

ΙΑΤΡΙΚΗ.— 'Αξιολόγηση τοῦ νέου θρεπτικοῦ ὑλικοῦ LTLSB διὰ τὴν ταχεῖα διάγνωση τοῦ Κωλοβακτηριδίου (*E. coli*) κατὰ τὴν μικροβιολογικὴ ἐξέταση ὑδάτων καὶ τροφίμων, ὑπὸ *I. A. Παπαδάκη* καὶ *A. Μανρίδου\**, διὰ τοῦ 'Ακαδημαϊκοῦ κ. Π. Βασιλειάδη.

#### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ἡ μικροβιολογικὴ ἐξέταση ἀποτελεῖ ἕναν ἀπὸ τοὺς βασικότερους καὶ πλέον ἀπαραίτητους ἐλέγχους γιὰ τὴν καταλληλότητα τοῦ πόσιμου νεροῦ καὶ τῶν τροφίμων, γιὰτὶ εἶναι ἡ πλέον εὐαίσθητη μέθοδος γιὰ τὴν ἀνίχνευση τοῦ κινδύνου ἀπὸ πρόσφατη μόλυνση.

Σύμφωνα μὲ τὴν Π.Ο.Υ. (W.H.O. 1971) καὶ τὴν Ὑγειονομικὴ Διάταξη Γ3α/761/1968 γιὰ μιὰ πόλη 200.000 κατοίκων πρέπει νὰ γίνονται 650 περίπου μικροβιολογικὲς ἀναλύσεις καὶ γιὰ μιὰ πόλη 1.000.000 νὰ ἐξετάζονται περίπου 3.000 δείγματα τὸν μῆνα. Γιὰ τὴν διασφάλιση λοιπὸν τοῦ πόσιμου νεροῦ σὲ ὅλη τὴν χώρα ἀλλὰ καὶ τὸν ὑπόλοιπο κόσμο, τὰ εἰδικὰ ἐργαστήρια πραγματοποιοῦν καθημερινὰ πολλὲς χιλιάδες ἐξετάσεων.

Δὲν ὑπάρχει ἀμφιβολία ὅτι ὅσο ἀπλούστερη εἶναι ἡ μεθοδολογία ἀναλύσεως τόσο ἡ δυνατότητα ἐξετάσεως μεγαλύτερου ἀριθμοῦ δειγμάτων ἀπὸ τὸ ἴδιο ἐργαστήριο αὐξάνει. Ἡ ἐπιτροπὴ ἐμπειρογνομόνων τῆς Π.Ο.Υ. (1971) γιὰ τὸ πόσιμο νερὸ τονίζει ὅτι «κατὰ τὸν καθημερινὸ ἔλεγχο εἶναι πιὸ ἀπαραίτητο νὰ ἐξετάζονται πολυάριθμα δείγματα μὲ ἀπλὲς τεχνικὲς παρά λίγα δείγματα μὲ πλέον σύνθετες τεχνικὲς ἢ μὲ σειρὰ δοκιμασιῶν».

Τόσο στὸ πόσιμο νερὸ, ὅσο καὶ σὲ σημαντικὸ ἀριθμὸ τροφίμων ἡ μικροβιολογικὴ ἐξέταση περιλαμβάνει, μεταξὺ ἄλλων, τὴν ἀνίχνευση καὶ ἀρίθμηση τῶν Κωλοβακτηριδίων (*E. coli*) (ἢ Faecal coliforms).

Γιὰ τὸ πόσιμο νερὸ ἰδίως, ἡ παρουσία Κωλοβακτηριδίων ἀποτελεῖ ἀψευδῆ δείκτη κοπρανώδους μόλυνσεως ποὺ τὸ χαρακτηρίζει σὰν ἀκατάλληλο.

Ἡ παλαιότερη καὶ εὐρύτατα χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία γιὰ τὴν ἀνίχνευση — καταμέτρηση τῶν Κωλοβακτηριδίων τόσο στὸ πόσιμο νερὸ ὅσο καὶ στὰ τρόφιμα, ὀνομάζεται μέθοδος τῶν Πολλαπλῶν Σωλήνων καὶ περιλαμβάνει δύο στάδια καλλιέργειας. Στὸ πρῶτο στάδιο ἀνιχνεύονται — καταμετροῦνται τὰ Κωλοβακτηριοειδῆ καὶ στὸ δεῦτερο τὰ Κωλοβακτηρίδια. Τὸ δεῦτερο αὐτὸ στάδιο καλλιέργειας, ἐπειδὴ

\* J. A. PAPAĐAKIS - A. MAVRIDOU, Evaluation of the new medium LTLSB for the rapid differentiation of *E. coli* in water and food bacteriological examination.

επιτρέπει την διαφοροποίηση των Κωλοβακτηριδίων από τα Κωλοβακτηριοειδή που περιλαμβάνουν και άλλα είδη μικροβίων, ονομάζεται «διαφοροποιητική δοκιμή».

Στην Ελλάδα προσπάθειες άπλοποίησεως της μικροβιολογικής τεχνικής έγιναν από τον αείμνηστο καθηγητή Γ. Π. Άλιβιζάτο (Άλιβιζάτος και Έμμανουηλίδου 1950, Alivizatos και συν. 1953, Άλιβιζάτος και συν. 1955) και συνεχίστηκαν στο εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ύγειονομικής Σχολής Άθηνων. Σάν αποτέλεσμα των προσπαθειών άπλουστεύσεως της μεθοδολογίας πρώτα για τα θαλάσσια νερά (Παπαδάκης 1971) και μετά για τα πόσιμα παρασκευάστηκε ένα νέο θρεπτικό ύλικό (Παπαδάκης 1972) που σε ένα σωλήνα μόνο άνιχνεύει το Κωλοβακτηρίδιο, άντι για δύο θρεπτικά ύλικά σε δύο σωλήνες που χρησιμοποιεί ή πρότυπος άγγλική μέθοδος (Mackenzie και συν. 1948, Report N° 71, 1982). Έπανειλημμένες συγκρίσεις μετά από μικρές τροποποιήσεις του θρεπτικού ύλικού, έδειξαν ότι ο ζωμός Λακτόζης-Τρυπτόνης-Λαουρονικού (LTLSB), είναι κατάλληλος και ειδικός για την διαφοροποίηση του Κωλοβακτηριδίου και ότι μπορεί να άντικαταστήσει, δηλαδή να άπλουστεύσει, την παλαιά πρότυπο τεχνική των δύο σωλήνων (Papadakis-Mavridou 1980, Papadakis 1981, Papadakis 1983).

Προσπάθειες έρευνητών από το έξωτερικό για άπλουστευση της διαφοροποιητικής δοκιμής (Shubert 1971, Fennell 1972, Mara 1973, Pugsley και συν. 1973) δέν έγιναν εύρέως άποδεκτές.

Τελευταία όμως στα έργαστήρια Δημόσιας Ύγείας της Άγγλίας χρησιμοποιήθηκε και βρέθηκε ίκανοποιητικός ο ζωμός Λαουρονικού-Τρυπτόνης-Μαννιτόλης (LTMB), θρεπτικό ύλικό που προτείνεται για την καθημέρα χρήση (PHLS και SCA 1980).

Στην σημερινή μας έργασία παρουσιάζουμε τα άποτελέσματα από την σύγκριση του δικού μας θρεπτικού ύλικού (LTLSB) προς πρό το ύλικό των έργαστηρίων Δημόσιας Ύγείας της Άγγλίας (LTMB).

#### ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Κατά την μικροβιολογική εξέταση με την μέθοδο των Πολλαπλών Σωλήνων 277 δειγμάτων νερού, (101 πόσιμα, 110 θαλάσσια, 50 ποταμών, 6 κολυμβητικών δεξαμενών και 10 άπόβλητα βιομηχανιών) από κάθε θετική για Κωλοβακτηριοειδή καλλιέργεια έμβολιάζονταν συγχρόνως δύο θρεπτικά ύλικά: α) ο ζωμός Λακτόζης-Τρυπτόνης-Λαουρονικού (LTLSB) και β) ο άγγλικός ζωμός Λαουρονικού-Τρυπτόνης-Μαννιτόλης (LTMB).

Έ επώαση και των 2 ύλικών έγινε στο ίδιο ύδατόλουτρο ( $44^{\circ}\text{C} \pm 0,2$ ) και κατά

τὸ ἴδιο χρονικὸ διάστημα (24 - 48 ὥρες). Μετὰ τὴν ἐπώαση, σὲ ὅσους σωλῆνες εἶχαν ἀέριο, γινόταν ἡ προσθήκη ἀντιδραστηρίου γιὰ τὴν ἀνίχνευση ἰνδόλης. Σὲ ὅλους τοὺς σωλῆνες τῶν δύο ὑλικῶν ποὺ παρουσίαζαν διαφορὰ ἀποτελέσματος καὶ σὲ ἀρκετοὺς τυπικὰ θετικοὺς καὶ ἀρνητικοὺς σωλῆνες ἔγινε μία σειρά ἐπιβεβαιωτικῶν δοκιμασιῶν γιὰ ἔλεγχο τοῦ ἀποτελέσματος.

#### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ — ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ἀπὸ τὶς 2.041 δοκιμασίες ποὺ ἔγιναν συγχρόνως καὶ μὲ τὰ δύο θρεπτικὰ ὑλικά ὁ ζωμὸς LTLSB ἔδωσε 1.438 θετικὲς ἀντιδράσεις (δηλαδή παραγωγή ἀερίου καὶ ἰνδόλης) καὶ ὁ ἀγγλικὸς ζωμὸς LTMB 1.401. Κατὰ τὴν ἐπιβεβαίωση βρέθηκε ὅτι 2 σωλῆνες καὶ ἀπὸ τὰ δύο ὑλικά ἦταν ψευδῶς θετικοί, ἀλλὰ σημαντικὴ διαφορὰ παρατηρήθηκε στοὺς ψευδῶς ἀρνητικοὺς (πίνακας 1). Μετὰ τὴν ἀφαίρεση τῶν ψευδῶς

#### Π Ι Ν Α Κ Α Σ 1

Ἀντιδράσεις δύο θρεπτικῶν ὑλικῶν σὲ 2041 δοκιμασίες στοὺς 44°C κατὰ τὴν ἐξέταση δειγμάτων νεροῦ.

ὕλικό	θετικὲς ἀέριο+ ἰνδόλη	ἀρν/κῆς	ψευδῶς θετικὲς	ψευδῶς ἀρν/κῆς	Ἐπιβ/ση
LTLSB <sup>1</sup>	1438	603	2	1	581
LTMB <sup>2</sup>	1401	640	2	37	581

1. Ζωμὸς Λακτόζης-Τρυπτόνης-Λαουρονικοῦ Νατρίου (ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ).

1. Ζωμὸς Λαουρονικοῦ Νατρίου-Τρυπτόνης-Μαννιτόλης (ΑΓΓΛΙΚΟΣ).

θετικῶν σωλῆνων προκύπτει ὅτι τὸ ὑλικὸ LTLSB ἀνίχνευσε τὸ Κλωσβακτηρίδιο σὲ 1436 δοκιμασίες ἐνῶ τὸ ὑλικὸ LTMB σὲ 1399. Ἡ διαφορὰ μεταξὺ τῶν δύο ὑλικῶν σύμφωνα μὲ τὸ στατιστικὸ κριτήριον  $\chi^2$  κατὰ ζεύγη (Paired  $\chi^2$ ) εἶναι πολὺ σημαντικὴ (Paired  $\chi^2$ -Yates correction = 32,2,  $P < 0.001$ ).

Σχεδὸν ὅλες οἱ ψευδῶς ἀρνητικὲς ἀντιδράσεις τοῦ ὑλικοῦ LTMB ὀφείλονται στὴν ἀδυναμία ἀνιχνεύσεως τῆς ἰνδόλης.

Γενικά τὸ ἀγγλικὸ ὑλικὸ LTMB δίνει ἀσθενέστερη τὴν ἀντίδραση ἰνδόλης. Σὲ μία σειρά 335 θετικῶν δοκιμασιῶν ποὺ καταγράφηκε ἡ ἔνταση τῆς ἀντιδράσεως (πίνακας 2) προκύπτει ὅτι τὸ 99,1 % ἀντιδράσεων τοῦ ὑλικοῦ LTLSB ἔχει ἔνταση 2+ ἕως 4+ ποὺ ἐπιτρέπει σαφὴ ἀνάγνωση τοῦ ἀποτελέσματος ἐνῶ στὸ ὑλικὸ LTMB



τὸ ποσοστὸ αὐτὸ εἶναι 79,1 %. Στὸ δεύτερο δηλαδή ὑλικὸ τὸ 1/5 τῶν ἀντιδράσεων εἶναι τόσο ἀσθενεῖς πὺ ἐνδέχεται νὰ ἀναγνωσθοῦν καὶ σὰν ἀρνητικές.

Γιὰ τὸν ἔλεγχο αὐτῆς τῆς πιθανότητος μία σειρὰ 522 δοκιμασιῶν καὶ τῶν

## Π Ι Ν Α Κ Α Σ 2

Ἔνταση ἀντιδράσεως ἰνδόλης στὰ δύο θρεπτικὰ ὑλικά LTLSB\* καὶ LTMB\*.

Ἔνταση ἀντιδράσεως	LTLSB % (ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ)	LTMB % (ΑΓΓΛΙΚΟΣ)
++++	289 86,3	163 48,6
+++	35 10,4	42 12,5
++	8 2,4	60 17,9
+	3 0,9	70 20,9

\*Ἰδὲ πῖνακα 1.

δύο ὑλικῶν δόθηκε πρὸς ἀνάγνωση σὲ δύο πεπειραμένα ἄτομα τοῦ προσωπικοῦ τοῦ ἐργαστηρίου. Ὅπως φαίνεται ἀπὸ τὰ ἀποτελέσματα ἀναγνώσεως τῆς ἰνδόλης σὲ 681 σωλῆνες (πῖνακας 3) στὸ δικὸ μας ὑλικὸ καὶ τὰ δύο ἄτομα ἀναγνώρισαν τὸν ἴδιο ἀριθμὸ θετικῶν καὶ ἀρνητικῶν ἀντιδράσεων ἐνῶ στὸ ἀγγλικὸ ὑλικὸ (LTMB) τὸ ἕνα ἀπὸ τὰ 2 ἄτομα ἀναγνώρισε 36 λιγότερες θετικὲς ἀντιδράσεις ἰνδόλης.

Τέλος ἕνα ἄλλο σημεῖο ὑπεροχῆς τοῦ ὑλικοῦ LTLSB εἶναι ὅτι παραγωγή ἀερίου

## Π Ι Ν Α Κ Α Σ 3

Ἀνάγνωση ἀντιδράσεως ἰνδόλης στὰ δύο θρεπτικὰ ὑλικά ἀπὸ δύο ἄτομα σὲ 681 δοκιμασίες.

ὑλικὸ	Ἀτομο +	Α -	Ἀτομο +	Β -
LTLSB* (ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ)	522	159	522	159
LTMB* (ΑΓΓΛΙΚΟΣ)	521	160	485	196

\* Ἰδὲ πῖνακα 1

μέ αρνητική την ινδόλη παρατηρήθηκε μόνο σε 42 σωλήνες (ποσοστό 2,9 % στους θετικούς) ενώ στο ύλικό LTMB οι σωλήνες με άεριο και αρνητική ινδόλη ήταν 287 (ποσοστό 20,5 % στους θετικούς). Αυτό σημαίνει ότι κατά την χρησιμοποίηση του Άγγλικού ύλικού πραγματοποιούνται πολλές επιπλέον αντιδράσεις για έλεγχο ινδόλης, γεγονός που αυξάνει τó κόστος και τόν χρόνο άπασχόλησης τού προσωπικού.

Συμπερασματικά από την σύγκριση τών δύο θρεπτικών ύλικών προκύπτει σαφής, πολλαπλή ύπεροχή με στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $P < 0,001$ ) τού δικού μας ύλικού LTLBSB έναντι τού προτεινομένου από την ύπηρεσία έργαστηρίων Δημόσιας Ύγείας τής Άγγλίας.

#### S U M M A R Y

### EVALUATION OF THE NEW MEDIUM LTLBSB FOR THE RAPID DIFFERENTIATION OF *E. COLI* IN WATER AND FOOD BACTERIOLOGICAL EXAMINATION

As a result of long effort to simplify the bacteriological examination of water a new formulation, the lactose-tryptone-lauryl sulfate broth (LTLBSB) was prepared. The new medium permits the differentiation of *E. coli* from other coliform organisms in a single-tube technique instead the two-tubes, two-media technique traditionally used for differentiation tests at 44°C. The new medium (LTLBSB) was compared in a series of 2,041 tests against the lactose-tryptone-mannitol broth (LTMB) a single-tube medium recently proposed by English workers.

The comparison shows a clear superiority of the LTLBSB over the LTMB ( $P < 0,001$ ). The main advantage of LTLBSB is that it gives a strong and clear indole reaction which can be easily recognised.

#### B I B Λ Ι Ο Γ Ρ Α Φ Ι Α

1. Γ. Π. Άλιβιζάτος και Α. Έμμανουηλίδου, 'Η βράχυνση τού χρόνου εξέτασεως τού ύδατος κατά την πρότυπον άμερικανικήν μέθοδον διά τά κωλοβακτηριδιόμορφα διά τής συγχρόνου διαπιστώσεως τινών τών χαρακτήρων τούτων κατά την έν λόγω δοκιμήν. Άρχεϊα Ύγιεινής, Ιούλιος - Σεπτέμβριος σελ. 215, 1950.
2. G. P. Alivizatos, A. Emmanouilidou and K. Valla, A new medium for the coliform test in the examination of water. VI Congresso Internazionale di Microbiologia, Roma, 1, 863, 1953.

3. Γ. Π. Ἀλιβιζάτος, Α. Ἐμμανουηλίδου - Ἀρσένη καὶ Κ. Βάλλα-Κανελλάκη, Ἀποτελέσματα τῆς βραχείας μεθόδου μικροβιολογικῆς ἐξέτασως τοῦ ὕδατος. Ἀρχεῖα Ὑγιεινῆς, σελ. 181, 1955.
4. H. Fennell, A single tube confirmatory test for *E. coli* at 44°C. *Water treatment and Exam.* **21**, 13, 1972.
5. E. F. N. Mackenzie, E. W. Taylor and W. Gilbert, Recent experiences in the rapid identification of *Bacterium coli* type I. *J. Gen. Microbiol.* **2**, 197, 1948.
6. D. D. Mara, A single medium for the rapid detection of *Escherichia coli* at 44°C. *J. Hyg. Camb.* **71**, 783, 1973.
7. Ι. Α. Παπαδάκης, Μικροβιολογικαὶ καὶ ὑγειονομικαὶ ἔρευναι ἐπὶ τῶν θαλασσίων ὕδατων ἐν Ἑλλάδι. Διατριβὴ ἐπὶ ὑφηγεσίᾳ. Ἀθῆναι, 1971.
8. Ι. Α. Παπαδάκης, Ζωμὸς λακτόζης-τρυπτόνης-κινινελαϊκοῦ νατρίου. Ἐν νέον θεραπευτικὸν ὕλικόν διὰ τὴν ἀπλούστευσιν τῆς μεθόδου ἀνιχνεύσεως τοῦ κωλοβακτηριδίου (*E. coli*) κατὰ τὴν μικροβιολογικὴν ἐξέτασιν τοῦ ὕδατος. Πρακτικὰ 5ου Ἐθνικοῦ Συνεδρίου Μικροβιολογίας, σελ. 95, 1972.
9. J. A. Papadakis, A single tube medium, Lactose-tryptone-ricinoleate broth, for coliform differentiation test at 44°C, in water and food bacteriology *Proceedings 8th Intern. Symposium, W.A.V.F.H., Dublin, Ireland*, p. 309, 1981.
10. J. A. Papadakis, *Comparison of single tube media for coliform differentiation test at 44°C. Proceedings IUMS-ICFMH, 12th International Symposium on Microbial Associations and Interactions in Food, Budapest, Hungary*, p. 153, 1983.
11. J. A. Papadakis and Mavridou, Lactose-tryptone-ricinoleate broth (LTR), a single-tube medium for coliform differentiation test at 44°C. *Proceedings World Congress Foodborn Infections and Intoxications, Berlin, I. V. M. Robert von Ostertag Institute*, p. 706, 1980.
12. PHLS and SCA, Single tube confirmatory tests for *Escherichia coli* by a Joint Committee of the Public Health Laboratory Service and the Standing Committee of the Analysts. *J. Hyg. Camb.* **85**, 51, 1980.
13. A. P. Pugsley, L. M. Evison, A. James, A single technique for the differentiation of *Escherichia coli* in water examination. *Wat. Res.* **7**, 1431, 1973.
14. R. H. W. Schubert, Zur Optimierung der Flüssigkeits-anreicherung von *Escherichia coli* in Rahmen der Wasseruntersuchung. *Arch. Hyg. Bact.* **145**, 500, 1971.
15. WHO, *International Standards for Drinking Water*. Geneva, 1971.