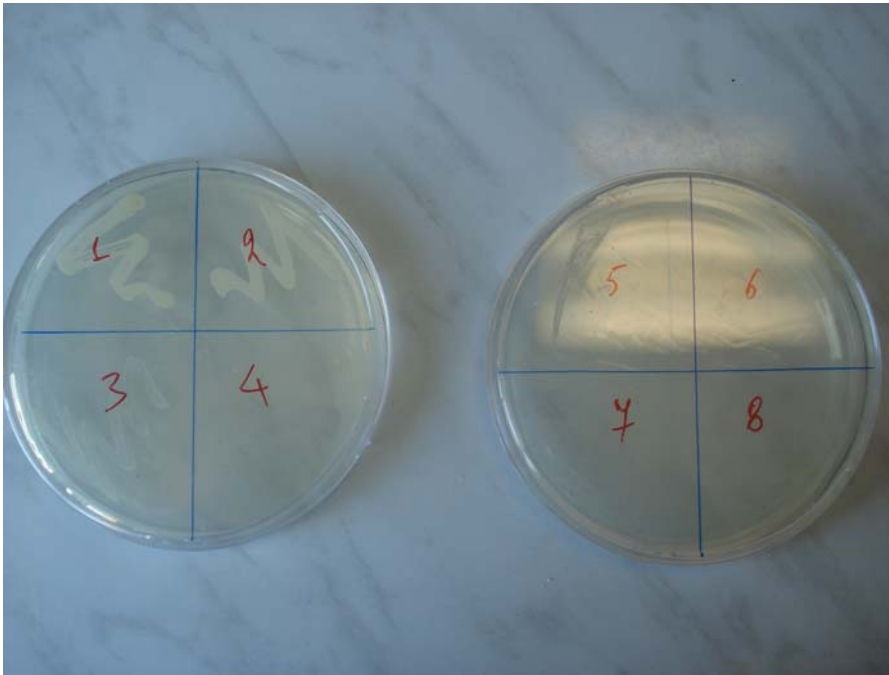
### 7.9.3. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΑ ΒΗΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ

Οι καλλιέργειες παρακολουθούνται ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Εάν δεν υπάρχει κάποια αποικία Λεγεωνέλλας ορατή με το μάτι μετά τις πρώτες 4 μέρες από την καλλιέργεια, θα πρέπει να ελέγχονται μέχρι τουλάχιστον 10 μέρες. Εάν δεν εμφανιστεί ανάπτυξη ύποπτη για Λεγεωνέλλα, τότε η καλλιέργεια χαρακτηρίζεται αρνητική.

Σε περίπτωση που υπάρχουν κάποια ορατά σημάδια αποικίας ύποπτης για Λεγεωνέλλα μετά από την 4<sup>η</sup> μέρα, γίνονται περαιτέρω βήματα για την αναγνώριση και την ταυτοποίηση της. Σε αυτό το στάδιο είναι πολύ σημαντική η χρήση στερεοσκοπίου, για την καλύτερη οπτική αναγνώριση των χαρακτηριστικών των ενδεχόμενων αποικιών Λεγεωνέλλας.

Εφόσον η μορφολογία εμφανίζει χαρακτηριστικά σημεία αποικιών καλλιεργούνται σε Nutrient agar για προκαταρκτική επιβεβαίωση της *Legionella* spp. Όταν στην περιοχή που έχει γίνει η καλλιέργεια δεν υπάρχει καμία ένδειξη ανάπτυξης τότε σημαίνει πως είναι θετικό για Λεγεωνέλλα (εικ. 21). Στην αντίθετη περίπτωση, δηλαδή εάν υπάρχουν σημάδια ανάπτυξης πάνω στο υλικό τότε είναι αρνητικό για Λεγεωνέλλα. Τα αποτελέσματα μπορούν να φανούν από την επόμενη μέρα, αλλά τα τρυβλία εξετάζονται τελικά μετά από 48 ώρες.

Σε περίπτωση που οι αποικίες δεν είναι πολύ καθαρές μπορεί να γίνει ανακαλλιέργεια από αυτές των πρώτων θρεπτικών υλικών σε *Legionella* agar ή σε *Legionella* selective agar για να επιτευχθεί καθαροποίησή τους.



Εικ. 21. Εδώ φαίνεται η διαφορά θετικού και αρνητικού για Λεγεωνέλλα με επίστρωση σε Nutrient agar.



Εικ. 22. Επίστρωση με διαδοχικές αραιώσεις *Legionella* spp σε θρεπτικό υλικό

Στη συνέχεια, μετά τη θετική αναγνώριση για Λεγεωνέλλα, με τη βοήθεια του εμπορικού αντιδραστηρίου κροκίδωσης γίνεται ταυτοποίηση για το είδος και την ορομάδα της. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως ταυτοποίηση γίνεται συνήθως σε κάποιες ομάδες Λεγεωνέλλας, για παράδειγμα με τα Latex που χρησιμοποιηθήκαν για αυτήν διπλωματική εργασία (της OXOID και της SLIDEX) γίνεται ταυτοποίηση:

- *Legionella pneumophila* ορομάδας 1(της OXOID και της SLIDEX)

- *Legionella pneumophila* οροομάδες 2-14 (της OXOID) ή 2-15 (της SLIDEX)
- Μία ομάδα ειδών Λεγεωνέλλας, Group 3 όπου αναγνωρίζονται ταυτόχρονα (της OXOID):
  - *Legionella longbeachae* οροομάδες 1 και 2
  - *Legionella bozemanii* οροομάδες 1 και 2
  - *Legionella dumoffii*
  - *Legionella gormanii*
  - *Legionella jordanis*
  - *Legionella micdadei*
  - *Legionella anisa* (το μόνο κοινό με την SLIDEX)



Εικ. 23. Ένα από τα αντιδραστήρια Latex που κυκλοφορούν στο εμπόριο



Εικ. 24. Ένα από τα αντιδραστήρια Latex (αυτό της Oxoid) από όπου έγιναν ταυτοποιήσεις σε αυτήν την διπλωματική εργασία

Οι αποικίες που αναγνωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν καλλιεργούνται σε *Legionella* agar (BCYE) με επίστρωση με διαδοχικές αραιώσεις, με τη βοήθεια κρικοφόρου στυλεού. Μόλις γίνει ανάπτυξη θα ξεκινήσει η διαδικασία για την αποθήκευση σε βαθιά κατάψυξη των αποικιών που ταυτοποιήθηκαν.

#### **7.9.4. ΒΑΘΕΙΑ ΚΑΤΑΨΥΞΗ**

Μόλις έχει αναγνωρισθεί το είδος της αποικίας, το επόμενο στάδιο είναι η βαθιά κατάψυξη. Η όλη διαδικασία θα γίνει σε περιβάλλον με την παρουσία λύχνου Bunsen. Με τη βοήθεια πιπέτας και ρυγχών 1ml σε ειδικά μικρά βιδωτά φιαλίδια τοποθετείται 1 ml BHIB+20% γλυκερόλη. Με τη χρήση κρικοφόρου στυλεού ένα κομμάτι της αναγνωρισμένης αποικίας τοποθετείται μέσα στο υλικό και ανακατεύεται καλά. Πρέπει να αναγραφεί πάνω στο κάθε σωληνάριο φύλαξης στελεχών σε βαθιά κατάψυξη (cryogenic tubes) το είδος και την ορομάδα της Λεγεωνέλλας που αποθηκεύεται και διάφορα στοιχεία αναγνώρισης, καθώς και η ημερομηνία κατάψυξης.

Ο ειδικός καταψύκτης αποθήκευσης θα πρέπει να φτάνει στους  $- 80^{\circ}$  C. Σημαντικό είναι η χρήση ειδικών γαντιών για την αποφυγή εγκαυμάτων από τις χαμηλές θερμοκρασίες του καταψύκτη.



Εικ. 25. Σωληνάρια φύλαξης στελεχών σε βαθιά κατάψυξη



### **7.9.5. ΕΝΔΙΑΜΕΣΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**

Μετά από τις πρώτες προσπάθειες απομόνωσης *Legionella* spp από φυτόχλωμα, γινόντουσαν τροποποιήσεις για:

- επιβεβαίωση αποτελεσματικότητας της μεθόδου
- καλύτερα και καθαρότερα αποτελέσματα

#### **1<sup>η</sup> τροποποίηση**

Ένα από τα στάδια που γινόταν μετά τα πρώτα αποτελέσματα της έρευνας, ήταν η τεχνητή μόλυνση σε δείγματα. Κατά την επεξεργασία των δειγμάτων και την τοποθέτησή τους σε ΥΑΑ και σε διάλυμα Ringer's γινόταν και άλλο ένα ζευγάρι επεξεργασμένων δειγμάτων, με μόνη διαφορά πως γινόταν σε αυτά τεχνητή επιμόλυνση. Αυτό την πρώτη φορά έγινε αποστειρώνοντας τα επεξεργασμένα δείγματα (σε υγρό κλίβανο στους 121° C για 1 τέταρτο) και στη συνέχεια γινόταν προσθήκη επιβεβαιωμένων αποικιών *Legionella pneumophila* οροομάδας 1, 2-15 καθώς και G3 (OXOID). Με τη βοήθεια του vortex γινόταν σωστή ανάδευση, μετά την προσθήκη Λεγεωνέλλας. Ο λόγος που αυτά τα στάδια είναι σημαντικά οφείλεται στην επιβεβαίωση ανάπτυξης *Legionella* spp σε φυτόχλωμα (ότι μπορεί να επιβιώσει) και πως η μέθοδος είναι σωστή. Από τη δεύτερη φορά και μετά, όσες ακόμα φορές έγινε τεχνητή επιμόλυνση, δεν γινόταν αποστείρωση του δείγματος για να ελέγχεται ταυτόχρονα και η πιθανή επίδραση άλλων παραγόντων για την ανάπτυξη ή επιβεβαίωση της *Legionella* spp.

#### **2<sup>η</sup> τροποποίηση**

Οι βασικές αραιώσεις της μεθοδολογίας είναι 1:10 και 1:100. Όμως, η εμφάνιση διάφορων μυκήτων και βακτηρίων ήταν πράγματι εντυπωσιακή, παρά τη χρήση rimaricin, για αυτό έγιναν σε κάποια φυτοχώματα και

αραιώσεις 1:1000 για την ελαχιστοποίηση της εμφάνισης τους (όσο μεγαλύτερη η αραίωση, τόσο αραιότερη εμφάνιση μυκήτων και βακτηρίων και πιθανά ευκολότερη η ανάπτυξη των *Legionellae*).

### **3<sup>η</sup> τροποποίηση**

Μαζί με την προσθήκη αραιώσεων έγινε και αλλαγή στην ποσότητα rimaricin που προστίθεται για τη μείωση ανάπτυξης των μυκήτων, που παρουσιάζονται όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Προστέθηκαν 250 mgp επιπλέον, στο 1 Lt θρεπτικού υλικού και η συνολική ποσότητα έγινε 1,25 γρ.

### **4<sup>η</sup> τροποποίηση**

Με αυτές τις διαφοροποιήσεις, τροποποιήθηκε η μεθοδολογία μέχρι να φτάσει στην τελική μορφή της. Δεν χρειάστηκε σε όλα τα δείγματα η τεχνητή επιμόλυνση, αφού επιβεβαιώθηκε και η επιβίωση αλλά και η αποτελεσματικότητα της μεθόδου απομόνωσης *Legionella* spp από φυτόχωμα. Επιπλέον, από όλες τις αραιώσεις, αυτή που παρουσίαζε την περισσότερη καθαρότητα αποτελεσμάτων χωρίς πολύ μεγάλη αραίωση, ήταν η 1:100, η οποία και επιλέγη ως η καταλληλότερη αραίωση εργασίας εν τέλει.

**ΠΡΟΣΟΧΗ!** Όλα τα sterilin συντηρούνται σε ψυγείο, σε περίπτωση που κάποια καλλιέργεια εμφανίζει υπερβολική ανάπτυξη χλωρίδας ώστε να είναι δυνατή η επανάληψη του ενοφθαλμισμού, χωρίς να επαναλαμβάνεται όλη η διαδικασία επεξεργασίας δείγματος. Σε μία τέτοια περίπτωση, τα sterilin βγαίνουν από το ψυγείο και μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια με τη βοήθεια του vortex αναδεύονται για 1 λεπτό και αφήνονται σε ηρεμία 15 λεπτά. Μετά γίνεται επίστρωση πάνω σε τρυβλία με θρεπτικά υλικά όπως έχει ήδη αναφερθεί. Τα τρυβλία θα πρέπει να μην έχουν ίχνος υγρασίας.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΕΡΕΥΝΑΣ

### 8.1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Στη διπλωματική αυτή εργασία, εξετάστηκαν 19 δείγματα φυτοχωμάτων για ανίχνευση *Legionella* spp. Βρέθηκαν αποικίες Λεγεωνέλλας στα φυτοχώματα που εξετάστηκαν και με τη βοήθεια Latex ταυτοποιήθηκαν. Τα είδη και οι ομάδες που ταυτοποιήθηκαν, με βάση τα Latex της OXOID και της SLIDEX, ήταν τα εξής:

- *Legionella pneumophila* οροομάδας 1 (της OXOID και της SLIDEX)
- *Legionella pneumophila* οροομάδες 2-14 (της OXOID) ή 2-15 (της SLIDEX)
- Μία ομάδα ειδών Λεγεωνέλλας, Group 3 όπου αναγνωρίζονται ταυτόχρονα (της OXOID):
  - *Legionella longbeachae* οροομάδες 1 και 2
  - *Legionella bozemanii* οροομάδες 1 και 2
  - *Legionella dumoffii*
  - *Legionella gormanii*
  - *Legionella jordanis*
  - *Legionella micdadei*
  - *Legionella anisa* (το μόνο κοινό με την SLIDEX)



Εικ. 26. Ένα από τα τρυβλία της έρευνας αυτής με αποικίες *Legionella* spp

## 8.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΡΕΥΝΑΣ

Κάποιες λεπτομέρειες για τα δείγματα και όλα τα αποτελέσματα της έρευνας καταγράφονται σε πίνακες για την ευκολότερη κατανόησή τους.

Σκοπός είναι η καλύτερη σύγκριση και καταγραφή τους.

<b>ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΤΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΡΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ</b>		
<b>Αριθμός Δείγματος</b>	<b>Θερμοκρασία δείγματος</b>	<b>Είδος δείγματος</b>
1	24,1 ° C	Φυτόχωμα εξωτερικού χώρου
2	24,3 ° C	Κακτόχωμα
3	27,4 ° C	Φυτόχωμα δημιουργίας ιδιοκτήτη
4	24,2 ° C	Καστανόχωμα
5	26,7 ° C	Φυτόχωμα
6	28,5 ° C	Φυτόχωμα εξωτερικού χώρου
7	28 ° C	Καστανόχωμα
8	30,2 ° C	Καστανόχωμα
9	31 ° C	Κουμαρόχωμα
10	30 ° C	Για οξύφυλλα
11	30 ° C	Φυτόχωμα
12	30,7 ° C	Κομπόστα
13	30,1 ° C	Φυτόχωμα εξωτερικού χώρου
14	29,6 ° C	Φυτόχωμα δημιουργίας ιδιοκτήτη
15	29,3 ° C	Φυτόχωμα δημιουργίας ιδιοκτήτη
16	29 ° C	Φυτόχωμα δημιουργίας ιδιοκτήτη
17	29,6 ° C	Φυτόχωμα εσωτερικού χώρου
18	31,1 ° C	Τυρφόχωμα
19	30,8 ° C	Κομπόστα
20	26,9 ° C	Τυρφόχωμα
21	26,8 ° C	Φυτόχωμα εξωτερικού χώρου
22	26,9 ° C	Καστανόχωμα

*ΠΙΝΑΚΑΣ 9. Είδος δείγματος και θερμοκρασία του κατά την ώρα δοκιμής*

Παραπάνω φαίνονται οι θερμοκρασίες των δειγμάτων την στιγμή που ξεκινούσε η επεξεργασία τους, καθώς και το είδος φυτοχώματος το οποίο ήταν.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι καταγραμμένα κατά ημερομηνία καλλιέργειας. Τα στοιχεία και τα σήματα που χρησιμοποιούνται στους πίνακες, είναι:

- **Υ.Α.Α.:** Ύδωρ απιονοσμένο – αποστειρωμένο

- **buffer:** Ρυθμιστικό διάλυμα HCl- KCl
- **Θ:** Σε υδατόλουτρο 50° C / 30 λεπτά
- **-** : αρνητικό για *Legionella* spp
- **+** : θετικό για *Legionella* spp

Σε όποιο θετικό για *Legionella* spp αποτέλεσμα, σε κάθε πίνακα ανάλυσης δειγμάτων, αναγράφεται σε παρένθεση δίπλα ο αριθμός αποικιών.

### ΔΕΙΓΜΑ 1

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 18/04/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας	
		BCYE+MWY+pimaricin	GVPC+pimaricin
YAA + buffer	1:10	-	-
	1:100	-	-
Ringer's + buffer	1:10	-	-
	1:100	-	-
YAA Θ	1:10	-	-
	1:100	-	-
Ringer's Θ	1:10	-	-
	1:100	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 10. Αποτελέσματα Δείγματος 1



Εικ. 27. Απεικόνιση αποικιών *Legionella* spp, με καλλιέργεια δείγματος από το νερό.

## ΔΕΙΓΜΑ 2

Ημ/νία Καλλιέργειας: 18/04/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας	
		BCYE+MWY+rimaricin	GVPC+rimaricin
ΥΑΑ + buffer	1:10	-	-
	1:100	-	-
Ringer's + buffer	1:10	-	-
	1:100	-	-
ΥΑΑ Θ	1:10	-	-
	1:100	-	-
Ringer's Θ	1:10	-	-
	1:100	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 11. Αποτελέσματα Δείγματος 2

## ΔΕΙΓΜΑ 4 (Πρώτη φορά)

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 12/06/2008

Από αυτό το δείγμα θα ξεκινήσει ένα παραπάνω βήμα στη διαδικασία της μεθοδολογίας. Ταυτόχρονα με την επεξεργασία των κανονικών δειγμάτων, θα γίνεται και ένα δεύτερο ζευγάρι δειγμάτων (το κάθε δείγμα υφίσταται επεξεργασία με 2 διαφορετικούς τρόπους, με Υ.Α.Α. και με Ringer's solution, όπως έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο 7). Στο δεύτερο ζευγάρι δειγμάτων γίνεται τεχνητή επιμόλυνση με *Lp1* και *Lp2-15* και *Legionella* Group 3. Στόχος είναι η επιβεβαίωση επιβίωσης *Legionella* spp και η αποτελεσματικότητα της μεθοδολογίας. Σε αυτό το δείγμα και για μόνο μία φορά θα γίνει και αποστείρωση του δείγματος πριν την τεχνητή επιμόλυνση.

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας		Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (με τεχνητή μόλυνση του δείγματος)	
		<u>BCYE+MWY+ pimaricin</u>	<u>GVPC+pi maricin</u>	<u>BCYE+MWY+ pimaricin</u>	<u>GVPC+pi maricin</u>
ΥΑΑ + buffer	1:10	-	-	-	-
	1:100	<b>+</b> (2)	-	-	-
Ringer's + buffer	1:10	-	-	<b>+</b> **	-
	1:100	-	-	-	-
ΥΑΑ Θ	1:10	-	-	-	-
	1:100	-	-	<b>+</b> **	-
Ringer's Θ	1:10	-	-	-	-
	1:100	-	<b>+</b> * (1)	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 12. Αποτελέσματα Δείγματος 4

**+**: Μετά από καλλιέργεια σε Nutrient agar, με μη ανάπτυξη, δηλαδή θετικό για *Legionella* spp, έγινε ταυτοποίηση με Latex. Βρέθηκαν 2 αποικίες *Legionella pneumophila* οροομάδων 2-14. Δείγμα από αυτήν αποικία αποθηκεύτηκε σε βαθειά κατάψυξη.

**+**\*: Μετά από καλλιέργεια σε Nutrient agar, με μη ανάπτυξη, δηλαδή θετικό για *Legionella* spp, έγινε ταυτοποίηση με Latex. Βρέθηκε 1 αποικία *Legionella pneumophila* οροομάδων 2-14. Δείγμα από αυτήν αποικία αποθηκεύτηκε σε βαθειά κατάψυξη.

**+**\*\* : Ταυτοποίηση με Latex για *Legionella pneumophila* οροομάδας 1 και 2-15.

Στα δείγματα του μη αποστειρωμένου χώματος με πειραματική μόλυνση με *Legionella* spp ότι ο οικολογικός ανταγωνισμός από τη χλωρίδα του χώματος, καταστέλλει σε άλλοτε άλλο βαθμό τον πληθυσμό της Λεγεωνέλλας που πειραματικά ενοφθαλμίζεται εντός του χώματος.

#### **ΔΕΙΓΜΑ 4 (Δεύτερη φορά)**

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 25/06/2008

Κατά τη διάρκεια προσπάθειας ανάγνωσης των αποτελεσμάτων από τις καλλιέργειες του δείγματος 4 υπήρξαν προβλήματα, λόγω ανάπτυξης

μυκήτων και άλλων βακτηρίων εξαιτίας της σύστασης του φυτοχώματος. Για αυτόν ακριβώς το λόγο επαναλήφθηκαν οι καλλιέργειες του δείγματος 4.

Κατόπιν σε οποιοδήποτε δείγμα γίνει ανακαλλιέργεια για τον ίδιο λόγο, θα αναγράφεται σαν δείγμα - δεύτερη φορά.

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας		Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (με τεχνητή μόλυνση του δείγματος)	
		<u>BCYE+MWY+ pimaricin</u>	<u>GVPC+ pimaricin</u>	<u>BCYE+MWY+ pimaricin</u>	<u>GVPC+ pimaricin</u>
ΥΑΑ + buffer	1:10	-	-	<b>Δεν έγινε καλλιέργεια</b>	
	1:100	-	-	-	-
Ringer's + buffer	1:10	-	-	-	-
	1:100	-	-	-	-
ΥΑΑ Θ	1:10	-	-	-	-
	1:100	<b>+ (1)</b>	-	-	-
Ringer's Θ	1:10	-	-	-	-
	1:100	-	-	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 13. Αποτελέσματα Δείγματος 4 (δεύτερη φορά)

**+**: Μετά από καλλιέργεια σε Nutrient agar, με μη ανάπτυξη, δηλαδή θετικό για *Legionella* spp, έγινε ταυτοποίηση με Latex. Βρέθηκε 1 αποικία *Legionella pneumophila* οροομάδας 2-15. Δείγμα από αυτήν αποικία αποθηκεύτηκε σε βαθειά κατάψυξη.

### ΔΕΙΓΜΑ 3

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 02/07/2008

Από το δείγμα 3 και μετά, δεν χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις 1:10.

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας		Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (με τεχνητή μόλυνση του δείγματος)	
		<u>BCYE+MWY+ pimaricin</u>	<u>GVPC+ pimaricin</u>	<u>BCYE+MWY+ pimaricin</u>	<u>GVPC+ pimaricin</u>
ΥΑΑ + buffer	1:100	-	-	-	-



	1:100	-	-	-	-
Ringer's + buffer	1:100	<b>+</b> (1)	-	<b>+</b> *	-
	1:100	-	-	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 14. Αποτελέσματα Δείγματος 3

**+**: Μετά από καλλιέργεια σε Nutrient agar, με μη ανάπτυξη, δηλαδή θετικό για *Legionella* spp, έγινε ταυτοποίηση με Latex. Βρέθηκε 1 αποικία *Legionella pneumophila* οροομάδας 1.

**+**\*: Μετά από καλλιέργεια σε Nutrient agar, με μη ανάπτυξη, δηλαδή θετικό για *Legionella* spp, έγινε ταυτοποίηση με Latex. Βρέθηκε *Legionella pneumophila* οροομάδας 1, που υποδεικνύει πως η *Legionella* spp επιβιώνει σε φυτόχλωμα σε σχέση με την ύπαρξη της υπόλοιπης χλωρίδας.

## ΔΕΙΓΜΑ 5

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 02/07/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας		Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (με τεχνητή μόλυνση του δείγματος)	
		<u>BCYE+M</u> <u>WY+</u> <u>pimaricin</u>	<u>GVPC+</u> <u>pimaricin</u>	<u>BCYE+M</u> <u>WY+</u> <u>pimaricin</u>	<u>GVPC+</u> <u>pimaricin</u>
ΥΑΑ + buffer	1:100	<b>+</b> (1)	-	-	-
Ringer's + buffer	1:100	-	-	-	-
ΥΑΑ Θ	1:100	-	-	-	-
Ringer's Θ	1:100	-	-	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 15. Αποτελέσματα Δείγματος 5

**+**: Μετά από καλλιέργεια σε Nutrient agar, με μη ανάπτυξη, δηλαδή θετικό για *Legionella* spp, έγινε ταυτοποίηση με Latex. Βρέθηκε 1 αποικία *Legionella pneumophila* οροομάδας 1.

## ΔΕΙΓΜΑ 6 (Πρώτη φορά)

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 08/07/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας		Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (με τεχνητή μόλυνση του δείγματος)	
		<u>BCYE+MWY+ pimaricin</u>	<u>GVPC+ pimaricin</u>	<u>BCYE+MWY+ pimaricin</u>	<u>GVPC+ pimaricin</u>
ΥΑΑ + buffer	1:100	-	-	-	-
Ringer's + buffer	1:100	-	-	-	-
ΥΑΑ Θ	1:100	-	-	-	-
Ringer's Θ	1:100	-	-	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 16. Αποτελέσματα Δείγματος 6

Ήταν αδύνατη η αναγνώριση ενδεχόμενων αποικιών καθώς είχαν αναπτυχθεί μύκητες στην επιφάνεια των θρεπτικών υλικών.

## ΔΕΙΓΜΑ 7

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 08/07/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας		Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (με τεχνητή μόλυνση του δείγματος)	
		<u>BCYE+MWY+ pimaricin</u>	<u>GVPC+ pimaricin</u>	<u>BCYE+MWY+ pimaricin</u>	<u>GVPC+ pimaricin</u>
ΥΑΑ + buffer	1:100	-	-	-	-
Ringer's + buffer	1:100	-	-	-	-
ΥΑΑ Θ	1:100	-	<b>+ (1)</b>	-	-
Ringer's Θ	1:100	-	-	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 17. Αποτελέσματα Δείγματος 7

**+**: Μετά από καλλιέργεια σε Nutrient agar, με μη ανάπτυξη, δηλαδή θετικό για *Legionella* spp, έγινε ταυτοποίηση με Latex. Βρέθηκε 1 αποικία *Legionella*

*rhizophila* οροομάδας 2-14. Δείγμα από αυτήν αποικία αποθηκεύτηκε σε βαθειά κατάψυξη.



Εικ. 28. Τρόπος ταυτοποίησης *Legionella spp* με την χρήση Latex

### ΔΕΙΓΜΑ 6 (Δεύτερη φορά)

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 14/07/2008

Από το πείραμα αυτό και μετά, η αραιώση που χρησιμοποιείται για ενοφθαλισμό στα θρεπτικά υλικά είναι η 1:1000 και μόνο κάποιες επιλογές (για οικονομικούς λόγους) από τα επεξεργασμένα δείγματα με την τεχνητή μόλυνση. Επιπλέον αποφασίσθηκε να αυξηθεί η ποσότητα pimaricin στα θρεπτικά υλικά σε 1,25 γρ στο λίτρο.

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας		Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (με τεχνητή μόλυνση του δείγματος)	
		<u>BCYE+MWY+ pimaricin</u>	<u>GVPC+ pimaricin</u>	<u>BCYE+MWY+ pimaricin</u>	<u>GVPC+pimaricin</u>
ΥΑΑ + buffer	1:1000	<b>+ (1)</b>	<b>+* (3)</b>	<b>Δεν έγινε καλλιέργεια</b>	
Ringer's + buffer	1:1000	-	<b>+** (2)</b>	<b>Δεν έγινε καλλιέργεια</b>	
ΥΑΑ Θ	1:1000	<b>+ (1)</b>	<b>+ (1)</b>	<b>Δεν έγινε καλλιέργεια</b>	
Ringer's Θ	1:1000	<b>+*** (2)</b>	<b>+*** (2)</b>	<b>Δεν έγινε καλλιέργεια</b>	<b>+****</b>

ΠΙΝΑΚΑΣ 18. Αποτελέσματα Δείγματος 6

**+**: Μετά από καλλιέργεια σε Nutrient agar, με μη ανάπτυξη, δηλαδή θετικό για *Legionella* spp, έγινε ταυτοποίηση με Latex. Βρέθηκε 1 αποικία *Legionella* Group 3. Δείγμα από αυτήν αποικία αποθηκεύτηκε σε βαθειά κατάψυξη.

**+\***: Μετά από καλλιέργεια σε Nutrient agar, με μη ανάπτυξη, δηλαδή θετικό για *Legionella* spp, έγινε ταυτοποίηση με Latex. Βρέθηκαν: 1 αποικία *Legionella* Group 3 και 2 αποικίες *Legionella pneumophila* οροομάδας 2-15. Δείγμα από αυτές τις αποικίες αποθηκεύτηκαν σε βαθειά κατάψυξη.

**+\*\***: Μετά από καλλιέργεια σε Nutrient agar, με μη ανάπτυξη, δηλαδή θετικό για *Legionella* spp, έγινε ταυτοποίηση με Latex. Βρέθηκε 2 αποικίες *Legionella* Group 3. Δείγμα από αυτήν αποικία αποθηκεύτηκε σε βαθειά κατάψυξη.

**+\*\*\***: Μετά από καλλιέργεια σε Nutrient agar, με μη ανάπτυξη, δηλαδή θετικό για *Legionella* spp, έγινε ταυτοποίηση με Latex. Βρέθηκαν 2 αποικίες *Legionella* Group 3. Δείγματα από αυτές τις αποικίες αποθηκεύτηκαν σε βαθειά κατάψυξη.

**+\*\*\*\***: Μετά από καλλιέργεια σε Nutrient agar, με μη ανάπτυξη, δηλαδή θετικό για *Legionella* spp, έγινε ταυτοποίηση με Latex και βρέθηκε *Legionella pneumophilla* 2-15

### **ΔΕΙΓΜΑ 7 (Δεύτερη φορά)**

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 14/07/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας		Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (με τεχνητή μόλυνση του δείγματος)	
		<u>BCYE+MWY+ pimaricin</u>	<u>GVPC+ pimaricin</u>	<u>BCYE+MWY+ pimaricin</u>	<u>GVPC+ pimaricin</u>
YAA + buffer	1:1000	-	-	+	Δεν έγινε καλλιέργεια
Ringer's + buffer	1:1000	-	-	Δεν έγινε καλλιέργεια	
YAA Θ	1:1000	<b>+* (1)</b>	-	Δεν έγινε καλλιέργεια	
Ringer's Θ	1:1000	-	-	Δεν έγινε καλλιέργεια	

ΠΙΝΑΚΑΣ 19. Αποτελέσματα Δείγματος 7

**+**: Μετά από καλλιέργεια σε Nutrient agar, με μη ανάπτυξη, δηλαδή θετικό για *Legionella* spp, έγινε ταυτοποίηση με Latex και βρέθηκε *Legionella pneumophilla* 2-15

**+\***: Μετά από καλλιέργεια σε Nutrient agar, με μη ανάπτυξη, δηλαδή θετικό για *Legionella* spp, έγινε ταυτοποίηση με Latex. Βρέθηκε 1 αποικία *Legionella* Group 3. Δείγμα από αυτήν αποικία αποθηκεύτηκε σε βαθειά κατάψυξη.

## ΔΕΙΓΜΑ 12

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 26/08/2008

Από αυτό το πείραμα και μετά δεν ξαναγίνεται για οικονομικούς λόγους το στάδιο της τεχνητής μόλυνσης.

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας	
		BCYE+MWY+pimaricin	GVPC+pimaricin
ΥΑΑ + buffer	1:100	-	-
Ringer's + buffer	1:100	-	-
ΥΑΑ Θ	1:100	-	-
Ringer's Θ	1:100	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 20. Αποτελέσματα Δείγματος 12

## ΔΕΙΓΜΑ 18

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 26/08/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας	
		BCYE+MWY+pimaricin	GVPC+pimaricin
ΥΑΑ + buffer	1:100	-	-
Ringer's + buffer	1:100	-	-
ΥΑΑ Θ	1:100	-	-
Ringer's Θ	1:100	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 21. Αποτελέσματα Δείγματος 18

## ΔΕΙΓΜΑ 8

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 01/09/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας	
		BCYE+MWY+pimaricin	GVPC+pimaricin
ΥΑΑ + buffer	1:100	-	-
Ringer's + buffer	1:100	-*	-
ΥΑΑ Θ	1:100	-	-
Ringer's Θ	1:100	-*	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 22. Αποτελέσματα Δείγματος 8

-\*: Επαναλήφθηκαν οι καλλιέργειες στις 08/09/2008 καθώς τα αποτελέσματα δεν ήταν καθαρά

### ΔΕΙΓΜΑ 9

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 01/09/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας	
		BCYE+MWY+pimaricin	GVPC+pimaricin
ΥΑΑ + buffer	1:100	-	-
Ringer's + buffer	1:100	-	-
ΥΑΑ Θ	1:100	-	-
Ringer's Θ	1:100	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 23. Αποτελέσματα Δείγματος 9

### ΔΕΙΓΜΑ 19

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 01/09/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας	
		BCYE+MWY+pimaricin	GVPC+pimaricin
ΥΑΑ + buffer	1:100	-	-
Ringer's + buffer	1:100	-	-
ΥΑΑ Θ	1:100	-	-
Ringer's Θ	1:100	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 24. Αποτελέσματα Δείγματος 19

### ΔΕΙΓΜΑ 14

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 09/09/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας	
		BCYE+MWY+pimaricin	GVPC+pimaricin
ΥΑΑ + buffer	1:100	-	-
Ringer's + buffer	1:100	-	-
ΥΑΑ Θ	1:100	-	-
Ringer's Θ	1:100	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 25. Αποτελέσματα Δείγματος 14

**ΔΕΙΓΜΑ 15**

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 09/09/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας	
		BCYE+MWY+pimaricin	GVPC+pimaricin
ΥΑΑ + buffer	1:100	-	-
Ringer's + buffer	1:100	-	-
ΥΑΑ Θ	1:100	-	-
Ringer's Θ	1:100	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 26. Αποτελέσματα Δείγματος 15

**ΔΕΙΓΜΑ 16**

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 09/09/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας	
		BCYE+MWY+pimaricin	GVPC+pimaricin
ΥΑΑ + buffer	1:100	-	-
Ringer's + buffer	1:100	-	-
ΥΑΑ Θ	1:100	-	-
Ringer's Θ	1:100	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 27. Αποτελέσματα Δείγματος 16

**ΔΕΙΓΜΑ 10**

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 12/09/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας	
		BCYE+MWY+pimaricin	GVPC+pimaricin
ΥΑΑ + buffer	1:100	-	-
Ringer's + buffer	1:100	-	-
ΥΑΑ Θ	1:100	-	-
Ringer's Θ	1:100	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 28. Αποτελέσματα Δείγματος 10

### ΔΕΙΓΜΑ 11

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 12/09/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας	
		BCYE+MWY+pimaricin	GVPC+pimaricin
ΥΑΑ + buffer	1:100	-	-
Ringer's + buffer	1:100	-	-
ΥΑΑ Θ	1:100	-	-
Ringer's Θ	1:100	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 29. Αποτελέσματα Δείγματος 11

### ΔΕΙΓΜΑ 13

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 12/09/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας	
		BCYE+MWY+pimaricin	GVPC+pimaricin
ΥΑΑ + buffer	1:100	*	-
Ringer's + buffer	1:100	-	*
ΥΑΑ Θ	1:100	-	-
Ringer's Θ	1:100	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 30. Αποτελέσματα Δείγματος 13

\*: Επανελήφθησαν οι καλλιέργειες στις 18/09/2008 καθώς τα αποτελέσματα δεν ήταν καθαρά

### ΔΕΙΓΜΑ 17

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 12/09/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας	
		BCYE+MWY+pimaricin	GVPC+pimaricin
ΥΑΑ + buffer	1:100	-	-
Ringer's + buffer	1:100	-	-
ΥΑΑ Θ	1:100	-	-
Ringer's Θ	1:100	<b>+ (1)</b>	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 31. Αποτελέσματα Δείγματος 17



**+**: Μετά από καλλιέργεια σε Nutrient agar, με μη ανάπτυξη, δηλαδή θετικό για *Legionella* spp, έγινε ταυτοποίηση με Latex. Βρέθηκε 1 αποικία *Legionella pneumophila* 2-15. Δείγμα από αυτήν αποικία αποθηκεύτηκε σε βαθειά κατάψυξη.

### **ΔΕΙΓΜΑ 20**

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 19/09/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας	
		<u>BCYE+MWY+pimaricin</u>	<u>GVPC+pimaricin</u>
YAA + buffer	1:100	<b>X</b>	-
Ringer's + buffer	1:100	<b>X</b>	-
YAA Θ	1:100	<b>X</b>	-
Ringer's Θ	1:100	<b>X</b>	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 32. Αποτελέσματα Δείγματος 20

**X**: Δεν έγινε καλλιέργεια σε αυτό το υλικό καθώς τελείωσαν τα αποθέματα

### **ΔΕΙΓΜΑ 21(Πρώτη φορά)**

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 19/09/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας	
		<u>BCYE+MWY+pimaricin</u>	<u>GVPC+pimaricin</u>
YAA + buffer	1:100	<b>X</b>	-
Ringer's + buffer	1:100	<b>X</b>	-
YAA Θ	1:100		-
Ringer's Θ	1:100	<b>X</b>	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 33. Αποτελέσματα Δείγματος 21

**X**: Δεν έγινε καλλιέργεια σε αυτό το υλικό καθώς τελείωσαν τα αποθέματα

### **ΔΕΙΓΜΑ 22(Πρώτη φορά)**

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 19/09/2008

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας	
		<u>BCYE+MWY+pimaricin</u>	<u>GVPC+pimaricin</u>
YAA + buffer	1:100	-	-
Ringer's + buffer	1:100	<b>X</b>	-
YAA Θ	1:100	<b>X</b>	-
Ringer's Θ	1:100	<b>X</b>	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 34. Αποτελέσματα Δείγματος 22

**X:** Δεν έγινε καλλιέργεια σε αυτό το υλικό καθώς τελείωσαν τα αποθέματα

### **ΔΕΙΓΜΑ 21 (Δεύτερη φορά)**

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 23/09/2008

Έγινε ανακαλλιέργεια στα τελευταία θρεπτικά υλικά, καθώς τα αποτελέσματα δεν ήταν ευανάγνωστα λόγω ανάπτυξης διάφορων μικροοργανισμών και μυκήτων.

Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας
		<u>GVPC+pimaricin</u>
Ringer's + buffer	1:1000	-
ΥΑΑ Θ	1:1000	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 35. Αποτελέσματα Δείγματος 21 (δεύτερη φορά)

### **ΔΕΙΓΜΑ 22 (Δεύτερη φορά)**

Ημερομηνία Καλλιέργειας: 23/09/2008

Έγινε ανακαλλιέργεια στα τελευταία θρεπτικά υλικά, καθώς τα αποτελέσματα δεν ήταν ευανάγνωστα λόγω ανάπτυξης διάφορων μικροοργανισμών και μυκήτων.

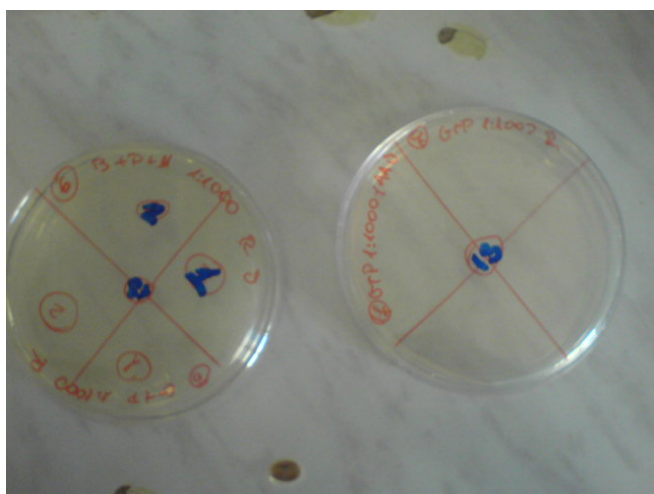
Επεξεργασία δείγματος	Αραίωση δείγματος	Θρεπτικό υλικό καλλιέργειας
		<u>GVPC+pimaricin</u>
ΥΑΑ+ buffer	1:1000	-
ΥΑΑ Θ	1:1000	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 36. Αποτελέσματα Δείγματος 22 (δεύτερη φορά)

Μία από τις εντυπωσιακότερες παρατηρήσεις σε αυτήν την έρευνα είναι η μορφολογία των αποικιών της *Legionella* spp. Στο θρεπτικό υλικό που περιείχε MWY το χρώμα των αποικιών ήταν περισσότερο πρασινογάλαζο.

Επιπλέον, υπήρχαν φορές που ορισμένες αποικίες δεν είχαν γυαλιστερή όψη και είχαν μικρότερο μέγεθος αυτών που προκύπτουν από τις απομονώσεις του βακτηρίου από το νερό, σπανίως όμως προσεγγίζεται αρκετά την αντίστοιχη τυπική μορφολογία των κλασσικών αποικιών *Legionella* spp.

Θα πρέπει να σημειωθεί πως εκτός της ανακάλυψης *Legionella pneumophila* οροομάδας 1, το οποίο θα αναλυθεί περισσότερο παρακάτω, είχαν γίνει κάποιες επιστρώσεις πιθανών αποικιών σε Nutrient agar με μη ανάπτυξη για *Legionella* spp, όμως δεν ήταν δυνατή η ταυτοποίηση με το Latex. Αυτό πιθανώς διότι τα Latex της OXOID και της SLIDEX που χρησιμοποιούνταν για αυτήν την εργασία δεν μπορούσε να ταυτοποιήσει όλα τα είδη *Legionella* spp.



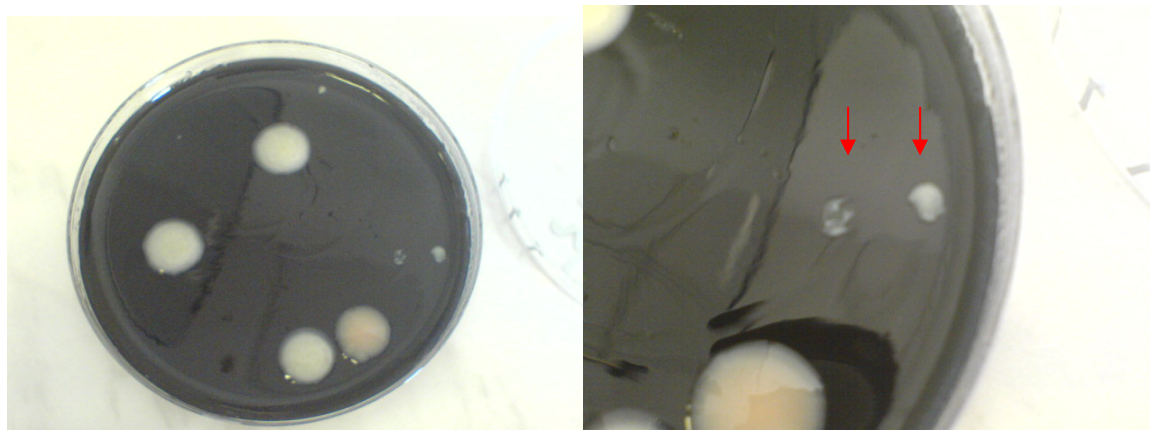
Εικ. 29. Επιστρώσεις ύποπτων αποικιών για *Legionella* spp σε Nutrient agar, που βγήκαν θετικές.

### 8.3. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Παρακάτω παρουσιάζεται ένας πίνακας συγκεντρωτικός με όλα τα θετικά για *Legionella* spp αποτελέσματα από την ανίχνευση βακτηρίων Λεγεωνέλλας στα φυτοχώματα που έγιναν στον Νομό Αττικής. Ο συγκεκριμένος πίνακας θα βοηθήσει στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και παρακάτω σε διάφορες συγκρίσεις.

Η ανάλυση των συντομογραφιών που χρησιμοποιήθηκαν στον συγκεντρωτικό πίνακα αποτελεσμάτων είναι:

- Υ.Α.Α. : Ύδωρ Απιονισμένο και Αποστειρωμένο
- Θ: Επεξεργασία δείγματος στην οποία χρησιμοποιήθηκε και το υδατόλουτρο, όπου Θ = θερμό
- BCYE +: Είναι το θρεπτικό υλικό BCYE, το οποίο παρασκευάζεται όπως ορίζουν οι κατασκευαστές με παραπάνω συμπληρώματα, το αντιμυκητιστακό rimaricin και το MWY
- GVPC +: Είναι το θρεπτικό υλικό GVPC, το οποίο παρασκευάζεται όπως ορίζουν οι κατασκευαστές με παραπάνω συμπλήρωμα, το αντιμυκητιστακό rimaricin
- Lp: Συντομογραφία της *Legionella pneumophila*



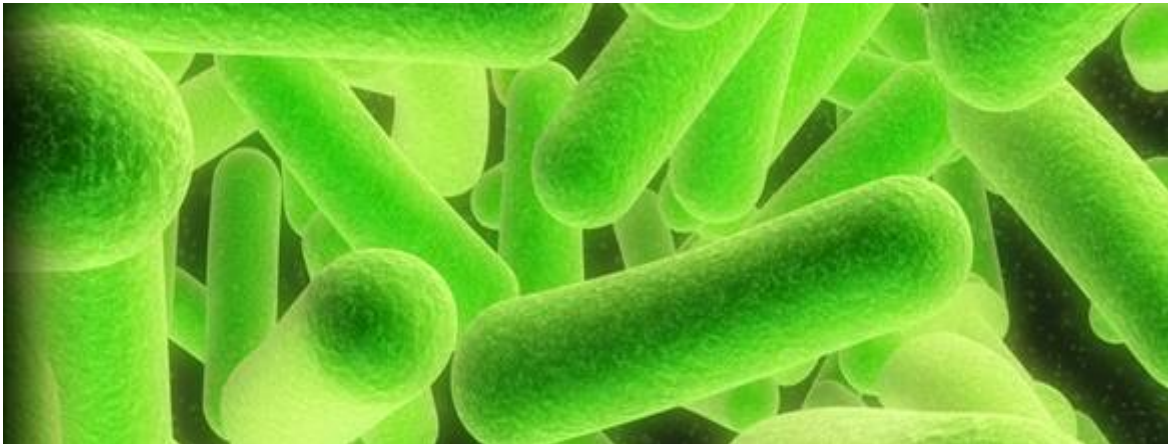
Εικ. 30. Καλλιέργεια φυτοχωμάτων από το 6 δείγμα, επεξεργασμένο με Διάλυμα Ringer. σε GVPC με rimaricin με ταυτοποιημένη *Legionella spp* (και σε κοντινό)

Το ότι τα βακτήρια της *Legionella spp* βρίσκονται κυρίως σε νερό, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη <sup>(105)</sup>.

Παρακάτω γίνεται καταγραφή, ανά δείγμα, το ποσό αποικιών που έχουν βρεθεί. Στα δείγματα τα οποία υπήρχε επιβεβαιωμένη και ταυτοποιημένη *Legionella spp* αναγράφεται το μέσο στο οποίο επεξεργάστηκε

το δείγμα για τη καλλιέργειά του, το θρεπτικό υλικό στο οποίο έγινε η καλλιέργεια καθώς και η αραίωση που χρησιμοποιήθηκε.

Στις πράξεις για την εύρεση αριθμού αποικιών ανά γραμμάριο χώματος, γίνονται ανάλογα με το ποσό επίστρωσης στα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία (0,1 ml ή 0,2 ml) και με την αραίωση που χρησιμοποιήθηκε 1:10, 1:100 ή 1:1000).



**ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ  
ΑΠΟΙΚΙΩΝ *LEGIONELLA* SPP**

ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΑΡΑΙΩΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	°C ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ	<i>LEGIONELLA</i> SPP
3	Υ.Α.Α. Θ	1:100	Ιδιοπαρασκευής	27,4 °C	BCYE +	1	<b>Lp 1</b>
4 (1 <sup>η</sup> φορά)	Υ.Α.Α. Θ	1:100	Καστανόχωμα	24,2 °C	BCYE +	2	Lp 2-15
4 (2 <sup>η</sup> φορά)	Υ.Α.Α. Θ	1:100			BCYE +	2	Lp 2-15
5	Υ.Α.Α.	1:100	Φυτόχωμα	26,7 °C	BCYE +	1	<b>Lp 1</b>
6 (2 <sup>η</sup> φορά)	Υ.Α.Α.	1:1000	Φυτόχωμα εξωτερικού χώρου	28,5 °C	BCYE +	1	Group 3
	Υ.Α.Α.	1:1000			GVPC +	2	Group 3
	Υ.Α.Α.	1:1000			GVPC +	1	Lp 2-15
	Ringer's solution	1:1000			GVPC +	2	Group 3
	Υ.Α.Α. Θ	1:1000			BCYE +	1	Group 3
	Υ.Α.Α. Θ	1:1000			GVPC +	1	Group 3
	Ringer's solution Θ	1:1000			BCYE +	2	Group 3
	Ringer's solution Θ	1:1000			GVPC +	2	Group 3
7	Υ.Α.Α. Θ	1:100	Καστανόχωμα	28 °C	GVPC +	1	Lp 2-14
7 (2 <sup>η</sup> φορά)	Υ.Α.Α. Θ	1:1000		28 °C	BCYE +	1	Group 3
17	Ringer's solution Θ	1:100	Φυτόχωμα εσωτερικού χώρου	29,6 °C	BCYE +	1	Lp 2-15

ΠΙΝΑΚΑΣ 37. Συγκεντρωτικός πίνακας ταυτοποίησης αποικιών *Legionella* spp από φυτόχωμα

### ΔΕΙΓΜΑ 1

Δεν απομονώθηκαν αποικίες *Legionella* spp.

### ΔΕΙΓΜΑ 2

Δεν απομονώθηκαν αποικίες *Legionella* spp.

### ΔΕΙΓΜΑ 3

(ΥΑΑ 1:100, BCYE+MWY+primaricin 1 αποικία)

1 αποικία χ 100 αραιώση = 100 αποικίες/0,2 ml επίστρωσης

Επομένως: 100 αποικίες χ 10 = 1.000 αποικίες/1 ml

$\frac{1.000 \text{ αποικίες}}{1 \text{ ml}} \times 200 \text{ ml επεξεργασίας} = 200.000 \text{ αποικίες}/200 \text{ ml}$

Σε 50 γρ χώματος έχουμε 200.000 αποικίες

Σε 1 γρ χώματος πόσο (X) έχουμε;

$$X = \frac{200.000}{50} = 4.000 \text{ αποικίες /γρ χώματος}$$

Άρα, στο δείγμα 3 υπάρχουν **4.000 αποικίες /γρ χώματος**

### ΔΕΙΓΜΑ 4

#### Πρώτη Φορά

❖ (ΥΑΑ 1:100, BCYE+MWY+primaricin , 2 αποικίες)

2 αποικίες χ 100 αραιώση = 200 αποικίες/0,2 ml επίστρωσης

Επομένως: 200 αποικίες χ 10 = 2.000 αποικίες/1 ml

$\frac{2.000 \text{ αποικίες}}{1 \text{ ml}} \times 200 \text{ ml επεξεργασίας} = 400.000 \text{ αποικίες}/200 \text{ ml}$

Σε 50 γρ χώματος έχουμε 400.000 αποικίες

Σε 1 γρ χώματος πόσο (X) έχουμε;

$$X = \frac{400.000}{50} = 8.000 \text{ αποικίες /γρ χώματος}$$

0.1ml HCl+KCL 0.2M

0,1ml νερού  
εναιωρήματος

0.1ml HCl+KCL 0.2M

0,1ml νερού  
εναιωρήματος

❖ (Διάλυμα Ringer 1:100, GVPC+pimaricin, 1 αποικίες)

1 αποικία χ 100 αραιώση = 100 αποικίες/0,2 ml επίστρωσης

Επομένως: 100 αποικίες χ 10 = 1.000 αποικίες/1 ml

$\frac{1.000 \text{ αποικίες}}{1 \text{ ml}} \times 200 \text{ ml επεξεργασίας} = 200.000 \text{ αποικίες}/200 \text{ ml}$

Σε 50 γρ χώματος έχουμε 20.0000 αποικίες

Σε 1 γρ χώματος πόσο (X) έχουμε;

$$X = \frac{200.000}{50} = 4.000 \text{ αποικίες /γρ χώματος}$$

Δεύτερη φορά

(ΥΑΑ Θ 1:100, BCYE+MWY+pimaricin, 1 αποικία)

1 αποικία χ 100 αραιώση = 100 αποικίες/0,2 ml επίστρωσης

Εοπμένως: 100 αποικίες χ 10 = 1.000 αποικίες/1 ml

$\frac{1.000 \text{ αποικίες}}{1 \text{ ml}} \times 200 \text{ ml επεξεργασίας} = 200.000 \text{ αποικίες}/200 \text{ ml}$

Σε 50 γρ χώματος έχουμε 200.000 αποικίες

Σε 1 γρ χώματος πόσο (X) έχουμε;

$$X = \frac{200.000}{50} = 4.000 \text{ αποικίες /γρ χώματος}$$

Άρα, στο δείγμα 4 υπάρχουν **4.000 – 8.000 αποικίες /γρ χώματος**

**ΔΕΙΓΜΑ 5**

(ΥΑΑ 1:100, BCYE+MWY+pimaricin, 1 αποικία)

1 αποικία χ 100 αραιώση = 100 αποικίες/0,2 ml επίστρωσης

Επομένως: 100 αποικίες χ 10 = 1.000 αποικίες/1 ml

$\frac{1.000 \text{ αποικίες}}{1 \text{ ml}} \times 200 \text{ ml επεξεργασίας} = 200.000 \text{ αποικίες}/200 \text{ ml}$

Σε 50 γρ χώματος έχουμε 200.000 αποικίες

Σε 1 γρ χώματος πόσο (X) έχουμε;

0.1ml HCl+KCL 0.2M

0,1ml νερού  
εναιωρήματος

0.1ml HCl+KCL 0.2M

0,1ml νερού  
εναιωρήματος

0.1ml HCl+KCL 0.2M

0,1ml νερού  
εναιωρήματος



$$X = \frac{200.000}{50} = 4.000 \text{ αποικίες /γρ χώματος}$$

Άρα, στο δείγμα 5 υπάρχουν **4.000 αποικίες /γρ χώματος**

### ΔΕΙΓΜΑ 6

#### Πρώτη Φορά

Δεν απομονώθηκαν αποικίες *Legionella* spp.

#### Δεύτερη Φορά

❖ (ΥΑΑ 1:1000, BCYE+MWY+pimaricin, 1 αποικίες)

1 αποικία χ 1000 αραίωση = 1000 αποικίες/0,2 ml επίστρωσης

Επομένως: 1.000 αποικίες χ 10 = 10.000 αποικίες/2 ml

$\frac{10.000 \text{ αποικίες}}{1 \text{ ml}} \chi 200 \text{ ml επεξεργασίας} = 2.000.000 \text{ αποικίες/200 ml}$

Σε 50 γρ χώματος έχουμε 2.000.000 αποικίες

Σε 1 γρ χώματος πόσο (X) έχουμε;

$$X = \frac{2.000.000}{50} = 40.000 \text{ αποικίες /γρ χώματος}$$

❖ (ΥΑΑ 1:1000, GVPC+pimaricin, 2+1 αποικίες)

3 αποικία χ 1000 αραίωση = 3.000 αποικίες/0,2 ml επίστρωσης

Επομένως: 3.000 αποικίες χ 10 = 30.000 αποικίες/2 ml

$\frac{30.000 \text{ αποικίες}}{1 \text{ ml}} \chi 200 \text{ ml επεξεργασίας} = 6.000.000 \text{ αποικίες/200 ml}$

Σε 50 γρ χώματος έχουμε 6.000.000 αποικίες

Σε 1 γρ χώματος πόσο (X) έχουμε;

$$X = \frac{6.000.000}{50} = 120.000 \text{ αποικίες /γρ χώματος}$$

0.1ml HCl+KCL 0.2M

0,1ml νερού  
εναιωρήματος

0.1ml HCl+KCL 0.2M

0,1ml νερού  
εναιωρήματος

❖ (Διάλυμα Ringer 1:100, GVPC+rimaricin ,2 αποικίες)

2 αποικίες χ 1.000 αραιώση = 2.000 αποικίες/0,1 ml επίστρωσης

2.000 αποικίες χ 10 = 20.000 αποικίες/2 ml

$\frac{20.000 \text{ αποικίες}}{2 \text{ ml}}$  χ 200 ml επεξεργασίας = 2.000.000 αποικίες/200 ml

Σε 50 γρ χώματος έχουμε 2.000.000 αποικίες

Σε 1 γρ χώματος πόσο (X) έχουμε;

$$X = \frac{2.000.000}{50} = \mathbf{40.000 \text{ αποικίες /γρ χώματος}}$$

❖ (YAA Θ 1:1000, BCYE+MWY+rimaricin 1 αποικία)

1 αποικία χ 1.000 αραιώση = 1.000 αποικίες/0,1 ml επίστρωσης

1.000 αποικίες χ 10 = 10.000 αποικίες/1 ml

$\frac{1.0000 \text{ αποικίες}}{1 \text{ ml}}$  χ 200 ml επεξεργασίας = 2.000.000 αποικίες/200 ml

Σε 50 γρ χώματος έχουμε 2.000.000 αποικίες

Σε 1 γρ χώματος πόσο (X) έχουμε;

$$X = \frac{2.000.000}{50} = \mathbf{40.000 \text{ αποικίες /γρ χώματος}}$$

❖ (YAA Θ 1:1000, GVPC +rimaricin, 1 αποικία)

Το ίδιο με το προηγούμενο (**40.000 αποικίες /γρ χώματος**)

❖ (Διάλυμα Ringer Θ 1:1000, BCYE+MWY+rimaricin 2 αποικίες)

2 αποικίες χ 1.000 αραιώση = 2.000 αποικίες/0,1 ml επίστρωσης

2.000 αποικίες χ 10 = 20.000 αποικίες/1 ml

$\frac{20.000 \text{ αποικίες}}{1 \text{ ml}}$  χ 200 ml επεξεργασίας = 4.000.000 αποικίες/200 ml

Σε 50 γρ χώματος έχουμε 4.000.000 αποικίες

Σε 1 γρ χώματος πόσο (X) έχουμε;

$$X = \frac{4.000.000}{50} = 80.000 \text{ αποικίες /γρ χώματος}$$

❖ (Διάλυμα Ringer Θ 1:1000, GVPC+rimaricin 2 αποικίες)

Το ίδιο με το προηγούμενο (**40.000 αποικίες /γρ χώματος**)

Άρα, στο δείγμα 6 υπάρχουν **40.000 – 120.000 αποικίες /γρ χώματος**

### **ΔΕΙΓΜΑ 7**

Πρώτη Φορά

(ΥΑΑ Θ1:100, GVPC+rimaricin 1 αποικία)

Το ίδιο με τη δεύτερη φορά του δείγματος 4 (**4.000 αποικίες /γρ χώματος**)

Δεύτερη φορά

(ΥΑΑ 1:1000, BCYE+MWY+rimaricin 1 αποικία)

Το ίδιο με το δείγμα 6 στο ΥΑΑ με αραίωση 1:1000,σε θρεπτικό υλικό BCYE+MWY+rimaricin με 1 αποικία (**4.000 αποικίες /γρ χώματος**).

Άρα, στο δείγμα 7 υπάρχουν **4.000 αποικίες /γρ χώματος**

### **ΔΕΙΓΜΑ 8**

Δεν απομονώθηκαν αποικίες *Legionella* spp

### **ΔΕΙΓΜΑ 9**

Δεν απομονώθηκαν αποικίες *Legionella* spp.

### **ΔΕΙΓΜΑ 10**

Δεν απομονώθηκαν αποικίες *Legionella* spp.

### **ΔΕΙΓΜΑ 11**

Δεν απομονώθηκαν αποικίες *Legionella* spp.

#### **ΔΕΙΓΜΑ 12**

Δεν απομονώθηκαν αποικίες *Legionella* spp.

#### **ΔΕΙΓΜΑ 13**

Δεν απομονώθηκαν αποικίες *Legionella* spp.

#### **ΔΕΙΓΜΑ 14**

Δεν απομονώθηκαν αποικίες *Legionella* spp.

#### **ΔΕΙΓΜΑ 15**

Δεν απομονώθηκαν αποικίες *Legionella* spp.

#### **ΔΕΙΓΜΑ 16**

Δεν απομονώθηκαν αποικίες *Legionella* spp.

#### **ΔΕΙΓΜΑ 17**

(Διάλυμα Ringer Θ1:100, BCYE + MWY +rimaricin 1 αποικία)

Γίνονται ίδιες πράξεις με τη δεύτερη φορά του δείγματος 4, άρα στο δείγμα 17 υπάρχουν **4.000 αποικίες /γρ χώματος.**

#### **ΔΕΙΓΜΑ 18**

Δεν απομονώθηκαν αποικίες *Legionella* spp.

#### **ΔΕΙΓΜΑ 19**

Δεν απομονώθηκαν αποικίες *Legionella* spp.

#### **ΔΕΙΓΜΑ 20**

Δεν απομονώθηκαν αποικίες *Legionella* spp.

#### **ΔΕΙΓΜΑ 21**

Η πρώτη καλλιέργεια δεν έχει *Legionella* spp, η δεύτερη

#### **ΔΕΙΓΜΑ 22**

Η πρώτη καλλιέργεια δεν έχει *Legionella* spp, η δεύτερη

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ</b>			
<b>ΝΟΥΜΕΡΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</b>	<b>ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</b>	<b>ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΑΝΑ ΓΡΑΜΜΑΡΙΟ ΕΙΔΟΥΣ</b>
3	Ιδιοπαρασκευής	27,4 °C	4.000 <sup>Απ / γρ</sup>
4	Καστανόχωμα	24,2 °C	4.000-8.000 <sup>Απ / γρ</sup>
5	φυτόχωμα	26,7 °C	4.000 <sup>Απ / γρ</sup>
6	Καστανόχωμα	28,5 °C	40.000-120.000 <sup>Απ / γρ</sup>
7	Φυτόχωμα εξωτερικού χώρου	28 °C	4.000 <sup>Απ / γρ</sup>
17	Φυτόχωμα εσωτερικού χώρου	29,6 °C	4.000 <sup>Απ / γρ</sup>

ΠΙΝΑΚΑΣ 38. Συγκεντρωτικός πίνακας αριθμού αποικιών *Legionella spp* από φυτόχωμα

<b>ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ <i>LEGIONELLA</i> SPP ΑΠΟ ΧΩΜΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ HCL-KCL Ή ΘΕΡΜΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ Υ.Α.Α. Ή ΔΙΑΛΥΜΑ RINGER</b>				
<b>ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕ Ή ΧΩΡΙΣ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</b>	<b><i>LEGIONELLA</i> SPP</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ</b>	<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>
<b>Υ.Α.Α. Θ</b>	3	<i>Lp1</i>	1	<b>14</b>
	4 (1 <sup>η</sup> φορά)	<i>Lp 2-15</i>	2	
	4 (2 <sup>η</sup> φορά)	<i>Lp 2-15</i>	2	
	6 (2 <sup>η</sup> φορά)	<i>L Group 3</i>	2	
	7	<i>Lp 2-14</i>	1	
	7 (2 <sup>η</sup> φορά)	<i>L Group 3</i>	1	
	<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>			
<b>Ringer's Solution Θ</b>	6 (2 <sup>η</sup> φορά)	<i>L Group 3</i>	4	<b>7</b>
	17	<i>Lp 2-15</i>	1	
	<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>			
<b>Υ.Α.Α. (χρήση buffer HCl-KCl)</b>	5	<i>Lp 1</i>	1	<b>7</b>
	6 (2 <sup>η</sup> φορά)	<i>L Group 3</i>	3	
		<i>Lp 2-15</i>	1	
	<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>			
<b>Ringer's Solution (χρήση buffer HCl-KCl)</b>	6 (2 <sup>η</sup> φορά)	<i>L Group 3</i>	2	<b>2</b>
	<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>			

ΠΙΝΑΚΑΣ 39. Απομόνωση αποικιών *Legionella spp* από χώμα ανάλογα με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος HCL-KCL ή θερμικής επεξεργασίας και ανάλογα με τη χρήση Υ.Α.Α. ή διάλυμα Ringer

Από τον πίνακα 39 φαίνεται ότι οι αποικίες που απομονώνονται όταν χρησιμοποιείται Υ.Α.Α. βρέθηκαν να είναι περισσότερες από τις αποικίες που

αναπτύχθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα το Ringer's solution ανεξάρτητα από το αν μεσολαβεί θερμική επεξεργασία ή το ρυθμιστικό διάλυμα HCl-KCl (0,2M).

Επίσης, φαίνεται ότι οι αποικίες που απομονώνονται ανάλογα με τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος είναι περισσότερες στην πρώτη περίπτωση.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το είδος *Legionella* spp στο οποίο οφείλεται με μεγαλύτερο ποσοστό η νόσος των Λεγεωναρίων και πυρετός Πόντιακ είναι η *Legionella pneumophila* (>90%) και αμέσως μετά είναι η *Legionella longbeachae* <sup>(106)</sup>. Στην Αυστραλία το 30% των περιστατικών της νόσου των Λεγεωναρίων οφείλεται στη *Legionella longbeachae* <sup>(14)</sup>.

Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, από παλαιότερες έρευνες φαίνεται πως εκτός από την Αυστραλία, Ιαπωνία και την Αμερική, βακτήρια *Legionella* spp σε φυτόχωμα δεν έχουν απομονωθεί αλλού <sup>(8,14,20,104,107)</sup>. Όπως προκύπτει στο κεφάλαιο 3, πίνακας 3 η συγκεκριμένη προσπάθεια ανεύρεσης βακτηρίων Λεγεωνέλλας και στην Ευρώπη (Ηνωμένο Βασίλειο, Ελλάδα και Ελβετία), το 1990 είχε αποβεί άκαρπη. Ωστόσο, σε μία πρόσφατη έρευνα που έγινε στην Ολλανδία το 2007, απομονώθηκε *Legionella* spp σε φυτόχωμα της Ευρώπης <sup>(14)</sup>.

Στην Αυστραλία όλες οι κομπόστες χώματος από μεγάλους κατασκευαστές περιέχουν *Legionella pneumophila*, αποκλειστικά ορομάδας 2-14. Στην Ιαπωνία δεν απομονώθηκε *Legionella pneumophila* ορομάδας 1 από τα φυτοχώματά της <sup>(14,104)</sup>. Στα φυτοχώματα της Ευρώπης περιέχεται τύρφη σε μεγαλύτερο ποσοστό ενώ σε Αυστραλία, Ιαπωνία και Ηνωμένες Πολιτείες πριονίδι και φλούδες δέντρων <sup>(14)</sup>.

Στην Ελλάδα τα δεδομένα που αναγράφονται συνήθως πάνω στα εμπορικά φυτοχώματα είναι χωρίς λεπτομερή στοιχεία και ποσοστά για την περιεκτικότητα της σύστασης τους. Έτσι, το περιεχόμενό τους συνήθως αποτελείται από:

- Ανθρακικό Ασβέστιο
- Άργιλο
- Γόνιμο χώμα γης
- Ελαφρόπετρα (Pumice)
- Θρεπτικά συστατικά άμεσης δράσης βασισμένα σε οργανικές ουσίες
- Καστανόχωμα
- Κομπόστα (Compost)
- Μαύρη τύρφη
- Ξανθιά τύρφη
- Οργανικό λίπασμα
- Περλίτη
- Ρικόχωμα
- Τύρφη
- Φυλλόχωμα
- Φυσικό λίπασμα
- Χουμικά Οξέα (Humic Acids) και στοιχεία

❖ Επίσης, περιλαμβάνονται συνήθως και τα παρακάτω:

- pH
- Βαθμός αποσύνθεσης (Von Past)
- Ειδικό βάρος
- Ηλεκτρική Αγωγιμότητα
- Ιχνοστοιχεία
- Συνολική λίπανση
- Υγρασία
- Υδατοδιαπερατότητα
- Υδατοκατιόντα



Το βασικό είναι πως η χλωρίδα της Ελλάδας, πάνω στην οποία βασίζεται η κεντρική ύλη των φυτοχωμάτων που χρησιμοποιούνται, διαφέρει από την Αυστραλία, την Αμερική κλπ.

Με τον παρακάτω πίνακα, για τα φυτοχώματα από όπου απομονώθηκαν *Legionella* spp , αναφαίρεται από τι είναι φτιαγμένο το κάθε φυτόχωμα το οποίο βρέθηκε θετικό σε *Legionella* spp.

<b>ΕΙΔΟΣ - ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΑΝΑ ΓΡΑΜΜΑΡΙΟ ΕΙΔΟΥΣ</b>			
<b>ΝΟΥΜΕΡΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</b>	<b>ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</b>	<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ-</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΑΝΑ ΓΡΑΜΜΑΡΙΟ ΕΙΔΟΥΣ</b>
3	Ιδιοπαρασκευής	Άγνωστης σύνθεσης	4.000 <sup>Απ / γρ</sup>
4	Καστανόχωμα	Κοκκινόχωμα	4.000-8.000 <sup>Απ / γρ</sup>
		Κουμαρόχωμα	
		Κοπριά	
		Τύρφη	
		Σχινόχωμα	
		Περλίτης	
5	φυτόχωμα	Φυλλόχωμα	4.000 <sup>Απ / γρ</sup>
		Τύρφη	
		Περλίτης	
		Συνθετικό λίπασμα	
6	Καστανόχωμα	Κοκκινόχωμα	40.000-120.000 <sup>Απ / γρ</sup>
		Κουμαρόχωμα	
		Κοπριά	
		Τύρφη	
		Σχινόχωμα	
		Περλίτης	

7	Φυτόχωμα εξωτερικού χώρου	<b>ΔΕΝ ΑΝΑΓΡΑΦΕΤΑΙ ΣΤΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ</b>	4.000 <sup>Απ / γρ</sup>
17	Φυτόχωμα εσωτερικού χώρου	<b>ΔΕΝ ΑΝΑΓΡΑΦΕΤΑΙ ΣΤΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ</b>	4.000 <sup>Απ / γρ</sup>

ΠΙΝΑΚΑΣ 40. Είδος και περιεχόμενα (όπου υπάρχουν) ανά θετικό σε *Legionella spp* δείγμα και αριθμός αποικιών ανά γραμμάριο είδους

Ο αριθμός των αποικιών που απομονώθηκαν από τα θετικά στη *Legionella spp* φυτοχώματα της μελέτης μας είναι συγκρίσιμος με διεθνώς απαντώμενα όσον αφορά στην ευαισθησία της μεθόδου<sup>(32)</sup> αλλά και το εύρος απομόνωσης ( $10^3 \rightarrow 10^5$ )<sup>(101)</sup>.

Επίσης η διαφορά των περιεχομένων των φυτοχωμάτων μεταξύ Ελλάδας και Αυστραλίας μπορεί να συγκριθεί ανάμεσα στους πίνακες 40 και 41.

<b>Είκοσι ένα συστατικά για παρασκευή μειγμάτων χώματος κηπουρικής από 2 κατασκευαστές φυτοχωμάτων το 1990 στην Νότια Αυστραλία</b>			
Υλικό φυτοχωμάτων	Κατάσταση φυτοχώματος	Αριθμός παρτίδων χώματος που ελέγχθησαν	Αναλογία δειγμάτων με <i>Legionella spp</i>
Φλούδες πεύκου	Φρέσκο	2	0 / 4
	Κομποστοποιημένο	2	3 / 4
Πριονίδι πεύκου	Φρέσκο	3	3 / 10
	Κομποστοποιημένο	2	1 / 2
Ευκάλυπτος	Φρέσκο	3	0 / 3
	Κομποστοποιημένο	3	4 / 4
Εσωτερικά περιεχόμενα ξύλου	Κομποστοποιημένο	1	0 / 1
Τύρφη και τυρφόχωμα		2	0 / 2
Άμμος		2	0 / 5
Λίπασμα με ιχνοστοιχεία		1	0 / 1

ΠΙΝΑΚΑΣ 41. Είκοσι ένα συστατικά για παρασκευή μειγμάτων χώματος κηπουρικής από 2 κατασκευαστές φυτοχωμάτων το 1990 στην Νότια Αυστραλία (61)

Στην Αυστραλία, όπου σημειώνονται μεγάλα ποσοστά μολύνσεων από *Legionella longbeachae*, τα φυτοχώματα παρασκευάζονται κυρίως από χουμποποιημένα προϊόντα προς απόρριψη, όπως πριονίδι και φλούδες δέντρων, με μεθόδους προερχόμενες από τις Ηνωμένες Πολιτείες <sup>(61)</sup>. Στον πίνακα 41 υπάρχουν δεδομένα ανάλυσης συστατικών για παρασκευή μειγμάτων χώματος κηπουρικής σε σχέση με την ποσότητα που ελέγχθηκε και την αναλογία των θετικών αυτών δειγμάτων με *Legionella* spp.

Το 2001 δημοσιεύτηκε μία έρευνα απομόνωσης *Legionella longbeachae* και *Legionella* spp που έγινε σε 30 ιαπωνικά φυτοχώματα με αποτέλεσμα να βρεθούν 46 στελέχη Λεγεωνέλλας από 24 δείγματα εξ' αυτών. Από αυτά σε Λεγεωνέλλα δείγματα ήταν 13 κομποστοποιημένα προϊόντα ξύλου και 11 μείγματα φυτοχώματος (στα οποία υπήρχαν κομποστοποιημένα προϊόντα ξύλου, άμμος, ορυκτά λιπάσματα και κοπριά). Τα υπόλοιπα δείγματα φυτοχώματος στα οποία δεν απομονώθηκε *Legionella* spp ήταν 2 φυτοχώματα, 3 μείγματα φυτοχώματος με άμμο και 1 μείγμα πηλού για υδροπονική χρήση. Ο τρόπος απομόνωσης *Legionella* spp σε αυτήν την έρευνα, των ιαπωνικών φυτοχωμάτων, είναι παρόμοιος με τη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε στην έρευνα αυτής της διπλωματικής εργασίας (χρήση BCYE agar με συμπλήρωμα MWY και rimaricin). Συγκεκριμένα, απομονώθηκε *Legionella longbeachae* από 9 δείγματα. Στην έρευνα αυτής της διπλωματικής εργασίας η ομάδα ειδών Λεγεωνέλλας από όπου απομονώθηκαν οι περισσότερες αποικίες είναι η *Legionella Group 3*, με βάση τη δοκιμή Latex της OXOID. Ήδη έχει γίνει αναφορά στα είδη και στους ορότυπους Λεγεωνέλλας που περιέχει στο κεφάλαιο 7 στο 7.9.3. Αντίστοιχα, στην έρευνα της Ιαπωνίας το κυρίαρχο είδος ήταν η *Legionella bozemanii*, η

οποία και απομονώθηκε από 13 δείγματα και αμέσως μετά η *Legionella longbeachae* <sup>(33)</sup>. Στην ομάδα *Legionella Group 3*, περιέχεται και η *Legionella bozemanii* οροομάδων 1 και 2, το οποίο σημαίνει πως υπάρχει περίπτωση και σε αυτήν την διπλωματική εργασία να είναι ένα από τα είδη που απομονώθηκαν. Λόγω όμως μη ύπαρξης χρόνου τεχνικών μεθόδων και υλικών για την ταυτοποίηση όλων των ειδών Λεγεωνέλλας, μεμονωμένα, δεν ήταν δυνατά περαιτέρω συμπεράσματα.

Η διαφορά στη συχνότητα απομόνωσης της *Legionella longbeachae* μεταξύ Ιαπωνίας και Αυστραλίας ήταν η εξής: η απομόνωση της *Legionella longbeachae* στην πρώτη είναι 8,3% (2/24) επί των *Legionella* spp θετικών δειγμάτων και 58% (26/45) στην δεύτερη. Με βάση τα υπάρχοντα αντιδραστήρια δεν ήταν δυνατή η ταυτοποίηση των 7 διαφορετικών *Legionella* spp που περιέχονται στο Group 3 του Latex kit της OXOID. Έτσι δεν είναι δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων όσον αφορά τα είδη και τις οροομάδες της ομάδας αυτής (Group 3) και επομένως οι αναφορές που θα γίνουν θα έχουν γενικότερη μορφή. Στην έρευνα αυτής της διπλωματικής εργασίας μπορούμε να πούμε για το ποσοστό της *Legionella Group 3*, το οποίο είναι 33,33% (2/6) επί των *Legionella* spp θετικών δειγμάτων. Τα συστατικά του κομποστοποιημένου ξύλου από το οποίο αποτελούνται τα ιαπωνικά φυτοχώματα είναι ξύλα πλατύφυλλων δέντρων όπως δρύς, ιαπωνική βελανιδιά σε αντίθεση με το ξύλο πεύκου και ευκαλύπτου που χρησιμοποιούνται στην Αυστραλία. Είναι σημαντικό να αναφερθεί, σύμφωνα με τα ευρήματα από ορισμένους μελετητές, πως από τα δείγματα τα οποία αποτελούσαν από φυλλόχωμα, προϊόν το οποίο χρησιμοποιείται σε

φυτοχώματα που διακινείται στην Ελλάδα και γενικά στην Ευρώπη, δεν απομονώθηκε *Legionella* spp μέχρι πρόσφατα (2007) <sup>(33,104)</sup>.

Το Μάρτιο του 1989 έως και τον Μάιο του 1980, διεξήχθη μία έρευνα στην οποία ερευνήθηκαν φυτοχώματα και φυσικά χώματα από την Αυστραλία και από την Ευρώπη, έτσι ώστε να διερευνηθεί η παθογονικότητα της *legionellae* στο περιβάλλον. Τότε ήταν ήδη γνωστή η ύπαρξη και η μολυσματικότητα της *Legionella longbeachae* σε φυτόχωμα και γινόταν η προσπάθεια απομόνωσης και άλλων ειδών που πολλαπλασιάζονται και επιζούν σε χώμα. Ταυτόχρονα, γινόταν προσπάθεια για τη συγκέντρωση δεδομένων για την παρουσία *Legionella* spp σε φυτοχώματα κατά τις διάφορες εποχές <sup>(61)</sup>.

Ενώ στην έρευνα για την οποία μιλάμε έγινε απομόνωση *Legionella* spp στα 33 από τα 45 φυτοχώματα της Αυστραλίας (73%), πρέπει να αναφερθεί πως τα φυτοχώματα από 2 εταιρίες παρασκευής χώματος φάνηκε να περιέχουν *legionellae* μόνο κατά την περίοδο του χειμώνα και του φθινοπώρου, ενώ τα υπόλοιπα φυτοχώματα βρεθήκαν θετικά κατά την διάρκεια όλου του χρόνου <sup>(61)</sup>.

Ο χρόνος διεξαγωγής της έρευνάς μας ήταν καλοκαίρι και φθινόπωρο. Οι θερμοκρασίες των δειγμάτων καταγράφονται αναλυτικά στον πίνακα 9 αυτού του κεφαλαίου και είχαν φάσμα από 24,1° C έως 31,1° C. Το θερμοκρασιακό εύρος των δειγμάτων χώματος στα οποία απομονώθηκε *Legionella* ssp ήταν 24,2 ° C έως 29,6° C.

Στην έρευνα το 1990, που είχε συμπεριληφθεί και η Ελλάδα, στα δείγματα που ελέγχθηκαν δεν ταυτοποιήθηκε *Legionella* spp. Το ίδιο και σε Ηνωμένο Βασίλειο και σε Ελβετία, όπως ήδη έχει καταγραφεί. Τα δείγματα

αυτών των χωρών καλλιεργήθηκαν μόνο σε VPP θρεπτικό υλικό. Επιπλέον, πρέπει να αναφερθεί πως η επώαση σε αυτήν την έρευνα σε όλα τα δείγματα έγινε στους 35 +/- 1 °C, καθώς και ότι ο έλεγχος ξεκινούσε 24 ώρες μετά την καλλιέργεια για τα γρήγορα αναπτυσσόμενα βακτήρια και καθημερινά από την τρίτη μέχρι την έβδομη μέρα με τη χρήση στερεοσκοπίου <sup>(61)</sup>.

Σε αυτήν την έρευνα παρατηρήθηκε η προτίμηση ειδών Λεγεωνέλλας στα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν. Η *Legionella longbeachae* αναπτύσσεται και σε VPP και σε VAPP. Οι *Legionella bozemanni*, *Legionella macdadei* όπως και άλλα είδη που βρέθηκαν σε χώμα δεν αναπτύχθηκαν σε VAPP. Με την *aztreonam* ευνοήθηκε η ανάπτυξη διαφόρων βακτηρίων, όπως και Λεγεωνέλλας και η απομόνωση *Legionella pneumophila*, *Legionella longbeachae* και *Legionella dumofii*, εμποδίστηκαν όμως διάφορα άλλα είδη *Legionella* spp από το να αναπτυχθούν<sup>(61)</sup>.

Κατά τη μεθοδολογία απομόνωσης βακτηρίων Λεγεωνέλλας στην έρευνα αυτής της διπλωματικής εργασίας τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν διαφέρουν. Το BCYE μαζί με *rimaricin* και MWY, καθώς και το GVPC μαζί με *rimaricin*, είναι τα θρεπτικά υλικά στα οποία βασίστηκε αυτή η έρευνα. Και στα δύο υπήρξε ανάπτυξη *Legionella* spp.

Μία εκ των καινοτομιών που εφαρμόστηκαν στην παρούσα έρευνα ήταν η προσθήκη *rimaricin* στο κλασσικό υλικό GVPC και η επίτευξη απομόνωσης *Legionella* spp από χώμα επ' αυτού για πρώτη φορά διεθνώς, από όσο γνωρίζουμε, μετά από τη διερεύνηση της βιβλιογραφίας.

Επιπλέον, μία άλλη αλλαγή που έγινε στη μεθοδολογία απομόνωσης *Legionella* spp σε αυτήν τη διπλωματική εργασία είναι η διαφοροποίηση ποσότητας *rimaricin*. Ενώ στα αρχικά στάδια της μεθοδολογίας μας

χρησιμοποιήσαμε ίδιες ποσότητες, λόγω μεγάλης ανάπτυξης μυκήτων και βακτηρίων στα θρεπτικά υλικά, αυξήσαμε την ποσότητα από 1 γρ σε 1,25 γρ.

Επίσης η τεχνική που εφαρμόσαμε για πρώτη φορά, από όσο μας είναι γνωστό από την Διεθνή βιβλιογραφία, της θερμικής επεξεργασίας των δειγμάτων απεδείχθη ότι μπορεί να οδηγήσει στην απομόνωση της *Legionella* spp από το χώμα με επιτυχία. Μάλιστα δε από ότι φαίνεται οδήγησε στην απομόνωση περισσότερων στελεχών του βακτηρίου έναντι της χρήσης της τεχνικής οξίνισης (Πίνακας 39)

<b>ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΡΙΘΜΟΥ ΑΠΟΙΚΙΩΝ</b>				
<b><i>Legionella</i> spp</b>				
<b>ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ</b>	<b><i>Legionella</i> spp</b>			
	<b><i>Legionella pneumophila</i> οροομάδας 1</b>	<b><i>Legionella pneumophila</i> οροομάδας 2-15 ή 2-14</b>	<b><i>Legionella</i> Group 3</b>	<b><i>Legionella</i> Group 3</b>
<b>BCYE+MWY +rimaricin</b>	2	5	5	12
<b>GVPC+rimaricin</b>	0	2	7	9
<b>ΣΥΝΟΛΟ ΑΠΟΙΚΙΩΝ</b>	2	7	12	<b>21</b>

ΠΙΝΑΚΑΣ 42. Απομόνωση αριθμού αποικιών *Legionella* spp στα υλικά καλλιέργειας

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, εφόσον τα ευρήματα επιβεβαιωθούν και με περαιτέρω δείγματα και έρευνες, φαίνεται πως το θρεπτικό υλικό BCYE + MWY + rimaricin ευνοεί ελαφρώς την απομόνωση της *Legionella* spp έναντι του GVPC + rimaricin, καθώς το σύνολο των αποικιών στην πρώτη περίπτωση είναι 12 και 9 στη δεύτερη. Επίσης, από την πιλοτική μας μελέτη διαφαίνεται η πιθανή προτίμηση των ανάλογων ειδών και οροομάδων Λεγεωνέλλας στα διαφορετικά θρεπτικά υλικά. Ενώ η *Legionella pneumophila* οροομάδων 2-15 φαίνεται να προτιμά το BCYE+ MWY + rimaricin, η *Legionella* Group 3 το GVPC + rimaricin. Ένα σημαντικό εύρημα,

στην έρευνα μας είναι η απομόνωση *Legionella pneumophila* ορομάδας 1, εύρημα το οποίο από όσο γνωρίζουμε μέχρι σήμερα, με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, δεν έχει υπάρξει σε καμία άλλη έρευνα από χώμα στον ευρωπαϊκό χώρο.

Η σύγκριση, γίνεται σύγκριση μεταξύ της χρησιμοποίησης ρυθμιστικού διαλύματος, Υ.Α.Α. και διαλύματος Ringer's για την επεξεργασία των δειγμάτων (πίνακας 39 στο κεφάλαιο 8) φαίνεται να ευνοεί την απομόνωση της *Legionella* spp από το Υ.Α.Α. έναντι της χρήσης του διαλύματος Ringer's. Παράλληλα, όπως προκύπτει από τα πιλοτικά ευρήματά μας, η θερμική επεξεργασία των δειγμάτων, που επίσης για πρώτη φορά εφαρμόστηκε σε πειραματική εργασία από όσο μας είναι γνωστό από τη διεθνή βιβλιογραφία, φαίνεται να ευνοεί επίσης την απομόνωση της *Legionella* spp σε σχέση με τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος HCl-KCl (0,2M) και τούτο ίσως διότι η θερμική επεξεργασία φαίνεται να ασκεί πιο αποτελεσματική επίδραση στην υπόλοιπη μικροβιακή χλωρίδα του χώματος στα δείγματα που εξετάστηκαν, από ότι εκείνων που η επεξεργασία τους έγινε με το ρυθμιστικό διάλυμα (HCl-KCl 0,2M). Αντίθετα, τα ευρήματα του M. Koide στην Ιαπωνία όπως και της Αυστραλιακής έρευνας στηρίχθηκαν στη χρήση μόνο του HCl-KCl, ενώ στην έρευνα της Ολλανδίας των Den Boer J.W, Yzerman E. P. F, Jansen R, Bruin J. P, Verhoef L. P. B, Neve G και άλλων, το 2007, δεν αναφέρεται η μεθοδολογία απομόνωσης της *Legionella* spp από το χώμα<sup>(14,61,104)</sup>.

Στην Αυστραλία απομονώθηκε εκτός από *Legionella pneumophila* ορομάδας 1 και *Legionella longbeachae* ορομάδας 1 από φυτόχωμα, αλλά και από έναν αριθμό ασθενών που έπασχαν από πνευμονία<sup>(61,67)</sup>.



**ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΛΕΓΕΩΝΕΛΛΑΣ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΑ ΕΙΔΗ ΧΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΓΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΦΥΤΟΧΩΜΑΤΩΝ**

Ορολογική αντίδραση		Αριθμός αποικιών και πηγή δείγματος χώματος		
		Φυτοχώματα	Συστατικά φυτοχωμάτων	Φυσικά χώματα
Latex	<i>Legionella longbeachae</i> οροομάδας 1	26	1	1
	<i>Legionella cincinnatiensis</i>	0	0	0
	<i>Legionella anisa</i>	4	0	0
	<i>Legionella bozemanii</i> οροομάδας 1	8	3	0
	<i>Legionella micdadei</i>	3	0	0
	<i>Legionella pneumophila</i> οροομάδας 1-14	6	0	0
DFA	<i>Legionella bozemanii</i>	10	3	0
	<i>Legionella gormanii</i>	1	1	0
	<i>Legionella micdadei</i> 3	3	0	0
	<i>Legionella dumofii</i>	1	0	0
	<i>Legionella longbeachae</i> οροομάδων 1 & 2	31	1	1

ΠΙΝΑΚΑΣ 43. Πίνακας αριθμού αποικιών Λεγεωνέλλας που αναπτύχθηκαν από διάφορα είδη χώματος και συστατικά για Παρασκευή φυτοχωμάτων, το 1990 στην Αυστραλία <sup>(61)</sup>

Στον πίνακα 43 φαίνονται τα αποτελέσματα έρευνας που έγινε στην Αυστραλία το 1990 και στην οποία δεν απομονώθηκε *Legionella pneumophila* οροομάδας 1 <sup>(61)</sup>. Αντίθετα, σε έρευνα κατά το 1994 στην Νότια Αυστραλία έγινε απομόνωση της οροομάδας αυτής, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα <sup>(101)</sup>.

Αποικίες <i>Legionella</i> spp σε φυτοχώματα από μεγάλες εταιρίες παρασκευής φυτοχωμάτων στην Αυστραλία						
Είδη	<i>Legionellae</i> από φυτοχώματα των εταιριών					
	1	2	3	4	5	6
<i>Legionella pneumophila</i> οροομάδας 1	-*	-	-	+**	-	-
<i>Legionella pneumophila</i> οροομάδων 2-14	+	+	+	+	+	+

<i>Legionella bozemanii</i> οροομάδας 1	+	-	+	+	+	+
<i>Legionella longbeachae</i> οροομάδας 1	+	+	-	-	-	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Legionella quinlivanii</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Legionella santicrucis</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Legionella anisa</i> group ***	-	-	+	-	-	-
Μη ταυτοποιημένα είδη Λεγεωνέλλας	+	-	-	+	+	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 44. Πίνακας αποικιών *Legionella spp* που απομονώθηκαν από Φυτοχώματα 6 μεγάλων εταιριών παρασκευής φυτοχωμάτων <sup>(101)</sup>

\*: όχι ανιχνεύσιμο, \*\*: ανίχνευση *Legionella spp* από 1 μόνο, \*\*\*: περιλαμβάνει *L. bozemanii* οροομάδας 1

Στην ίδια έρευνα του 1994, έγινε απομόνωση *Legionella pneumophila* οροομάδας 1 από φυτοχώματα που παρασκεύαζαν 20 κηπουροί μικρής κλίμακας με θετικά δείγματα <sup>(101)</sup>. Κάτι που δείχνει πως αυτό το είδος και οροομάδα Λεγεωνέλλας είναι υπαρκτό σε φυτοχώματα, όπως και άλλα είδη και οροομάδες.

<b>ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΕΙΔΗ LEGIONELLA SPP ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΚΟΜΠΟΣΤΑ ΠΟΥ ΠΡΟΕΡΧΟΤΑΝ ΑΠΟ 20 ΚΗΠΟΥΡΟΥΣ ΜΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΧΩΜΑΤΟΣ ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ ΛΕΓΕΩΝΕΛΛΑ</b>	
<b>ΕΙΔΗ</b>	<b>Αριθμός (%) κηπουρών με θετικά δείγματα</b>
<i>Legionella pneumophila</i> οροομάδας 1	<b>1 (5)</b>
<i>Legionella pneumophila</i> οροομάδων 2-14	<b>11 (55)</b>
<i>Legionella bozemanii</i> οροομάδας 1	<b>3 (15)</b>
<i>Legionella longbeachae</i> οροομάδας 1	<b>3 (15)</b>

<b><i>Legionella anisa group</i> *</b>	<b>5 (25)</b>
<b>Μη ταυτοποιημένα στελέχη Λεγεωνέλλας</b>	<b>6 (30)</b>

ΠΙΝΑΚΑΣ 45. Στελέχη και είδη *Legionella spp* που απομονώθηκαν από κομπόστα που προερχόταν από 20 κηπουρούς με δείγματα χώματος θετικά για Λεγεωνέλλα<sup>(101)</sup>

\*:περιλαμβάνει *L. bozemanii* οροομάδας 1

Το Σεπτέμβριο του 2000, στο MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report) του CDC γίνεται αναφορά στη Νόσο των Λεγεωναρίων στην Καλιφόρνια, το Όρεγκον και την Ουάσινγκτον τους μήνες Μάιο με Ιούνιο του 2000. Στη συγκεκριμένη δημοσίευση αναφέρεται πως η *Legionella longbeachae* δεν είναι τόσο συχνή για την πρόκληση Νόσου των Λεγεωναρίων σε σχέση με τη *Legionella pneumophila* οροομάδας 1. Από το 1990 έως το 1997 αναφέρθηκαν στο CDC μόνο 37 περιστατικά Νόσου των Λεγεωναρίων από *Legionella longbeachae* επειδή υπάρχει αποτυχία εκτέλεσης των κατάλληλων διαγνωστικών δοκιμών σε περίπτωση πνευμονίας άγνωστης αιτιολογίας, στην καλλιέργεια Λεγεωνέλλας από κλινικά δείγματα και επειδή η Λεγεωνέλλωση δεν είναι δηλούμενο νόσημα σε όλες τις πολιτείες της Αμερικής<sup>(9)</sup>.

Στην ίδια δημοσίευση αναφέρεται πως δεν έχουν γίνει έρευνες για απομόνωση *Legionella spp* από το χώμα και πως σε αντίστοιχες έρευνες σε Αυστραλία, Ευρώπη, Ηνωμένο Βασίλειο και Ιαπωνία υπήρξαν τα εξής αποτελέσματα:

- Αυστραλία: 73% (33/45) φυτοχωμάτων βγήκαν θετικά για Λεγεωνέλλα:
  - 79% (26/33) *Legionella longbeachae*
- Ευρώπη και Ηνωμένο Βασίλειο: 100% αρνητικά τα δείγματα φυτοχωμάτων για *Legionella longbeachae*. Με την έρευνα όμως της

Ολλανδίας (η οποία δημοσιεύτηκε τον Ιανουάριο του 2007) και την οποία προαναφέραμε, ανακοινώθηκε η πρώτη απομόνωση *Legionella* spp (*Legionella longbeachae* και *Legionella pneumophila* οροομάδων 7-14) από φυτόχωμα, ενώ ταυτόχρονα με την έρευνα αυτή της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, επιβεβαιώνονται και εμπλουτίζονται με καινοφανή ευρήματα τα αποτελέσματα εύρεσης βακτηρίων Λεγεωνέλλας στα φυτοχώματα της Ευρώπης <sup>(9, 14, 68)</sup>

- Ιαπωνία: 31 διαφορετικά στελέχη Λεγεωνέλλας απομονώθηκαν από 17 δείγματα φυτοχωμάτων το 1998 (η πρώτη θετική καλλιέργεια *Legionella longbeachae* από ασθενή έγινε το 1996):

- 47% (8/17) *Legionella longbeachae* <sup>(108)</sup>

Η Αυστραλία είναι η ήπειρος με τις περισσότερες περιπτώσεις *Legionella longbeachae*, όπως ήδη έχει αναφερθεί (για παράδειγμα στην Νότια Αυστραλία, σε ένα και μόνο νοσοκομείο, το ICU στην Αδελαΐδα, το ποσοστό των ασθενών με Νόσο των Λεγεωναρίων λόγω *Legionella longbeachae* είναι άνω του 20% για μια περίοδο 14 χρόνων <sup>(109)</sup>). Αυτό δείχνει την αυξημένη επίπτωση πνευμονίας από *Legionella longbeachae* στην Νότια Αυστραλία <sup>(10)</sup>. Παρόλαυτα, η πρώτη φορά που έγινε περιγραφή της *Legionella longbeachae* οροομάδας 1, ήταν στην περιοχή Λόνγκ Μπιτς της Καλιφόρνια στην Αμερική, κάτι το οποίο από όλα τα παραπάνω δείχνει πως δεν είναι συχνό φαινόμενο <sup>(104)</sup>.

Μετά από την έκρηξη επιδημίας στη Νότια Αυστραλία, το 1988-1989, όπου έγινε η πρώτη απομόνωση της *Legionella longbeachae* σε αυτή την ήπειρο, παρατηρήθηκε πως είναι ένα βακτήριο αρκετά κοινό στο περιβάλλον της <sup>(8, 10, 110)</sup>. Έρευνες που ακολούθησαν δείχνουν πως το 73% των

φυτοχωμάτων της Αυστραλίας από 13 παρασκευαστές φυτοχωμάτων, περιέχουν *Legionella longbeachae* οροομάδας 1, αλλά ταυτόχρονα σε έρευνα 19 φυτοχωμάτων από Ελλάδα, Ελβετία και Ηνωμένο Βασίλειο δεν απομονώθηκε *Legionella longbeachae* <sup>(10)</sup>.

Στην Πολωνία έγινε μία έρευνα, η οποία δημοσιεύτηκε το 2002, για να σχετιστεί η Νόσος των Λεγεωναρίων με τους επαγγελματίες και ερασιτέχνες κηπουρούς με το νερό που χρησιμοποιούν σε όλες τις μορφές και κυρίως με το νερό που ψεκάζουν. Μαζί με τον έλεγχο αυτών των νερών έγινε και έρευνα σε φυτοχώματα. Από τα 28 δείγματα που ελέγχθησαν (14 από ένα θερμοκήπιο και άλλα 14 από τεχνητό υλικό σε ένα μοντέρνο θερμοκήπιο), δεν απομονώθηκε ούτε *Legionella pneumophila* οροομάδων 1 έως και 15, αλλά ούτε γενικότερα *Legionella* spp <sup>(20)</sup>. Στην έρευνά μας το ποσοστό απομόνωσης στα δείγματα που εξετάστηκαν ήταν 27,3 % (6/22) σημειώνοντας βέβαια ότι 3 εκ των θετικών δειγμάτων αν και όχι ίδιας σύστασης, προήρχοντο από τον ίδιο προμηθευτή. Απομονώθηκαν 21 στελέχη *Legionella* spp.

Από την έρευνα που δημοσιεύτηκε το 2001 με θέμα την κατανομή της *Legionella longbeachae* και άλλων *legionellae* στα ιαπωνικά φυτοχώματα βασίστηκε η μεθοδολογία απομόνωσης *Legionella* spp σε αυτήν την διπλωματική εργασία. Στον πίνακα 46, καταγράφονται τα θρεπτικά υλικά ανάπτυξης *Legionella* spp με τα αντιβιοτικά που περιέχουν, αλλά και ποιό είναι καλύτερο για την ανάπτυξη *Legionella longbeachae* κατά τον M. Koide, η οποία απομονώνεται συχνότερα από μείγματα χωμάτων, σύμφωνα με όλα τα προαναφερόμενα <sup>(104)</sup>.

Σε αυτήν τη διπλωματική εργασία για τη μεθοδολογία απομόνωσης *Legionella* spp τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν BCYE μαζί με MWY και pimaricin αλλά και GVPC με pimaricin επειδή η προσθήκη της pimaricin στο κοινά χρησιμοποιούμενο GVPC είναι μία ευχερής και σχετικώς οικονομική προσθήκη, η επινόνηση στην παρούσα πιλοτική μελέτη της προσθήκης της παραπάνω ουσίας στο υλικό αυτό και η απόδειξη δυνατότητας απομόνωσης *Legionella* spp από το χώμα επ' αυτού, συνιστά εύρημα ευρείας σημασίας και χρησιμότητας. Στην έρευνα για τα ιαπωνικά φυτοχώματα χρησιμοποιήθηκε μόνο BCYE μαζί με MWY και pimaricin, ενώ επιπρόσθετα χρησιμοποιήθηκε και η μέθοδος του εμπλουτισμού, κάτι το οποίο ο χρόνος εκτέλεσης αυτής της διπλωματικής εργασίας δεν το επέτρεπε

(104)

ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ								
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ	ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ							
	BMBA	MWY	BCYE	GVPC	BCYE+MWY +pimaricin*	GVPC+ pimaricin*	VPP	VAPP
Yeast Extract	11,5 g/L	10 g/L	10 g/L	10 g/L	10 g/L	10 g/L	10 g/L	10 g/L
Charcoal activated	1,5 g/L	2 g/L	2 g/L	2 g/L	2 g/L	2 g/L	2 g/L	2 g/L
Agar	17 g/L	13 g/L	13 g/L	13 g/L	13 g/L	13 g/L	13 g/L	13 g/L
Aces buffer	6 g/L	-	-	-	-	-	-	-
L-Cystein HCl	0,4 g/L	-	0,4 g/L	0,4 g/L	0,4 g/L	0,4 g/L	0,4 g/L	0,4 g/L
Ferric Pyrophosphate	0,25 g/L	-	0,25 g/L	0,25 g/L	0,25 g/L	0,25 g/L	0,25 g/L	0,25 g/L
Cefomandole	0,004 g/L	-	-	-	-	-	-	-
Anisomycine	0,01 g/L	80 mg/L	-	-	-	-	-	-
Polymixine B	80.000 IU/L	50.000 IU/L	-	39.600 IU/L	50.000 IU/L	39.600 IU/L	80.000 IU/L	80.000 IU/L
alpha-Ketoglutane	1 g/L	-	1 g/L	1 g/L	1 g/L	1 g/L	1 g/L	1 g/L
Glycine	-	3 g/L	-	1,5 g/L	3 g/L	1,5 g/L	-	-
Vancomycin	-	1 mg/L	-	0,5 mg/L	1 mg/L	0,5 mg/L	2 mg/L	2 mg/L
Bromothymol blue	-	10 mg/L	-	-	10 mg/L	-	-	-
Bromocresol purple	-	10 mg/L	-	-	10 mg/L	-	-	-

Buffer/Potassium hydroxide	-	-	10 g/L	10 g/L	10 g/L	10 g/L	10 g/L	10 g/L
Cycloheximide	-	-	-	40 mg/L	-	40 mg/L	-	-
Aztreonan	-	-	-	-	-	-	-	4 mg/L
Pimafucin	-	-	-	-	-	-	250 mg/L	250 mg/L
Pimaricin	-	-	-	-	1-1,25 g/L	1-1,25 g/L	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 46. Πίνακας σχέσεων διάφορων θρεπτικών υλικών (agar) με τα περιεχόμενά τους (61,103,104)

\*: Αυτά που χρησιμοποιήσαμε στην έρευνα της διπλωματικής εργασίας.

Στην Αυστραλία τα θρεπτικά υλικά που κυρίως χρησιμοποιούνται για την απομόνωση *Legionella* spp από φυτόχωμα είναι το VPP και το VAPP. Η σύνθεση του MWY μοιάζει με αυτήν του θρεπτικού υλικού VPP. Η μόνη διαφορά τους είναι η διαφορετική συγκέντρωση των αντιβιοτικών που περιέχουν <sup>(104)</sup>.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε σχέση με τη σύνθεση των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν σε άλλες μελέτες <sup>(104)</sup>, όπως φαίνεται από τον πίνακα 46, είναι δυνατή η απομόνωση *Legionella* spp (40.000-50.000 IU/L) που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μας. Το δικό μας υλικό εξάλλου περιείχε και γλυκίνη (Glycine) ώστε να παρέχει ήπια αναστολή της ανταγωνιστικής χλωρίδας επιπρόσθετα εκείνης που παρείχε η βανκομυκίνη (vancomycin) που χρησιμοποιήθηκε σε 2 συγκεντρώσεις 0,5 mg/L στο GVPC + rimaricin και στο 1 mg/L στο BCYE + MWY + rimaricin. Έτσι φαίνεται ότι και μικρότερες ποσότητες βανκομυκίνης σε συνδυασμό με άλλες ανασταλτικές ουσίες μπορούν να συνδράμουν σε καλή ανάκτηση *Legionella* spp από το χώμα εφόσον συνδιάζονται και με την παρουσία κυκλοεξαμιδης (Cycloheximide) όπως στην περίπτωση του GVPC.

Η παρουσία βρωμοκρεσόλης μωβ (Bromocresol purple) και βρωμοθυμόλης μπλε (Bromothymol blue) συνεισφέραν στον ελαφρώς

κυανοπράσινο χρωματισμό των αποικιών της Λεγεωνέλλας στο BCYE + MWY + rimaricin. Η άλλη διαφορά στην χρήση της natamycin-rimaricin από τις προηγούμενες μελέτες είναι ότι χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1-1,25 γρ/L και όχι σε 250 mg/L όπως στις άλλες μελέτες ώστε να ανασταλεί η ανάπτυξη μυκήτων από τη χλωρίδα του χώματος, ανάλογα με τη σχετική αρχική εικόνα κάθε δείγματος.

Όπως και στα αποτελέσματα της έρευνας αυτής της διπλωματικής, έτσι και στην έρευνα της Ιαπωνίας υπήρξαν προβλήματα λόγω της δυσκολίας απομόνωσης *legionellae* με την απευθείας μέθοδο. Αυτό πιθανώς επειδή πολλά βακτήρια χώματος ή μύκητες χώματος εμποδίζουν την αύξηση των βακτηρίων Λεγεωνέλλας στα θρεπτικά υλικά, παρά τη χρήση της rimaricin. Κατά συνέπεια, μπορεί να υπήρχαν και στις δύο έρευνες ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Ταυτόχρονα, δεν απομονώθηκαν *Legionellae* σε δείγματα φυλλοχωμάτων, παρόμοια με τα Ευρωπαϊκά<sup>(104)</sup>.

Παρά τα παραπάνω δεδομένα, τα φυτοχώματα τα οποία βρέθηκαν θετικά σε *Legionella* spp είναι Ελληνικής προέλευσης και όχι Ευρωπαϊκής γενικότερα ή οποιασδήποτε άλλης. Τα 4 εξ' αυτών παρά το ότι η προμήθειά τους έγινε από διαφορετικά σημεία τελικής πώλησης, προήρχοντο από συγκεκριμένη ελληνική εταιρία, 1 ήταν πάλι από διαφορετική ελληνική εταιρία.

Είναι προφανής η σημασία της ανεύρεσης στο χώμα κηπουρικής του παθογόνου βακτηρίου *Legionella* spp για τη Δημόσια Υγεία γενικότερα αλλά και για τις ειδικές επαγγελματικές ομάδες που η εργασία τους έχει σχέση με το χώμα, όπως κηπουροί, ανθοκόμοι, αγρότες, χωματουργικές εργασίες κτλ. Έτσι άλλωστε εφόσον τα ευρήματα επιβεβαιωθούν και ολοκληρωθεί η γνώση



για το ζήτημα αυτό και με άλλες έρευνες είναι ενδεχόμενο να εξηγηθεί ένα ποσοστό των νοσήσεων από *Legionella* spp στην κοινότητα που δεν ήταν μέχρι σήμερα δυνατόν να αποδοθούν σε έκθεση των ασθενών στο νερό, όπως άλλωστε επανειλημμένα έχει καταδειχθεί, σε μεμονωμένα περιστατικά, από τη διεθνή βιβλιογραφία <sup>(14,57,60,61,63,64,65,66,67,68,69,71,72,73,74,75,76,78,104)</sup> , με το πιο πρόσφατο τη συσχέτιση της πηγής μόλυνσης σε χώμα και άτομα που νόσησαν στην Ολλανδία <sup>(14)</sup>.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Για πρώτη φορά απομονώνεται στον Ελληνικό χώρο *Legionella* spp από πηγή του περιβάλλοντος πέραν του νερού (χώμα). Τα αποτελεσμάτα αυτής της διπλωματικής εργασίας αποδεικνύουν την ύπαρξη *Legionella* spp στα Ευρωπαϊκά φυτοχώματα, όπως ήδη έχει δημοσιευθεί από την Ολλανδία τον προηγούμενο έτος. Όμως, αυτό που αξίζει να υπογραμμισθεί είναι η πρώτη φορά απομόνωση *Legionella pneumophila* οροομάδας 1, η οποία δεν είχε απομονωθεί μέχρι σήμερα στην Ευρώπη.

Επιπλέον, αξίζει να αναφερθούν τα εξής:

- Το θρεπτικό υλικό στο οποίο έγιναν οι περισσότερες απομονώσεις είναι το BCYE με MWY και rimaricin
- Η ομάδα ειδών (*Legionella* Group 3): *Legionella bozemanii* οροομάδες 1 και 2, *Legionella dumoffii*, *Legionella gormanii*, *Legionella jordanis*, *Legionella micdadei*, *Legionella anisa*, απομονώθηκε τις περισσότερες φορές (12/21 αποικίες)
- Από τα 22 δείγματα που ελέγχθησαν στα 6 μόνο απομονώθηκε *Legionella* spp.

Σε αυτήν την πιλοτική έρευνα χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά με επιτυχία ως υλικό καλλιέργειας το GVPC, από όσο μας είναι γνωστό στη διεθνή βιβλιογραφία, για την απομόνωση *Legionella* spp από χώμα, με την επιπλέον δική μας προσθήκη rimaricin.

Επίσης, επινοήθηκε η τεχνική της τεχνητής μόλυνσης άλλων τμημάτων των ίδιων δειγμάτων φυτοχώματος για καθοδήγηση προς την πιθανή μορφολογία αποικιών που δεν είχαν απομονωθεί ποτέ πριν και ήταν επομένως άγνωστες σε εμάς.

Παράλληλα, η τεχνική που εφαρμόσαμε για πρώτη φορά, από όσο μας είναι γνωστό από την Διεθνή βιβλιογραφία, της θερμικής επεξεργασίας των δειγμάτων αποδείχθη ότι μπορεί να οδηγήσει στην απομόνωση της *Legionella* spp από το χώμα με επιτυχία. Μάλιστα δε από ότι φαίνεται οδήγησε στην απομόνωση περισσότερων στελεχών του βακτηρίου έναντι της χρήσης της τεχνικής οξίνισης

Τέλος, αποδείχθηκε άλλη μία πηγή πιθανής μόλυνσης τόσο για το σύνολο του πληθυσμού (όσοι ασχολούνται με εργασίες κηπουρικής), όσο και με ειδικές επαγγελματικές κατηγορίες του πληθυσμού όπως οι αγρότες, οι εργαζόμενοι με χωματοургικές εργασίες κ.α. για πρόκληση νόσων με αίτιο την *Legionella* spp στη χώρα μας, αλλά και γενικότερα στην Ευρωπαϊκή Ήπειρο.

Επομένως, αναδεικνύεται η σημαντική πιθανή σημασία των ευρημάτων αυτής της πιλοτικής έρευνας για τη Δημόσια Υγεία για τις περιπτώσεις εκείνες της νόσου των Λεγεωναρίων από την κοινότητα που δεν συνδέονται επιδημιολογικά με έκθεση σε νερό.

## ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Με το πέρας αυτής της διπλωματικής, επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη *Legionella* spp στα φυτοχώματα στο νομό Αττικής, στην Ελλάδα. Μετά την Αμερική στην οποία έγινε για πρώτη φορά απομόνωση από φυτόχωμα, την Αυστραλία και την Ιαπωνία έγινε το 207 η πρώτη απομόνωση στην Ολλανδία *Legionella* spp από φυτόχωμα και τώρα και στην Ελλάδα (2008).

Η μεθοδολογία απομόνωσης της *Legionella* spp από φυτόχωμα που χρησιμοποιήθηκε σε αυτήν την διπλωματική είναι βασισμένη σε μία έρευνα Ιαπώνων επιστημόνων με αρκετές τροποποιήσεις. Υπήρξε δυσκολία στην απομόνωση των βακτηρίων Λεγεωνέλλας, λόγω διαφόρων προβλημάτων, όμως τα θετικά αποτελέσματα και κυρίως η απομόνωση στην Ελλάδα *Legionella pneumophila* οροομάδας 1 για πρώτη φορά στον Ευρωπαϊκό χώρο αναδεικνύουν άλλη μία πιθανή πηγή μόλυνσης για τη Νόσο των Λεγεωναρίων με βαρύτητα που θα πρέπει να σταθμιστεί με επιπλέον μελέτες για τη Δημόσια Υγεία.

Θα πρέπει να ληφθούν πλέον τα κατάλληλα μέτρα προφύλαξης των επαγγελματιών και μη κηπουρών με πρώτο την επαρκή ενημέρωση και πληροφόρηση. Είναι σημαντικό όλοι όσοι ασχολούνται με φυτοχώματα, με κηπουρική (που αφορά από λουλούδια έως λαχανικά) να γίνουν γνώστες του θέματος και της να υποδειχθούν πιθανά μέτρα πρόληψης του ενδεχόμενου έκθεσης στη *Legionella* spp από χώμα.

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Η Λεγεωνέλλωση οφείλεται σε ένα Gram (-) βακτήριο το οποίο μέχρι σήμερα ανευρίσκεται κυρίως στο νερό και θεωρείται μέρος της φυσιολογικής μικροβιολογική χλωρίδα του. Υπάρχουν σχετικά λίγες αναφορές για απομόνωση του από άλλες πηγές του περιβάλλοντος.

**ΣΚΟΠΟΣ:** Ο βασικός σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η απομόνωση *Legionella* spp (αίτιο της νόσου των Λεγεωναρίων και του πυρετού Πόντιακ) από φυτοχώματα έτοιμα προς χρήση ή/και από ιδιοπαρασκευή ιδιοκτητών ανθοπωλείων, φυτωρίων και θερμοκηπίων, στο Νομό Αττικής.

**ΥΛΙΚΟ Κ' ΜΕΘΟΔΟΣ:** Από κάθε δείγμα χώματος, κάτω από άσηπτες συνθήκες, λαμβάνονταν 50γρ χώματος τα οποία ετίθεντο σε άσηπτο περιέκτη με 200ml Υ.Α.Α., στη συνέχεια άλλα 50γρ ετίθεντο σε άλλο άσηπτο περιέκτη που περιείχε 200ml διαλύματος Ringer 1/4. Κατόπιν γινόταν ανάδευση των περιεκτών για 2 λεπτά και αφήνονταν να ηρεμήσουν για τριάντα λεπτά. Τόσο από την πρώτη φιάλη (Υ.Α.Α.), όσο και από τη δεύτερη (διάλυμα Ringer's) λαμβάνονταν 2ml και τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο στους 50°C για μισή ώρα, ενώ ακόμα από κάθε μία από τις φιάλες σε άλλα 2ml προστίθεντο 2ml 0,2M HCL-KCl. Στη συνέχεια γίνονταν οι ακόλουθες αραιώσεις, τόσο από τα φιαλίδια με τη θερμική επεξεργασία υδατόλουτρου, όσο και από τα φιαλίδια με το ρυθμιστικό διάλυμα: 1:10, 1:100 και 1:1000. Από κάθε αραιώση χρησιμοποιούνταν για ενοφθαλμισμό 0,1ml από τις αραιώσεις από το υδατόλουτρο και 0,2ml από τα φιαλίδια με την επεξεργασία της οξίνισης. Κάθε αραιώση χρησιμοποιείτο για ενοφθαλμισμό, τόσο σε BCYE άγαρ με MWY και rimaricin, όσο και σε GVPC άγαρ με rimaricin. Η επώαση και στις 2 περιπτώσεις γίνονταν στους 37°C και ο έλεγχος των τριβλύων άρχιζε από την 4<sup>η</sup> ημέρα και διαρκούσε τουλάχιστον 10 ημέρες. Για την υιοθέτηση της τελικής μεθοδολογίας έγιναν πειράματα διαφοροποιώντας τις αραιώσεις και παράλληλα με τεχνητές μολύνσεις διαφορετικών τμημάτων από τα διάφορα δείγματα φυτοχώματος, δεδομένου ότι δεν υπήρχε κανένας άλλος τρόπος για να γίνουν συγκρίσεις της πιθανής μορφολογίας των αποικιών.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ:** Θετικά σε *Legionella* spp βρέθηκε το 27,3% (6/22) των δειγμάτων. Απομονώθηκαν 4.000 cfu/γρ φυτοχώματος στο δείγμα 3 και 4.000

cfu/γρ φυτοχώματος στο δείγμα 5, με *Legionella pneumophila* οροομάδας 1, 4.000-8.000 cfu/γρ φυτοχώματος στο δείγμα 4 με *Legionella pneumophila* οροομάδων 2-15, 40.000-120.000 cfu/γρ φυτοχώματος στο δείγμα 6 με *Legionella pneumophila* οροομάδων 2-15 και *Legionella* Group 3, 4.000 cfu/γρ φυτοχώματος στο δείγμα 7 με *Legionella pneumophila* οροομάδων 2-14 και *Legionella* Group 3 και τέλος 4.000 cfu/γρ φυτοχώματος στο δείγμα 17 με *Legionella pneumophila* οροομάδων 2-15.

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:** Από όσο μας είναι γνωστό από την Ελληνική και Διεθνή βιβλιογραφία:

1. Για πρώτη φορά απομονώνεται στον Ελληνικό χώρο *Legionella* spp από πηγή του περιβάλλοντος πέραν του νερού (χώμα).

2. Για πρώτη φορά στην Ευρώπη απομονώνεται *Legionella pneumophila* οροομάδας 1.

3. Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά με επιτυχία ως υλικό καλλιέργειας το GVPC στη διεθνή βιβλιογραφία για την απομόνωση *Legionella* spp από χώμα με δική μας προσθήκη rimaricin.

4. Επίσης η τεχνική που εφαρμόσαμε για πρώτη φορά, από όσο μας είναι γνωστό από την Διεθνή βιβλιογραφία, της θερμικής επεξεργασίας των δειγμάτων απεδείχθη ότι μπορεί να οδηγήσει στην απομόνωση της *Legionella* spp από το χώμα με επιτυχία. Μάλιστα δε από ότι φαίνεται οδήγησε στην απομόνωση περισσότερων στελεχών του βακτηρίου έναντι της χρήσης της τεχνικής οξίνισης.

5. Επινοήθηκε η τεχνική της τεχνητής μόλυνσης άλλων τμημάτων των ίδιων δειγμάτων φυτοχώματος για καθοδήγηση προς την πιθανή μορφολογία αποικιών που δεν είχαν απομονωθεί ποτέ πριν και ήταν επομένως άγνωστες σε εμάς.

6. Φαίνεται ότι το υλικό που μας έδωσε τις περισσότερες απομονώσεις συνολικά ήταν το BCYE+MWY+rimaricin.

7. Η ομάδα ειδών που συμπεριλαμβάνονται στο Group 3 ( κατά Latex OXOID): *Legionella bozemanii* οροομάδες 1 και 2, *Legionella dumoffii*, *Legionella gormanii*, *Legionella jordanis*, *Legionella micdadei*, *Legionella anisa*, απομονώθηκε τις περισσότερες φορές.

8. Αποδείχθηκε άλλη μία πηγή πιθανής μόλυνσης τόσο για το σύνολο του πληθυσμού (όσοι ασχολούνται με εργασίες κηπουρικής), όσο και με

ειδικές επαγγελματικές κατηγορίες του πληθυσμού όπως οι αγρότες, οι εργαζόμενοι με χωματουργικές εργασίες κ.α. για πρόκληση νόσων με αίτιο την *Legionella* spp στη χώρα μας, αλλά και γενικότερα στην Ευρωπαϊκή Ήπειρο.

Επομένως, αναδεικνύεται η σημαντική πιθανή σημασία των ευρημάτων αυτής της πιλοτικής έρευνας για τη Δημόσια Υγεία για τις περιπτώσεις εκείνες της νόσου των Λεγεωναρίων από την κοινότητα που δεν συνδέονται επιδημιολογικά με έκθεση σε νερό, αλλά πιθανότατα με άλλες όπως π.χ. το φυτόχωμα.

## **ABSTRACT**

Legionella species are Gram-negative rods and until these days it is considered to be natural microbiotic water flora. There is little information for its isolation from other environments.

**AIM:** The main purpose of this thesis is the detection and the isolation of *Legionella* spp (cause of the Legionellosis and the Pontiac Fever) from potting soil, bought or prepared by owners of flower shops, gardening materials selling facilities and green houses, at Attiki.

**MATERIALS and METHODS:** Twenty two samples were collected. A suspension of each sample was made in Sterile Deionised Water and in 1/4<sup>th</sup> Ringer's Solution. A portion of both suspensions was acidified and 0,2ml of each one was plated on a series of media (GVPC agar with pimaricin, BCYE $\alpha$  agar containing wadowsky yee (MWY) supplement and pimaricin) [direct method]. Another second portion from each one of the two suspensions was heat treated and 0,1ml was plated onto the same media. Cultures were examined after the 4<sup>th</sup> day at 37°C and for a total of 10 days.

### **RESULTS:**

- A total of 21 strains of *legionellae* were isolated from 6 of the 22 samples [peats, potting soils (with volcanic rocks, grain of pumice, sand clay, perlite, carbonate calcium, compost, organic matter, synthetic compost), peatmoss, red potting soil etc].
- The most predominant species (12/21) of *legionellae* in potting soils was Group3 (by Latex OXOID: *Legionella bozemanii* serogroups 1 and 2, *Legionella dumoffii*, *Legionella gormanii*, *Legionella jordanis*, *Legionella micdadei* and *Legionella anisa*) wich were isolated from 2 samples.
- *Legionella anisa* (1/12) was identified in one sample.
- *Legionella pneumopila* serogroups 2-15 (7/21) were isolated from 4 samples.
- *Legionella pneumopila* serogroup 1 (2/21) was isolated from 2 samples.
- Bacterial load range was between 4.000 cfu- 120.000 cfu/gr of potting soil.
- To our knowledge, GVPC supplemented by us with pimaricin was successfully used for the first time worldwide to isolate *Legionella* spp.



- BCYE $\alpha$  agar + MWY + pimaricin seems to prevail in isolating *Legionella* spp from soil.
- To our knowledge from the international references, heat treatment of the soil samples was for the first time successfully applied by us to isolate *Legionella* spp. Not only but according to our preliminary findings, it looks like if this was more effective in isolating *Legionella* spp from potting soils as compared with the acidified portions of the same samples (14/7) respectively.

**DISCUSSION:** Compared with findings in potting soils in Australia (60-73%), Japan (91,6%) the Greek potting soils had 27,3% isolation rate.

**CONCLUSIONS:** To our knowledge, this is the first time ever *Legionella* spp to be isolated in Greece and the second in Europe potting soils.

It is also the first time ever *Legionella pneumophila* serogroup 1 to be isolated from soil in Europe.

This trial has successfully used GVPC supplemented by us with pimaricin for the first time ever worldwide to isolate *Legionella* spp.

These findings are encouraging for more scientific work to be carried on as they support the assumption that potting soils can be another source of infection for the community acquired legionellosis with no previous water exposure, thus being of special importance for Public Health preventive and control measures to be decided for implementation.

From our knowledge from the international references, heat treatment of the isolation samples was for the first time ever applied to isolate *Legionella* spp even more successfully from thw acidification of the same sample.

To our knowledge, GVPC supplemented by us with pimaricin was successfully used for the first time worldwide to isolate *Legionella* spp.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. [www.rsc.org/Membership?Networking/InterestGroups/WaterScience?LegionellaConference2006.asp](http://www.rsc.org/Membership?Networking/InterestGroups/WaterScience?LegionellaConference2006.asp)
2. Πανουργιάς Ε, Ανίχνευση *Legionella* spp σε κολυμβητικές δεξαμενές & εγκαταστάσεις κολυμβητηρίων Νομού Αττικής & εκτίμηση της Υγειονομικής τους κατάστασης, Αθήνα, Διπλωματική Εργασία ΕΣΔΥ, 2004: 1-43
3. Brenner D. J. et al, Ten species of *Legionella*, *Int. J. Systematic Bacteriology*, 1985, 35: 50-51
4. Bassetti S, Widmer An, *Legionella* Resources on the World Wide Web. *CID* 2002 (34): 1633-1640
5. [http://www.q-net.net.au/~legion/Legionnaires\\_Disease\\_Worlds\\_First\\_Outbreak.htm](http://www.q-net.net.au/~legion/Legionnaires_Disease_Worlds_First_Outbreak.htm)
6. <http://www.ajph.org/cgi/reprint/77/5/568.pdf>
7. <http://aje.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/107/2/149>
8. Steele T. W, Lanser J, Sangster N, Isolation of *Legionella longbeachae* Serogroup 1 from potting mixes. *Applied and Environmental Microbiology* 1990, 56 (1): 49-53
9. [www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm49343a1.htm](http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm49343a1.htm)
10. Grove D. I, Lawson P. J, Burgess J. S, Moran J. L, O'Fathartaigh M. S, An Outbreak of *Legionella longbeachae* infection in an intensive care unit? . *Journal of Hospital Infection* 2002, 52: 250-258
11. [www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=98643](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=98643)

12. Bibb W. F, Sorg R.J, Thomason B. M, Hicklin M. D, Steigerwalt, A. G, Srenner D. J. et al, Recognition of a second serogroup of *Legionella longbeachae* , J. Clin. Microbiol. 14:674-677
13. Lim, I. N, Sangester N, Reid D. P, Lauser J. A, *Legionella logbeachae* pneumonia: report of two cases. Med J. Aust. 150: 599-601
14. Den Boer J.W, Yzerman E. P. F, Jansen R, Bruin J. P, Verhoef L. P. B, Neve G et al, Legionnaires' disease and gardening. Clinical Microbiology and Infection 2007, 13 (1): 88-90
15. [www.Legionella.org/general\\_info.htm](http://www.Legionella.org/general_info.htm)
16. Orrison L. H, Cherry W. B, Fliermans C. B, Dees S. B, McDougal L. K, Dodd D. J, Characteristics of Environmental Isolates of Legionella pneumophila. Applied and Environmental Microbiology 1981, 42 (1): 109-115
17. [www.qedbio.com/pdf/VirionSerion%20Page/Legionella-E/pdf](http://www.qedbio.com/pdf/VirionSerion%20Page/Legionella-E/pdf)
18. Alli O. A. T, Zink S, Von Lackum N. K, Abu-Kwaik Y, Comparative assessment of virulence traits in Legionella spp. Microbiology 2003, 149: 631-641
19. Wallis L, Robinson P, Soil as a source of Legionella pneumophila serogroup 1 (Lp1). Aust N J Public Health 2005, 29 (6):518-520
20. Stojek N. M, Dutkiewicz L, Legionella in sprinkling water as a potencial occupational risk factor for gardeners, Ann Agric Environ Med 2002, 9: 261-264
21. [www.daikin.gr/faq/items/legionella.jsp](http://www.daikin.gr/faq/items/legionella.jsp)
22. [www.Bionewsonline.com/8/7/leo\\_a\\_calvo-bado\\_2003\\_533.htm](http://www.Bionewsonline.com/8/7/leo_a_calvo-bado_2003_533.htm)
23. [www.Legionella.org/general\\_info.htm](http://www.Legionella.org/general_info.htm)

24. World Health Organization (WHO), Guidelines for drinking Water Quality. Addendum: Microbiological Ageus in Drinkig Water, Legionella. 2<sup>nd</sup> edition, 2002.
25. Αλεξίου-Δανιήλ Στέλλα, Legionellaceae, Μία νέα οικογένεια μικροβίων, Θεσσαλονίκη, 1990.
26. Bartam J, Chartier Y, V Lee J, Pond K, Surman-Lee S, Legionella and the prevention of legionellosis, WHO, 2007: 175-193
27. Σκοτεινιώτης Ε, Legionella spp και δημόσια υγεία, Αθήνα, Διπλωματική Εργασία ΕΣΔΥ, 2003:1-75
28. [en.wikipedia.org/wiki/Legionella](http://en.wikipedia.org/wiki/Legionella)
29. Harrison T. G, Taylor G, A laboratory manual for Legionella, Chichester, John Wiley and Sons Ltd, 1988, 45-56, 103-112
30. Orrison. Orrison L. H. et al, *Legionella oakridgensis*:unusual new species isolated from cooling tower water, Applied and Microbiology,1983,45:536-545
31. United States Environmental Protection Agency (EPA), Office of Science and Technology, Office of Water, Legionella: Human Health Criteria Document, Washington, November, 1999.
32. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
33. [www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=11810588&dopt=AbstractPlus](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11810588&dopt=AbstractPlus)
34. [www.promedmail.org](http://www.promedmail.org)
35. Barker J, Farrell I.D, Hutchison J. G, Factors affecting growth of *Legionella pneumophila* in liquid media, Journal of Medical Microbiology,1986, 22:97-100

36. Moss C. W. et al, Cellular fatty acid composition of isolates from Legionnaire's disease, *Journal of Clinical Microbiology*, 1977,6:140-259
37. Lambert M. A, Moss C. W, Cellular fatty acid compositions and isoprenoid quinone contents of 23 *Legionella* species, *Journal of Clinical Microbiology*, 1989,27:465-473
38. Benson R. F, Fields B. F, Classification of the genus *Legionella*, *Seminars in Respiratory Infections*, 1998, 13:90-99
39. Yu V. L, *Legionella pneumophila* (Legionnaire's isolation). In: Mandell J. L, Bennett J. E, Dolin R, Principles and practice of infectious diseases, Philadelphia Churchill Livingstone, 2000, 2424-2435
40. Dieterle R. R, Methods for the demonstration of *Spirochaeta pallida* in single microscopic sections. *Archives of Neurology and Psychiatry*, 1927, 18:73-80
41. Asare R, Santic M, Gobin I, Doric M, Suttles J, Graham J. E, et al, Genetic susceptibility and caspase activation in mouse and human macrophages are distinct for *Legionella longbeachae* and *L. pneumophila*, *Infection and Immunity*, 2007, 75 (4): 1933-1945
42. [www.dhhs.tas.gov.au/agency/pro/legionella/documents/211\\_Legionella\\_Discussion\\_Paper\\_jul05\\_&%20\\_refaug\\_05.pdf](http://www.dhhs.tas.gov.au/agency/pro/legionella/documents/211_Legionella_Discussion_Paper_jul05_&%20_refaug_05.pdf)
43. [en.wikipedia.org/wiki/Legionella\\_longbeachae](http://en.wikipedia.org/wiki/Legionella_longbeachae)
44. [www.docep.wa.gov.au/WorkSafe/PDF/Codes\\_of\\_Practice/Code\\_Legionnaires.pdf](http://www.docep.wa.gov.au/WorkSafe/PDF/Codes_of_Practice/Code_Legionnaires.pdf)
45. Hart I. Et al, Evaluation of the Oxoid dryspot *Legionella* range. In: Proceedings of the 5<sup>th</sup> international conference on *Legionella*, Ulm, Germany, Washington DC, ASM Press, 2000:44.

46. Wilkinson I. J. et al, Problems associated with identification of Legionella species from the environment and isolation of six possible new species, Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56:796-802
47. [www.health.wa.gov.au/press/view\\_press.cfm?id=548](http://www.health.wa.gov.au/press/view_press.cfm?id=548)
48. [www.global-garden.com.au/burnley/may99dte.htm](http://www.global-garden.com.au/burnley/may99dte.htm)
49. Κουρέα-Κρεμαστινού Τ, Χατζηχριστοδούλου Χ, Οδηγίες για την πρόληψη της νόσου των Λεγεωναρίων. 1<sup>η</sup> έκδοση. Αθήνα, Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, 2004:18-35
50. Anonymous, Legionellosis and Gardening Products. Medical Officer of Health Environmental Health Advice 2004, 6 (4):1
51. [www.health.vic.gov.au/ideas/diseases/leg\\_facts](http://www.health.vic.gov.au/ideas/diseases/leg_facts)
52. [http://www.health.wa.gov.au/healthv/summer97\\_98/974-4.htm](http://www.health.wa.gov.au/healthv/summer97_98/974-4.htm)
53. Barlett J. G. et al, Community – acquired pneumonia in adults: guidelines for management. The infectious diseases society of America, Clinical Infectious Diseases, 1998, 26:811-838.
54. Tartakovsky I. S, Legionnaire’s Disease: results of 25 years of studying infections, problems and perspectives of research, *Vetnik Rosiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*, Moskva, 2001, 11:11-14
55. [www.pneumologist.gr/pages/Greek/articlespn/legionella.html](http://www.pneumologist.gr/pages/Greek/articlespn/legionella.html)
45. Edelstein P. H, Laboratory diagnosis of infections caused by legionellae. European Journal of Clinical Microbiology, 1987, 6:4-10
50. Anonymous, Legionellosis and Gardening Products. Medical Officer of Health Environmental Health Advice 2004, 6 (4):1

58. Κατσιαφλάκα Α, Πρόληψη και έλεγχος της Λεγεωνέλλωσης κατά τη διάρκεια των Ολυμπιακών Αγώνων του 2004, Αθήνα, Διπλωματική Εργασία ΕΣΔΥ, 2004: 1-60
59. [www.q-net.net.au/~legion/Legionnaires\\_Disease\\_Worlds\\_First\\_Outbreak.htm](http://www.q-net.net.au/~legion/Legionnaires_Disease_Worlds_First_Outbreak.htm)
60. Αλεξίου. Αλεξίου-Δανιήλ Στ.& συν, Απομόνωση *Legionella pneumophila* από δίκτυο ύδρευσης ξενοδοχείου, Δελτ. Ελλην. Μικροβιολ. Εταιρ, 1987, 32: 217-223
61. [www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184887&blobtype=pdf](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184887&blobtype=pdf)
62. Friedman , Pitalny K, Barbaree J, Faur Y, McKinney R, Pontiac Fever Outbreak Associated with a Cooling Tower. *AJPH* 1987, 77 (5): 568-572
63. Doyle R. B, Cianciotto N. P, Banvi S, Manning P. A, Heuzenroeder W, Comparison of Virulence of *Legionella longbeachae* strains in guinea pigs and U937 macrophage-like cells, *Infection and Immunity*, 2001, 69 (9): 5335-5344
64. Lanser J. A, Adams M, Doyle R, Sangster N, Steele T. W, Genetic relatedness of *Legionella longbeachae* isolates from human and environmental sources in Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 1990, 56 (9): 2784-2790
65. [en.wikipedia.org/wiki/Legionellosis](http://en.wikipedia.org/wiki/Legionellosis)
66. [www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184843](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184843)
67. Steele T, Sangster W. N, Lanser J. A, Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup 1 from potting mixes. *Appl. Environ. Microbiol*, 1990, 56: 49-53
68. Steele T. W, Moore C. V, Sangster N, Distribution of *Legionella longbeachae* Serogroup 1 and other *Legionellae* in Potting Soil in

- Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 1990, 56 (10): 2984-2988
69. [www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=201593](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=201593)
70. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12473468](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12473468)
71. Giglio S, Monis P. T, Saint C. P, Legioella Confirmation Using Real-Time PCR and SYTO9 Is an Alternative to Current Methology. *Applied and Environmental Microbiology* 2005, 71 (12): 8944-8948
72. [gateway.nlm.nih.gov/MeetingAbstracts/ma?f=102248852.html](http://gateway.nlm.nih.gov/MeetingAbstracts/ma?f=102248852.html)
73. [www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184887](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184887)
74. Alli OA, Zinks, Von Lackum N.K, Abu-Kwai K.Y, Comparative assessment of virulence traits in *Legionella* spp, *Microbiology Pub Med*, 2003, 149:631-41
75. Marre R, Abu Kwaik Y, Barlett C, Cianciotto N. P, Fields B. S, Frosch M et al, *Legionella*, *CID* 2002, 35: 905
76. MMWR, Legionnaires' Disease associated with potting soil, California-Oregon-Washington, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep, PubMed* 49 (34):777-8
77. [www.health.nsw.gov.au/data/diseases/legionella.html](http://www.health.nsw.gov.au/data/diseases/legionella.html)
- 78 Den Boer J. W, Yzerman E.P.F, Jansen R, Bruin J. P, Verhoef L. P. B, Neve G et al, Legionnaires; disease and gardening. *Clin Microbiol Infect* 2006,
79. Young M, Smith H, Gray B, Huang B, Barten J, Towner C, The public health implications of a sporadic case of culture-proven Legionnaire's disease. *Aust N J Public Health* 2005, 29 (6):513-515
80. [www.healthed.govt.nz/uploads/docs/HE4605.pdf](http://www.healthed.govt.nz/uploads/docs/HE4605.pdf)



- 81 Montanaro-Punzengruber J. C, Hicks L, Meyer W, Gilbert G. L, Australian isolates of *Legionella longbeachae* are not a clonal population. *Journal of Clinical Microbiology* 1999, 37 (10): 3249-3254
82. Blatt S. P, Parkinson M. D, Pace E, Hoffman P, Dolan D, Lauderdale P, Zajac R. A, Melcher G. P, Nosocomial Legionnaires' disease: aspiration as a primary mode of disease acquisition, *Am. J. Med*, 1993, 95:16-22
83. Broome C. V, Epidemiologic assessment of methods of transmission of legionellosis, *Zentbl, Bakteriol. Microbiol. Hyg*, 1983, 255:52-57
84. [en.wikipedia.org/wiki/Legionella\\_longbeachae](http://en.wikipedia.org/wiki/Legionella_longbeachae)
85. AWT (Association of Water Technologies), *Legionella 2003: An update and statement by the association of Water Technologies (AWT)*, June 2003.
86. Barbaree, J. M, Controlling *Legionella* in Cooling Towers. *ASHRAE Journal* 33 (6)Q 38-42, 1991
87. Winn W. C, Baron et al, *Legionella* Baron's Medical Microbiology, 4<sup>th</sup> edition, University of Texas Medical Branch, 1996, 0-9631172-1-1
88. Stojek N. M, Dutkiewicz J, *Legionella* in sprinkling water as a potential occupational risk factor for gardeners, *Ann Agric Environ Med* 2002, 9: 261-264
89. Hookey J. V, Saunders M. A, Fry N. K, Birtles R. J, Harrison T. G, Phylogeny of *Legionellaceae* based on small-subunit ribosomal DNA sequences and proposal of *Legionella lytica* comp. nov. for *Legionella*-like amoebal pathogens. *Int. J. Syst. Bacteriol* 46, 1996, 526-531
90. [www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)

91. Kuroki H, Miyamoto H, Fukuda K, Iihara H, Kawamura Y, Wang Y et al, *Legionella impletisoli* sp. nov. and *Legionella yabuuchiae* sp. nov., isolated from soils contaminated with industrial wastes in Japan. *Systematic and Applied Microbiology* 2007, 30: 237-279
92. Szymanska, Risk of exposure to *Legionella* in dental practice. *Ann Agric Environ Med* 2004, 11:9-12
93. Ζαχαρόπουλος Ι. Μ, Ανθοκομία – Ανθοτεχνική – Ειδική και ειδική. Αθήνα Εκδόσεις Ψυχάλου:14
94. Νούσης Ι. Κ, Φυτά των εσωτερικών χώρων και του εξώστη. 5<sup>η</sup> έκδοση. Αθήνα, Εκδόσεις Καλλιεργητής, 1985:33-42
95. Fedor J, Οργανική κηπουρική για τον 21<sup>ο</sup> αιώνα Ένας πλήρης οδηγός για την καλλιέργεια λαχανικών, φρούτων, βοτάνων και λουλουδιών. Εκδόσεις Βασδέκη, 2006: 39-41
96. <http://lithos.geology.upatras.gr/epy/tirfi.htm>
97. [www.a-z.gr/index.php?name=News&life=article&sid=220](http://www.a-z.gr/index.php?name=News&life=article&sid=220)
98. Ballard A. L et al, Detection of *Legionella pneumophila* using a real – time PCR hybridization assay, *Journal of Clinical Microbiol*, 2000, 38:4215-4218
99. [www.csu.edu.au/division/healsafe/alerts/legion.htm](http://www.csu.edu.au/division/healsafe/alerts/legion.htm)
100. Nunes K, The good compost guide. A directory of compost bins and wormeries. *Ecorecycle, Education Victoria* 1999, 4-5
101. [www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?201593&blobtype=pdf](http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?201593&blobtype=pdf)
102. [www.promedmail.org/pls/promed/f?p=24=00:1001:3060231049984444149::NO::F2400\\_BACK\\_PAGE,F2400\\_P1001\\_PUB\\_MAIL\\_ID:1000,38586](http://www.promedmail.org/pls/promed/f?p=24=00:1001:3060231049984444149::NO::F2400_BACK_PAGE,F2400_P1001_PUB_MAIL_ID:1000,38586)

103. OXOID compiled by Bridson E.Y., The Manual, 7<sup>th</sup> edition, CUnipath Limited Wade Road, Basing stoke, Hamshire, RG24\*PW, England,1995.
104. Koide M, Arakaki N, Saito A, Distribution of Legionella longbeachae and other legionellae in Japanese potting soils. J Infect Chemother 2001, 7: 224-227
106. Yo V. L, PLouffe J. F, Pastoris M. C et al. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture un patients with sporadic community-acquired legionellosisQ an international collaborative survey. J. Infect Dis 2002, 186: 127-128.
107. Anonymous. Legionnaires' disease associated with potting soil- California, Oregon and Washington, May – June 2000, MMWR 2000, 49:777-778
108. Koide M, Saito A, Okazaki M, et al, Isolation of Legionella longbeachae serogroup 1 from potting soils in Japan, Clin Infect Dis, 1999, 29:943-4
- 109, Heath C. H, Grove D. I, Looke D. F, Delay in appropriate therapy of *Legionella pneumophila* associated with increased mortality, Eur Clin Microbiol Infect Dis, 1996:286-290
110. Cameron S, Roder D, Walker C, Feldheim J, Epidemiological characteristics of Legionella infection in South Australia : implications for disease control. Aust NZ Med,1991,21:65-70

## ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ

ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ:

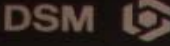
- Environmental exposure
- *Legionella* spp
- *Legionella longbeachae*
- *Legionella pneumophila*
- Legionnaire's disease
- Pneumonia
- Public health
- Soil
- Garden - gardening
- Compost
- Work safe western Australia
- Safe and Healthier Gardening
- Health Protection Officer
- Potting soil
- EWGLI
- WHO
- Agar
- *Legionella* selective agar
- VPP
- VAPP
- BMPA
- Pimaricin
- Natamycin
- Yeast extra
- Ringer's Solution
- Buffer
- Kit
- Floral creations
- Australia
- Japan
- Michio Koide
- P.H. Edelstein
- Oxoid
- BCYE
- GVPC

## ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ:


- Λεγεωνέλλα
- Οροομάδα 1
- Οροομάδα 2-15
- Νόσος των Λεγεωνάριων
- Νερό
- Χώμα
- Φυτώρια
- Ανθοπωλεία
- Κήπος
- Κηπουρός
- Μικροβιολογικό εργαστήριο
- Φυτόχωμα
- Φυτά
- Κοκκινόχωμα
- Κουμαρόχωμα
- Φυλλόχωμα
- Τύρφη
- Καστανόχωμα
- Κακτόχωμα
- Κομπόστα
- Χούμος
- Δασοχώματα
- Θερμοκήπιο
- Ατομικά Μέσα Προστασίας
- Κλίβανος
- Εξυγίανση

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### 1.1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΝΑΤΑΜΥΣΙΝ - ΡΙΜΑΡΙΣΙΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ



**Delvocide®**



minimal effort  
maximum  
protection

Simple solutions are the most effective. For total protection of cheeses and other products, Delvocide® provides the most cost effective and flexible mould prevention solution available. Whatever the application or formulation requirement, DSM's technical support guarantees that you get the optimum dosage for maximum efficiency. Active against all yeasts and moulds and potent at extremely low concentrations, Delvocide® improves product quality and appearance and yields substantial savings without affecting colour, smell or taste. Protect your product and your profit – choose Delvocide®.

**Delvocide®. Simple and effective product protection.**  
Delvocide® is an antimycotic with natamycin as active compound. Pure natamycin has no colour, odour or taste and is effective in very small quantities against moulds and yeasts. Delvocide® is not active against bacteria or other microorganisms and will therefore not interfere with natural ripening processes.  
DSM has recently developed and patented improved formulations of **Delvocide®**:

- **Delvocide®+** is an aqueous suspension of natamycin. Delvocide® + offers an extremely low sedimentation rate compared to standard natamycin. So, in liquid food applications as well as in liquid spray and dipping solutions, natamycin is easily kept in suspension. While standard natamycin settles, Delvocide®+ is active where natamycin activity is required. What's more, Delvocide®+ delivers fast solubility compared to standard natamycin which dissolves slowly when applied. In food applications, the required natamycin concentration can be reached more quickly with Delvocide®+. As Delvocide®+ is applied when protection is required, the quicker the solubility the more effective the protection will be.
- **Delvocide® Dip** is a natamycin powder formulation to prepare dipping suspensions for the surface treatment of cheese. Delvocide® Dip improves the distribution of natamycin in the dipping bath as well as the adhesion of the suspension to the whole cheese surface and thus results in significantly better mould protection.
- **Delvocide® XT1** is a natamycin powder formulation to prepare dip and spray suspensions for the surface treatment of cheese blocks and shredded cheese. Delvocide® XT1 improves the distribution of natamycin in the suspension as well as the adhesion of the suspension to the whole cheese surface. This results in significantly better protection against yeast and mould.

DSM also offers **Delvocoat® L**; tailor-made, liquid, ready to use or concentrated Delvocide® formulations that ensure optimal protection of the cheese surface. Delvocoat® L is part of the Delvocoat® range. For more information; **Delvocoat®**

- L

**Regulatory Status**  
Local food regulations should always be consulted concerning the status of this product, as legislation regarding its use in food may vary from country to country.

**Dairy Ingredients**  
Home  
About Dairy Ingredients  
Cultures  
Enzymes  
Functional Ingredients:  
- Fabulesse™  
- LAFTI®  
- Maxarite™  
Preservation  
Tests  
Publications

**Dairy improvers**  
Increasing yields. Growing returns.

**For more information:**  
DSM Food Specialties  
Dairy Ingredients  
Tel: +31 15 279 2355  
info.dairy-ingredients@dsm.com

DSM

## 1.2. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΝΑΤΑΜΥCIN-PIMARICIN ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ



### Delvocoat® L



**Optimal surface protection**  
Delvocoat® L represents a major improvement in the prevention of yeast and mould growth on food. It provides improved protection of the cheese surface by maintaining natamycin crystals in dipping bath and spray suspensions and by providing a homogeneous coverage on the surface to be protected.

**Delvocoat® L. Quality matters.**  
A breakthrough in natamycin technology, Delvocoat® L is a patent protected liquid formulation based on natamycin and food grade stabilizers. Delvocoat® L is designed to provide complete protection in surface treatment of cheeses. It has major advantages over standard natamycin.

**Reduced sedimentation**  
Natamycin in water has a solubility of 40 ppm which means that at higher doses natamycin is present in crystal form. These natamycin crystals act as a deposit and ensure continuous supply when natamycin is depleted. However, in a water suspension these crystals will settle. The stabilizers in Delvocoat® L help ensure that natamycin crystals stay in suspension, providing sustained activity where it is required.

**Improved adhesion**  
When added to water, a natamycin suspension has very limited adhesion to a cheese surface. Stabilizers in Delvocoat® L increase the viscosity to ensure an homogeneous layer of natamycin over the entire surface.

**Cost effective**  
Because Delvocoat® L results in a more homogeneous application of natamycin over the entire cheese surface, less natamycin is needed to ensure adequate protection.

**Easy to use**  
DSM provides standard formulations as well as tailor-made products, designed with additional functionalities to meet your specific requirements.


**Dairy Ingredients**  
Home  
About Dairy Ingredients  
Cultures  
Enzymes  
Functional Ingredients:  
- Fabulesse™  
- Lafti®  
- Maxarite™  
Preservation  
Tests  
Publications

**Dairy enhancers**  
Creating value, attracting consumers

**For more information:**  
DSM Food Specialties  
Dairy Ingredients  
Tel: +31 15 279 2355  
[info.dairy-ingredients@dsm.nl](mailto:info.dairy-ingredients@dsm.nl)

Unifrut **DSM**

1.3. ΣΤΟΙΧΕΙΑ NATAMYCIN-PIMARICIN ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ

**DSM Food Specialties** **DSM** 

SAMPLE CUSTOMER DFS Date : 06.02.2008  
Postbus 1  
2600 MA DELFT  
NETHERLANDS

---

Page 1 / 1

## Certificate of Analysis

---

Material: Our / Your reference  
**226 - DELVOCID INSTANT, 100 g bottle**  
Batch 07J24 / Production date 24.10.2007 / Best Before Date 24.10.2010

Characteristic	Unit	Value
Appearance		Normal
Identity		conform
Natamycine content	%	51,3
Standard Plate Count	/g	< 100
Enterobacteriaceae	/g	< 0,3
Listeria monocytogenes		negative in 25 g

---

In addition to the results listed on the certificate of analysis we confirm that each individual batch meets the specification limits as listed in the applicable product data sheets.

This document is a non-signed computer form  
generated after release by the QA manager Petra  
Wilgers

The material covered by this delivery is produced in accordance with DSM's manufacturing specifications currently in force for this product grade. DSM certifies that the material supplied conforms to the performance typical for this grade and product description, and has been monitored in accordance with the internal quality control routines employed in our company. However, the buyer must check the suitability of this grade for the actual application. This certificate does not release the recipient from his obligation to carry out his usual incoming goods checks. Our general conditions of sale remain in force.

\* Registered trademark of DSM.



2. ΣΤΟΙΧΕΙΑ *LEGIONELLA* MWY SELECTIVE SUPPLEMENT ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ



**Legionella MWY Selective Supplement  
SR0118E**

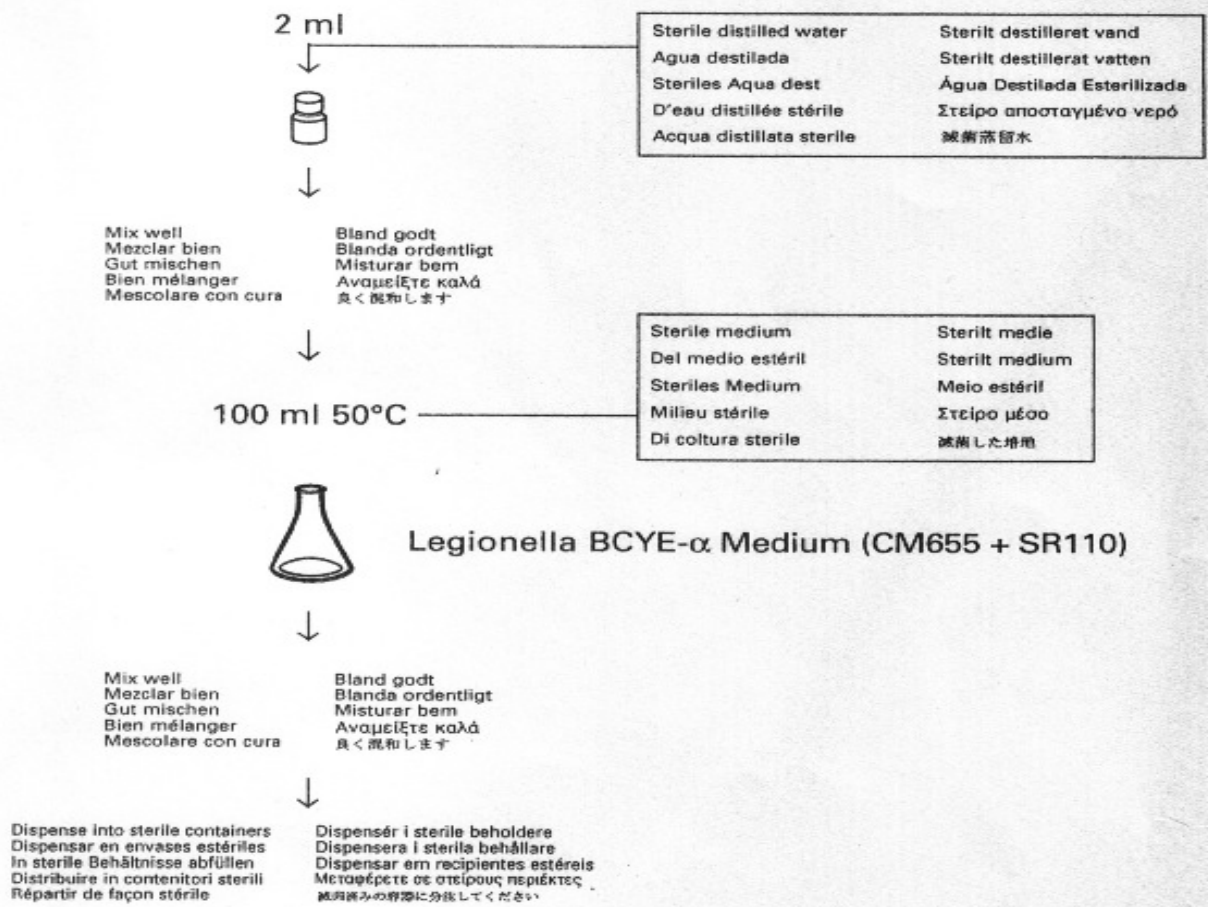
For laboratory use only



<b>10 x</b>	Glycine Polymyxin B Anisomycin	0.3 g 5000 I.U. 8 mg	Vancomycin Bromothymol blue Bromocresol purple	100 µg 1 mg 1 mg
-------------	--------------------------------------	----------------------------	--	------------------------

Precautions: Use sterile techniques at all times. Do not use beyond stated expiry date.  
 Precauciones: Manipular asépticamente durante todo el procedimiento. No utilizar una vez caducado.  
 Vorsichtsmassnahmen: Nur unter aseptischen Bedingungen arbeiten. Nicht nach Ablauf des Verfallsdatum verwenden.  
 Précaution: Travailler à chaque fois de manière stérile. Ne pas utiliser après la date d'expiration.  
 Precauzioni: Operare sempre in condizioni di sterilità. Non utilizzare dopo la data di scadenza.  
 Forholdsregel: Anvend steril teknik til hver en tid. Må ikke anvendes ud over den angivne udløbsdato.  
 Försiktighet: Använd alltid sterila tekniker. Använd inte produkterna efter deras utgångsdatumt.  
 Precauções: Utilizar sempre a técnica estéril. Não utilizar depois de ter caducado o prazo de validade indicado.  
 Προφυλάξεις: Να χρησιμοποιείτε πάντοτε άσηπτη τεχνική. Μην χρησιμοποιείτε το προϊόν μετά την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης.  
 注意: 常に滅菌処理を行ってください。記載されている使用期限を過ぎたものは、絶対に使用しないでください。

*Amfros*




3.1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ *LEGIONELLA* GVPC SELECTIVE SUPPLEMENT ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ

**Biolife** Italiana S.r.l.

**QUALITY ASSURANCE CERTIFICATE**

**LEGIONELLA GVPC SELECTIVE SUPPLEMENT**

**REF** 423215      **LOT** 37D043       2008-04-10

Positive control strains		Specifications	Results
<i>L. pneumophila</i> 01	ATCC 33152	growth	passes test
<i>L. pneumophila</i> 06	CB Z102	growth	passes test
<i>L. anisa</i>	CB Z103	growth	passes test
Negative control strains			
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	growth inhibited	passes test
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	growth inhibited	passes test
<i>C. albicans</i>	ATCC 18804	growth partially inhibited	passes test
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	growth inhibited	passes test
Physical characteristics		satisfactory	passes test
Control of the freeze-dried materials contamination (25°C and 37°C)		no microbial contamination detected	passes test
pH of the complete culture medium		6,8 - 7,0	passes test

Batch tested and approved according to MDR423215-p4 rev. 1. Medium base: Legionella BCYE Agar Base (REF 401582) supplemented with Legionella BCYE Growth Supplement (REF 423210).

This document has been produced electronically and bears no signature.

Date: 2007-04-19

Approved by Quality Assurance

**DIRECTIONS – ISTRUZIONI – PRÉPARATION - GEBRAUCHSANWEISUNG-  
INSTRUCCIONES – INSTRUKTIONER – INSTRUÇÕES – ΟΔΗΓΙΕΣ**

**LEGIONELLA GVPC SELECTIVE SUPPLEMENT**



**REF** 423215      4 X 10 mL



Freeze-dried selective supplement for the isolation of *Legionella* spp. / Supplemento selettivo liofilizzato per l'isolamento di *Legionella* spp. / Supplément sélectif lyophilisé pour l'isolement de *Legionella* spp. / Gefriergetrocknetes Selektiv-Supplement zur Isolierung von *Legionella* spp. / Suplemento selectivo liofilizado para aislamiento de *Legionella* spp. / Lyophiliserat selektivt supplement för isolering av *Legionella* spp. / Suplemento selettivo liofilizado para o isolamento de *Legionella* spp. / Αυοφιλοποιημένο εκλεκτικό συμπλήρωμα για τον προσδιορισμό *Legionella* spp.

**CONTENTS/CONTENUTO/PRESENTATION/PACKUNGSINHALT/CONTENIDO/ INNEHÅLL /CONTEÚDO/ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**  
4 VIALS FOR 500 ML OF MEDIUM / 4 FLACONI PER 500 ML DI TERRENO / 4 FLACONS POUR 500 ML DE MILIEU / 4 RÖHRCHEN FÜR 500 ML NÄHRBODEN / 4 VIALES PARA 500 ML DE MEDIO/ 4 AMPULLER, VARJE AMPULL ANVÄNDS TILL 500 ML MEDIUM/ 4 FRASCOS, PARA CADA 500 ML DE MEIO/4 ΦΙΑΛΙΔΙΑ, ΕΚΑΣΤΟ ΓΙΑ 500 ML ΜΕΣΟΥ.

**STORAGE / CONSERVAZIONE / CONSERVATION / LAGERUNG / CONSERVACION / LAGRING / CONSERVAÇÃO / ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ**  
Store at 2-8° - When stored as directed the supplement remains stable until the expiry date shown on the label. Do not use beyond stated expiry date. / Conservare a 2 - 8°C- In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare dopo la data di scadenza. / Conserver à 2-8°C, selon les conditions de conservation indiquées, le produit est stable jusqu'à la date d'expiration mentionnée sur l'étiquette. Ne pas utiliser après la date d'expiration. / Lagerung: 2-8°C. Das Supplement ist bei vorschriftsmäßiger Lagerung bis zum aufgedruckten Verfalldatum haltbar. Verfalldatum beachten. / Conservar entre 2-8°C. Estable bajo estas condiciones, hasta la fecha de caducidad que figura en la etiqueta. No utilizar si ha caducado. / Lagras i 2-8°C. Om lagring sker korrekt håller sig supplement hela tiden fram till utgångs datumet som står antecknat på etiketten. Använd ej produkten efter utgångs datum. / Armazenar a 2-8°C. Quando armazenado nestas condições, o suplemento permanece estável até a data de expiração indicada no rótulo. Não utilizar após a data do vencimento. / Φυλάξτε στους 2-8°C. Όταν φυλάσσεται σύμφωνα με τις οδηγίες, το συμπλήρωμα παραμένει σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης που φαίνεται στην ετικέτα. Μην χρησιμοποιείτε πέραν της αναφερομένης ημερομηνίας λήξεως.

### 3.2. ΣΤΟΙΧΕΙΑ *LEGIONELLA* GVPC SELECTIVE SUPPLEMENT ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ

#### **PRECAUTIONS / PRECAUZIONI / PRÉCAUTIONS / VORSICHTSMAßNAHMEN / PRECAUCIONES / SÄKERHETSFÖRESKRIFTER PRECAUÇÕES / ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ**

For *in vitro* diagnostic use only. The supplement should be used only by adequately trained personnel with knowledge of microbiological techniques in the laboratory. / Solo per uso diagnostico *in vitro*. Il prodotto deve essere usato solo in laboratorio, da operatori addestrati e con conoscenze delle tecniche microbiologiche di base. / Pour usage *in vitro* exclusif. Ce produit ne doit être utilisé qu'en laboratoire par des personnels formés aux techniques de microbiologie. / Zum Gebrauch für *in vitro* Diagnostik. Nur entsprechend ausgebildete Personen mit Kenntnissen in mikrobiologischen Methoden dürfen dieses Produkt nutzen. / Uso sólo para diagnóstico *in vitro*. El suplemento debería ser sólo usado por personal adecuadamente cualificado con conocimientos de las técnicas microbiológicas en laboratorios. / Endast för *in vitro* diagnostik. Supplementet skall endast hanteras av behörig personal med kunskap om mikrobiologiska laboratortekniker. / Somente para uso diagnostico *in vitro*. O suplemento deve ser utilizado somente no laboratório por pessoas adequadamente treinadas e com conhecimento em técnicas microbiológicas. / Το συμπλήρωμα πρέπει να χρησιμοποιείται από κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό με γνώση των μικροβιολογικών τεχνικών στο εργαστήριο.

#### **WARNING / ATTENZIONE / ATTENTION / ACHTUNG / ATENCION / VARNING / ATENÇÃO / ΠΡΟΣΟΧΗ**

Consult the material safety data sheet before the use / Consultare la scheda di sicurezza prima dell'uso. / Lire attentivement la fiche de sécurité avant utilisation / Vor Gebrauch Sicherheitsdatenblatt lesen. / Consultar la ficha de datos de seguridad del material antes de su uso. / Kontrollera säkerhets informationen före användning / Consultar a ficha de informações sobre a segurança antes do uso. / Συμβουλευτείτε το φύλλο δεδομένων ασφαλείας υλικού (MSDS) πριν τη χρήση.

#### **VIAL CONTENTS**

Glycine 1.5 g, Polymyxin B 40.000 UI, Vancomycin HCl 0.5 mg, Cycloheximide 40.0 mg.

**DIRECTIONS** Dissolve the contents of one vial with 10 mL of sterile distilled water under aseptic conditions. Mix gently to dissolve. Add to 500 mL of Legionella BCYE Agar Base (REF 401582), autoclaved and cooled to 45-50°C, prepared with the contents of one vial of Legionella BCYE Growth Supplement (REF 423210). Mix well and distribute into sterile Petri dishes.

#### **CONTENUTO DEL FLACONE**

Glicina 1.5 g, Polimixina B 40.000 UI, Vancomicina HCl 0.5 mg, Cicleximide 40.0 mg.

**ISTRUZIONI** Ricostituire il contenuto del flacone con 10 mL d'acqua distillata sterile con le precauzioni dell'asepsi. Mescolare delicatamente per sciogliere. Aggiungere sterilmente a 500 mL di Legionella BCYE Agar Base (REF 401582) autoclavato e raffreddato a 50°C, preparato con il supplemento di crescita Legionella BCYE Growth Supplement (REF 423210). Mescolare e versare in piastre sterili.

#### **COMPOSITION (PAR FLACON)**

Glycine 1.5 g, Polymyxine B 40.000 UI, Vancomycine HCl 0.5 mg, Cycloheximide 40.0 mg.

**PREPARATION** Reconstituer stérilement un flacon avec 10 mL d'eau distillée stérile. Mélanger doucement pour dissoudre. Ajouter stérilement le contenu à 500 mL de Legionella BCYE Agar Base (REF 401582) refroidi à 50°C et préparé en ajoutant un flacon de Legionella BCYE Growth Supplement (REF 423210). Bien mélanger et répartir.

#### **ZUSAMMENSETZUNG JE RÖHRCHEN**

Glycin 1.5 g, Polymyxin B 40.000 UI, Vancomycin HCl 0.5 mg, Cycloheximid 40.0 mg.

**ZUBEREITUNG** Je Röhrchen aseptisch 10 mL steriles destilliertes Wasser zusetzen. Das Supplement durch vorsichtiges Schwenken vollständig lösen. Das gelöste Supplement zu 500 mL sterilen, auf 50°C abgekühlten Legionella BCYE α Nährboden (aus Legionella BCYE Agar-Basis -REF 401582- und Legionella BCYE Growth Supplement -REF 423210- geben). Mischen und Platten gießen.

#### **CONTENIDO POR VIAL**

Glicina 1.5 g, Polimixina B 40.000 UI, Vancomicina HCl 0.5 mg, Cicleximida 40.0 mg.

**INSTRUCCIONES** Añadir aseptícamente 10 mL de agua destilada estéril a un vial y invertir suavemente hasta disolver. Añadir aseptícamente el contenido a 500 mL de medio Legionella BCYE Agar Base (REF 401582) esterilizado y enfriado a 50°C, al cual se le ha añadido previamente un vial de Legionella BCYE Growth Supplement (REF 423210). Mezclar y verter en placas Petri estériles.

#### **AMPULLENS INNEHÅLL**

Glycine 1.5 g, Polymyxin B 40.000 UI, Vancomycin HCl 0.5 mg, Cycloheximide 40.0 mg

**INSTRUKTIONER** Under aseptiska former löses innehållet i en ampull med 10 mL av sterilt destillerat vatten. Blandas försiktigt till en lösning. Lösningen tillsätts till 450 mL av autoklaverad Legionella BCYE Agar Base (REF 401582) och kyls till 45-50°C. Tillsätt sedan innehållet i en ampull av Legionella BCYE Growth Supplement (REF 423210), med 50 mL av sterilt destillerat. Blanda väl och tappa upp i sterila Petri skålar.

#### **CONTEÚDO DO FRASCO**

Glicina 1,5 g, Vancomicina HCl 0,5 mg, Polimixina B 39600 UI, Cicloheximida 40,0 mg.

**INSTRUÇÕES.** Reconstituir o conteúdo de um frasco com 10 mL de água destilada estéril sob condições assépticas. Misturar delicadamente até dissolver. Adicionar assepticamente o conteúdo a 450 mL de Legionella BCYE Agar Base (REF 401582), autoclavado e resfriado a 45 - 50 °C. Adicionar então o conteúdo de um frasco de Legionella BCYE Growth Supplement (REF 423210), reconstituído com 50 mL de água destilada estéril, sob condições assépticas. Misturar bem e distribuir em placas de Petri estéreis.

#### **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΦΙΑΛΙΔΙΟΥ**

Γλυκίνη 1.5 g, Βανκομυκίνη HCl 0.5 mg, Πολυμυξίνη Β 40000 IU, Κυκλοεξιμίδιο 40.0 mg

**ΟΔΗΓΙΕΣ** Ασηπτικά ανασυστήστε τα περιεχόμενα ενός φιαλιδίου με 10 mL αποστειρωμένου αποσταγμένου νερού. Αναμίξτε ήπια μέχρι διαλύσεως. Προσθέστε σε 500 mL Legionella BCYE Agar Base (REF 401582) αποστειρωμένα και ψυγμένα στους 45-50°C. Μετά προσθέστε τα περιεχόμενα ενός φιαλιδίου Legionella BCYE Growth Supplement (REF 423210), ανασυσταμένου με 50 mL αποστειρωμένου αποσταγμένου νερού, κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Ανακατέψτε καλά και περιχύστε σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri.

Biolife Italiana S.r.l., Viale Monza 272, 20128 Milano, Italia -Tel. ++39 (0)2 252091 Fax ++39 (0)2 2576428

e-mail: [biolife@masciabrunelli.it](mailto:biolife@masciabrunelli.it) internet: [www.biolifeit.com](http://www.biolifeit.com)

423215 CQ - FI 8L-1 01/2007

4.1. ΣΤΟΙΧΕΙΑ *LEGIONELLA* BCYE-a SELECTIVE SUPPLEMENT ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ

**Biolife** Italiana S.r.l.

**QUALITY ASSURANCE CERTIFICATE**

**LEGIONELLA BCYE α-GROWTH SUPPLEMENT**

**REF** 423210

**LOT** 37B107



2009/02/26

**Positive control strains**

*L. pneumophila* 01 ATCC 33152  
*L. pneumophila* 06 CB Z102  
*L. anisa* CB Z103

**Specification**

growth  
 growth  
 growth

**Results**

passes test  
 passes test  
 passes test

**Negative control strains**

*S. aureus* ATCC 25923  
*E. coli* ATCC 25922  
*C. albicans* ATCC 10231  
*P. aeruginosa* ATCC 27853

growth inhibited  
 growth inhibited  
 growth partially inhibited  
 growth inhibited

passes test  
 passes test  
 passes test  
 passes test

**Physical characteristics**

Control of the freeze-dried materials contamination  
 pH of the complete culture medium

satisfactory  
 no microbial contamination detected  
 6,8 - 7,0

passes test  
 passes test  
 passes test

Batch tested and approved according to MDR423210-p4.REV. 2 - Medium base: Legionella BCYE Agar Base (REF 401582) supplemented with Legionella GVPC Supplement (REF 423215).

This document has been produced electronically and bears no signature.

Date: 2007/03/07

Approved by Quality Assurance

**DIRECTIONS – ISTRUZIONI – PRÉPARATION - GEBRAUCHSANWEISUNG-  
 INSTRUCCIONES – INSTRUKTIONER – INSTRUÇÕES - ΟΔΗΓΙΕΣ**

**LEGIONELLA BCYE α-GROWTH SUPPLEMENT**



**REF** 423210

4 X 50 mL



Freeze-dried selective supplement for the isolation of *Legionella* spp. / Supplemento selettivo liofilizzato per l'isolamento di *Legionella* spp. /  
 Supplément sélectif lyophilisé pour l'isolement de *Legionella* spp. / Gefriergetrocknetes Selektiv-Supplement zur Isolierung von *Legionella* spp. /  
 / Suplemento selectivo liofilizado para aislamiento de *Legionella* spp. / Lyophiliserat selektivt supplement för isolering av *Legionella* spp. /  
 Suplemento selettivo liofilizado para o isolamento de *Legionella* spp. /  
 Λυοφιλοποιημένο εκλεκτικό συμπλήρωμα για τον προσδιορισμό *Legionella* spp.

**CONTENTS/CONTENUTO/PRESENTATION/PACKUNGSINHALT/CONTENIDO/ INNEHÅLL /CONTEÚDO/ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

4 VIALS FOR 500 ML OF MEDIUM / 4 FLACONI PER 500 ML DI TERRENO / 4 FLAÇONS POUR 500 ML DE MILIEU / 4 RÖHRCHEN FÜR 500 ML NÄHRBODEN / 4 VIALES PARA 500 ML DE MEDIO / 4 AMPULLER, VARJE AMPULL ANVÄNDS TILL 500 ML MEDIUM / 4 FRASCOS, PARA CADA 500 ML DE MEIO/4 ΦΙΑΛΙΔΙΑ, ΕΚΑΣΤΟ ΓΙΑ 500 ML ΜΕΣΟΥ.

**STORAGE / CONSERVAZIONE / CONSERVATION / LAGERUNG / CONSERVACION / LAGRING / CONSERVAÇÃO / ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ**

Store at 2-8° - When stored as directed the supplement remains stable until the expiry date shown on the label. Do not use beyond stated expiry date. / Conservare a 2 - 8°C- In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare dopo la data di scadenza. / Conserver à 2-8°C, selon les conditions de conservation indiquées, le produit est stable jusqu'à la date d'expiration mentionnée sur l'étiquette. Ne pas utiliser après la date d'expiration. / Lagerung: 2-8°C. Das Supplement ist bei vorschriftsmäßiger Lagerung bis zum aufgedruckten Verfalldatum haltbar. Verfalldatum beachten. / Conservar entre 2-8°C. Estable bajo estas condiciones, hasta la fecha de caducidad que figura en la etiqueta. No utilizar si ha caducado. / Lagras i 2-8°C. Om lagring sker korrekt håller sig supplement hela tiden fram till utgångs datumet som står antecknat på etiketten. Använd ej produkten efter utgångs datum. / Armazenar a 2-8°C. Quando armazenado nestas condições, o suplemento permanece estável até a data de expiração indicada no rótulo. Não utilizar após a data do vencimento. / Φυλάξτε στους 2-8°C. Όταν φυλάσσεται σύμφωνα με τις οδηγίες, το συμπλήρωμα παραμένει σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης που φαίνεται στην ετικέτα. Μην χρησιμοποιείτε πέραν της αναφερομένης ημερομηνίας λήξεως.

#### 4.2. ΣΤΟΙΧΕΙΑ *LEGIONELLA* BCYE-a SELECTIVE SUPPLEMENT ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΗΝ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ

##### PRECAUTIONS / PRECAUZIONI / PRÉCAUTIONS / VORSICHTSMABNAHMEN / PRECAUCIONES / SÄKERHETSFÖRESKRIFTER PRECAUÇÕES / ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

For *in vitro* diagnostic use only. The supplement should be used only by adequately trained personnel with knowledge of microbiological techniques in the laboratory. / Solo per uso diagnostico *in vitro*. Il prodotto deve essere usato solo in laboratorio, da operatori addestrati e con conoscenze delle tecniche microbiologiche di base. / Pour usage *in vitro* exclusif. Ce produit ne doit être utilisé qu'en laboratoire par des personnels formés aux techniques de microbiologie. / Zum Gebrauch für *in vitro* Diagnostik. Nur entsprechend ausgebildete Personen mit Kenntnissen in mikrobiologischen Methoden dürfen dieses Produkt nutzen. / Uso sólo para diagnóstico *in vitro*. El suplemento debería ser sólo usado por personal adecuadamente cualificado con conocimientos de las técnicas microbiológicas en laboratorios. / Endast för *in vitro* diagnostik. Supplementet skall endast hanteras av behörig personal med kunskap om mikrobiologiska laboratortekniker. / Somente para uso diagnostico *in vitro*. O suplemento deve ser utilizado somente no laboratório por pessoas adequadamente treinadas e com conhecimento em técnicas microbiológicas. / Το συμπλήρωμα πρέπει να χρησιμοποιείται από κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό με γνώση των μικροβιολογικών τεχνικών στο εργαστήριο.

##### WARNING / ATTENZIONE / ATTENTION / ACHTUNG / ATENCION / VARNING / ATENÇÃO / ΠΡΟΣΟΧΗ

Consult the material safety data sheet before the use / Consultare la scheda di sicurezza prima dell'uso. / Lire attentivement la fiche de sécurité avant utilisation / Vor Gebrauch Sicherheitsdatenblatt lesen. / Consultar la ficha de datos de seguridad del material antes de su uso. / Kontrollera säkerhets informationen före användning / Consultar a ficha de informações sobre a segurança antes do uso. / Συμβουλευτείτε το φύλλο δεδομένων ασφαλείας υλικού (MSDS) πριν τη χρήση.

##### VIAL CONTENTS

ACES Buffer/KOH 5 g, Ferric pyrophosphate 125 mg, L-cysteine HCl 200 mg,  $\alpha$ -ketoglutarate 500 mg

**DIRECTIONS** Dissolve the contents of one vial with 50 mL of warm sterile distilled water (50°C) under aseptic conditions. Mix gently to dissolve the contents. Add to 450 mL of Legionella BCYE Agar Base (401582), autoclaved and cooled to 50°. Mix well and distribute into sterile Petri dishes.

##### CONTENUTO DEL FLACONE

Tampone ACES /KOH 5 g, Pirofosfato ferrico 125 mg, L-cisteina HCl 200 mg,  $\alpha$ -chetoglutarato 500 mg

**ISTRUZIONI** Ricostituire il contenuto del flacone con 50 mL d'acqua distillata sterile riscaldata a 50°C, con le precauzioni dell'asepsi. Agitare delicatamente per sciogliere completamente il materiale. Aggiungere sterilmente a 450 mL di Legionella BCYE Agar Base (401582), autoclavato e raffreddato a 50°C. Mescolare e distribuire in piastra.

##### COMPOSITION (PAR FLACON)

Tampón ACES /KOH 5 g, Pyrophosphate ferrique 125 mg, L-cystéine HCl 200 mg,  $\alpha$ -Cétoglutarate 500 mg

**PREPARATION** Reconstituer stérilement un flacon avec 50 mL d'eau distillée stérile chaude (50°C). Mélanger doucement pour dissoudre. Ajouter stérilement le contenu à 450 mL de Legionella BCYE Agar Base (401582), refroidi à 50°C. Bien mélanger et répartir.

##### ZUSAMMENSETZUNG JE RÖHRCHEN

ACES-Puffer/KOH 5,0 g, Eisenpyrophosphat 125 mg, Cystein-HCl 200 mg,  $\alpha$ -Ketoglutarat 500 mg

**ZUBEREITUNG** Je Röhrchen aseptisch 50 mL warmes (50°C) steriles destilliertes Wasser zusetzen. Das Supplement durch vorsichtiges Schwenken vollständig lösen. Das gelöste Supplement aseptisch zu 450 mL steriler, auf 50°C abgekühlter Legionella BCYE Agar Base (401582) geben. Mischen und Platten gießen.

##### CONTENIDO POR VIAL

Buffer ACES /KOH 5 g, Pirofosfato férrico 125 mg, L-cisteine HCl 200 mg,  $\alpha$ -Cetoglutarato 500 mg.

**INSTRUCCIONES** Añadir aseptícamente 50 mL de agua destilada estéril templada (50°C) a un vial y invertir suavemente hasta disolver. Añadir aseptícamente el contenido a 450 mL de Legionella BCYE Agar Base (401582), esterilizado y enfriado a 50°C. Mezclar y verter en placas Petri estériles.

##### AMPULLENS INNEHÅLL

ACES Buffer/KOH 5 g, Ferric pyrophosphate 125 mg, L-cysteine HCl 200 mg,  $\alpha$ -ketoglutarate 500 mg

**INSTRUKTIONER** Under aseptiska former löses innehållet i en ampull med 50 mL av sterilt destillerat vatten (50°C). Blandas försiktigt till en lösning. Lösningen tillsätts till 450 mL av autoklaverad Legionella BCYE Agar Base (REF 401582) och kyles till 45-50°C. Blanda väl och tappa upp i sterila Petri skålar.

##### CONTEÚDO DO FRASCO

Tampão ACES / Hidróxido de Potássio 5,0 g,  $\alpha$  Cetoglutarato 0,5 g, Pirofosfato férrico 125,0 mg, Cisteína monoclóridato 200,0 mg.

**INSTRUÇÕES.** Reconstituir o conteúdo de um frasco com 50 mL de água destilada estéril aquecida a 50°C sob condições assépticas. Misturar delicadamente até dissolver. Adicionar assepticamente o conteúdo a 450 mL de Legionella BCYE Agar Base (REF 401582), autoclavado e resfriado a 45 - 50 °C. Misturar bem e distribuir em placas de Petri estéreis.

##### ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΦΙΑΛΙΔΙΟΥ

ACES Ρυθμιστικό/Υδροξείδιο του Καλίου 5.0 g,  $\alpha$ -κετογλουταρικό 0,5 g, Πυροφωσφορικός Σίδηρος 125.0 mg, Κυστεΐνη HCl 200.0 mg.


**ΟΔΗΓΙΕΣ.** Ασηπτικά ανασυστήστε τα περιεχόμενα ενός φιαλιδίου με 50 mL αποστειρωμένου αποσταγμένου νερού (50°C). Αναμίξτε ήπια μέχρι διαλύσεως. Προσθέστε σε 450 mL Legionella BCYE Agar Base (REF 401582) αποστειρωμένα και ψυγμένα στους 45-50°C. Ανακατέψτε καλά και περιχύστε σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri.

Biolife Italiana S.r.l., Viale Monza 272, 20128 Milan, Italia -Tel. ++39 (0)2 252091 fax ++39 (0)2 2576428  
e-mail: [biolife@masciabrunelli.it](mailto:biolife@masciabrunelli.it) Sito Web: <http://www.biolifeit.com>

4243210 CQ - FI 8L-1 01/2007

5. ΤΑ ΠΡΩΤΑ ΕΞΩΦΥΛΛΑ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΑΡΘΡΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΕΦΗΜΕΡΙΔΑ ΓΙΑ ΤΗ ΝΟΣΟ ΤΩΝ ΛΕΓΕΩΝΑΡΙΩΝ <sup>(65)</sup>

**MEDICAL INTELLIGENCE**



**DEMONSTRATION OF THE AGENT OF LEGIONNAIRES' DISEASE IN TISSUE**

FRANCIS W. CHANDLER, D.V.M., Ph.D.,  
MARTIN D. HICKLIN M.D., M.P.H.,  
AND JOHN A. BLACKMON, M.D.

Reprinted from the *New England Journal of Medicine*  
**297:1218-1220 (December 1), 1977**

NEW YORK, WEDNESDAY, AUGUST 4, 1976

**20 FLU-LIKE DEATHS IN PENNSYLVANIA, 115 ILL, A MYSTERY**

**Health Officials Intensifying Search to Find Cause— Legionnaires Stricken**

By LAWRENCE K. ALTMAN

HARRISBURG, Pa., Aug. 3—The death toll from an explosive outbreak of a mysterious flu-like disease in Pennsylvania rose to 20 today as teams of Federal and state epidemiologists intensified their search to identify the cause of the illness.

An additional 115 people, some in serious condition, were hospitalized throughout the State with high fevers, generalized malaise, muscle aches, respiratory complaints, and headaches — the symptoms most commonly associated with the disease.

Pennsylvania health officials said at a news conference here that autopsies of four persons in different hospitals indicated that they had died of a severe viral pneumonia. The conclusion was based on findings that showed that the persons died of a type of pneumonia more generally associated with viruses than bacteria.

Attended Legion Conventions

All the victims had attended a state American Legion convention in Philadelphia July 21-24. There are no reports thus far of the disease's spreading to anyone who was not among the 10,000 people attending the convention.

Dr. Leonard Bachman, the Pennsylvania Secretary of Health, said at the news conference that it would be at least two more days before laboratory tests by the State Health Department and the Center for Disease Control in Atlanta could determine what caused so many people to get sick and die in one of the most perplexing outbreaks of respiratory illness in recent years.

Swine influenza is among a long list of many possibilities, according to Dr. Bachman, who said, "As long as we don't have the cause, no cause is ruled out."

Dr. Bachman said that if influenza virus was identified as the cause of the outbreak, then the medical teams that have been preparing for a previously planned mass swine flu immunization program would be called on to deliver vaccine against whatever type of influenza was involved.

"The biggest problem would be obtaining and distributing the vaccine," Dr. Bachman said. He emphasized that the danger to the number of cases and deaths were not firm because "it became apparent from our reporting systems" that the number of newly reported cases had not yet leveled off.

"There is no evidence of secondary cases," he said.

Continued on Page 12, Column 1



Dr. Wallace Turner hands specimens to Karen Schectman, microbiologist, at Pennsylvania State Health Department laboratories in Philadelphia. Specimens are from the dead and sick who were at the Ames city in July. Dr. Turner is handed over the rack of specimen

Courtesy of The New York Times, Copyright © 1976.