

Hva finnes på innsiden av kranarmaturer?

Av Colin Charnock, Eli Otterholt og Anne-Lise Nordlie

Colin Charnock er mikrobiolog og professor ved Høgskolen i Oslo og Akershus (HiOA). Eli Otterholt er utdannet PhD fra HiOA. Anne-Lise Nordlie er bioingeniør og høgskolelektor ved HiOA.

Summary

What is found on tap inner surfaces?

Tap inner surfaces can come into contact with microbes present in drinking water as well as those on hands, in food and in the air. It was hypothesized that taps could house pathogenic microbes originating in drinking water and/or their surroundings. In order to investigate this possibility, the microbiological quality of 87 taps was expressed as their heterotrophic plate count (which can give an indication of biofilm formation) and content of *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus aureus* (which can cause intestinal disease and food poisoning). In addition, the presence of free-living aerobic protozoa was investigated. Only one tap was contaminated with *S. aureus*. Two taps were contaminated with a small number of *Enterobacteriaceae*. Three taps housed cyst-producing amoebae; among these was *Acanthamoeba polyphaga* which can cause serious corneal infections. The aerobic plate count varied greatly (0/mL - 100,000/mL). Taps do not seem to be

an important source of the chosen pathogenic/indicator bacterial species. However, the large variation in their general bacterial burden quality and the presence of free-living amoebae is a cause for concern.

Sammendrag

Innsiden av vannkraner kommer i kontakt med både mikrober som er til stede i drikkevann og de som finnes på hender, matrester og i luften. En hypotese er at kranbiofilmer kan være tilholdssted for sykdomsfremkallende mikroorganismer med opphav i både drikkevann og omgivelsene. For å undersøke denne muligheten, ble den mikrobiologiske kvaliteten ved 87 kraner bedømt i forhold til de hygieniske indikatorene *Enterobacteriaceae* og *Staphylococcus aureus* (som begge kan gi mage-tarminfeksjoner og matforgiftning) og heterotroft kimtall som kan gi en indikasjon på dannelse av biofilm. I tillegg ble tilstedeværelsen av frittlevende aerobe protozoer undersøkt. Kun én kran

var kontaminert med *S. aureus*. To kraner var kontaminert med et fåtall *Enterobacteriaceae*. Tre kraner var kontaminert med cysteproduserende amøber, blant annet *Acanthamoeba polyphaga*, som kan være årsak til alvorlig hornhinnebetennelse. Det var stor spredning i det aerobe kimtallet (0/mL - 100, 000/mL). Kraner synes ikke å være en viktig kilde til de utvalgte patogener/indikatorbakteriene. Imidlertid gir den store variasjonen i heterotroft kimtall og tilstedeværelsen av frittlevende amøber grunn til ettertanke.

Innledning

Kranarmaturer kommer i kontakt med mikrober som er til stede i drikkevannet. I tillegg er de utsatt for mikrober med opphav i omgivelsene (for eksempel bade- og kjøkkenmiljøet). Andre faktorer som kan ha betydning for kolonisering av kranen, er dens alder, materialer, bruksfrekvens, avkalkning og om det føres både varmt- og kaldtvann. Kranvann har også blitt brukt til vask og oppbevaring av kontaktlinser og det er dokumentert øyeinfeksjoner forårsaket av frittlevende amøber (FLA) med opphav i vann: svaberprøver av kraner og avløpsrør i hus har vist tilstedeværelse av FLA inkludert medlemmer av den øyepatogene slekten *Acanthamoeba* (Kilvington et al., 2004; Seal et al., 1992). Genotyping av *Acanthamoeba* isolert fra pasienter med hornhinnebetennelse viste at amøbene i noen tilfeller var identiske med stammer funnet på innsiden av kraner i den smittedes hus (Kilvington et al., 2004).

Om lag 50-80 % av matrelaterte sykdommer i Europa har opprinnelse i

hjemmet (Scott, 1996). De vanligste kontaminerende bakteriene er *Enterobacteriaceae*. Tilstedeværelsen av denne gruppen, især *Escherichia coli*, indikerer fekalkontaminering. Ved bruk av svabermetoden er det blitt påvist *Enterobacteriaceae* på kranhåndtak og andre overflater i hus (Haysom and Sharp, 2005 og siterte referanser). *Staphylococcus*-arter, som kan forårsake både hudinfeksjoner og matforgiftning, er også hyppig isolert. Vannkraner som kilde til *S. aureus* er ikke godt undersøkt. Til tross for artens kjente kobling til klinisk materiale kan tilstedeværelsen av denne arten i vann og på kranoverflater være vanligere enn forventet, noe de få tilgjengelige studiene kan tyde på. To tidligere undersøkelser av springvann i landlige områder viste at 6-8% av prøvene inneholdt *S. aureus* ved konsentrasjoner på inntil 600/100 mL. Blant isolatene var toksinproduserende stammer (Lamka et al., 1980; LeChevalier and Seidler, 1980). I en undersøkelse av 160 vannprøver hentet fra tannlegekontorer, inneholdt 85 % denne arten (Lancellotti et al., 2007). Det som synes å være den eneste publiserte studien om *S. aureus* på innsiden av vannkraner, dokumenterer tilstedeværelsen av et lavt (ikke spesifisert) antall bakterier. Noen av disse var både oksacillin- og vancomycinresistente. Dessuten var 56 % av testede kraner kontaminert med stafylokokker mens kun 20 % av vannprøvene var det (Abulreesh and Organji, 2011). Dette kan indikere dannelse av biofilm. Det kan være flere grunner til bekymring når *S. aureus* blir påvist i vannprøver: det er dokumentert et tilfelle av matforgiftning

koblet til skylning av hardkokte egg med kontaminert vann, dessuten synes selv små mengder av enterotoksin å være tilstrekkelig til å utløse en reaksjon (LeChevallier and Seideler, 1980 og siterte referanser).

Kontaminering av kraner kan potensielt føre til spredning av mikrober til mennesker og næringsmidler. Herværende studie har som mål å undersøke den mikrobiologiske kvaliteten til vannkraner i Norge målt som en serie biomarkører: det totale aerobe heterotrofe kintallet, *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* og frittlevende protozoer.

Materialer og metoder

Prøvetaking

Svaberprøver av i alt 87 kraner (i hovedsak kjøkkenkraner med kombinert varmt og kaldtvann) ble tatt av deltakerne i prosjektet etter en standardisert protokoll: prøver ble tatt tidlig om morgnen før tapping av vann. Tuppen på kranen ble skrudd av og filteret ble fjernet. Deretter ble krummen på kranen dunket forsiktig flere ganger for å få ut mest mulig oppsamlet vann. RediSwab® våte svaber (3M™, MN, USA) ble brukt til å skrape innsiden av kranen både like ved åpningen og så langt inn som mulig. Mellom rundene med skrapping (i alt 3) ble svaberen returnert til beholderen (med 1.1 ml letheen buljong). Svaberen ble fraktet sammen med et kjøleelement til laboratoriet og testet innen 5 timer.

Petrifilm®-analyser

For å øke volumet for videre analyser ble buljongen i beholderen tilsatt 3 ml 0,9%

NaCl og deretter ble innholdet ristet i 10s på en whirlimix på full effekt for å homogenisere biofilmen. Bakterier ble dyrket på petrifilmer (3M Health Care, MN, USA). Petrifilmer er små, flate plater dekket med et tynt lag av uttørket nærings- eller selektivagar. Filmene ble rehydrert ved å applisere 1ml prøve slik at det ble dannet et fast vekstmedium for mikrobene. Følgende petrifilm-typer ble benyttet: Aerobic Total Count (TC), Staph Express Count System (STX) og *Enterobacteriaceae* Count Plate (EB). I tillegg ble 0,01 mL overført til 1 mL 0,9 % NaCl og denne ble brukt til å rehydrere ytterligere 1 TC-petrifilm. Resten av den fortynnede buljongen (~ 1 mL) og svaberhodet ble overført til et testmedium for frittlevende aerobe protozoer (se under). Kolonier på TC ble telt etter inkubering i 48 t ved 36 ± 1 °C. Kolonier på STX ble telt etter inkubering i 24 t ved 36 ± 1 °C. Kolonier på EB ble telt etter inkubering i 24 t ved 36 ± 1 °C. Inkuberingstider og -temperaturer fulgte anbefalinger i produktinnleggene.

Påvisning av *S. aureus* på STX

STX består av et tynt lag med et modifisert, kromogent Baird-Parker (BP) agar. I tråd med bruksanvisningen ble alle rød fiolette, sorte og blågrønne kolonier på STX telt. Alle (minst 5) kolonier ble overført til standard BP-skåler (Oxoid, UK) som så ble inkubert som beskrevet for STX. Sorte kolonier på BP-skåler ble videre testet for tilstedeværelse av *S. aureus* klumpingfaktor og protein A ved hjelp av en kommersiell agglutinasjonstest (PROLEX™ Staph Late Kit, PRO-LAB,

Canada). Stammer som testet positivt i agglutinasjonstesten og/eller dannet sorte kolonier omringet av soner på BP, ble identifisert gjennom sekvenseringsstudier. *S. aureus* DSM 799 og ATCC 25923 ble brukt som kontrollstammer. *S. aureus* ble undersøkt for MRSA-fenotypen basert på evnen til å vokse på kromagar tilsatt cefoxitin og inntil lapper tilsatt oksacillin (1 mg).

Identifikasjon av kolonier på EB

EB består av modifisert rødfiolett galleagar med glukose tilsatt et tetrazolium indikatorstoff. I tråd med produsentens anbefalinger ble følgende typer kolonier klassifisert som *Enterobacteriaceae*: (a) røde kolonier omringet av en gul sone og/eller (b) røde kolonier omgitt av bobler. Slike kolonier ble overført til tryptonsoya agar (Oxoid) og identifisert ved hjelp av et brettssystem (Roscozym™-Ent test; Rosco Diagnostica A/S, Denmark). Uricult®-Trio (Medinor AS, Norway) kontaktplater (dip slides) som inneholder flater med MacConkeys og *E. coli* spesifikke agarer ble også brukt. *E. coli* ATCC 25922 var inkludert som standard.

Påvisning av aerobe, frittlevende protozoer

Svaberhodet og ~ 1 mL prøve ble overført til *non-nutrient agar*, NNA (CCAP, Scotland) NNA-skåler ble tilsatt ca 5 mL varme-inaktivert (65 °C i 30 min.) *E. coli* ATCC 25922 i 0,9 % NaCl. Skålene ble forseglede med parafilm og inkubert i et fukt-kammer i mørket ved 22 ± 2 °C. Skålene ble regelmessig undersøkt i mikro-

skopet for protozoer og cyster over en periode på en uke. Frittlevende amøber (FLA) var identifisert basert på både trofozoitt- og cysteformen, samt delvis sekvensering av 18S rDNA-genet (se sekvenseringsstudier under).

Sekvenseringsstudier

Koloni-PCR av 16S rRNA-genet: Om lag 590 basepar (bp) av 16S rRNA-genet ble oppkonsentrert og sekvensert akkurat som beskrevet tidligere (Otterholt og Charnock, 2011a). Primer-sekvenser og dårlig sekvensdata ved endene ble fjernet og sekvensene ble sammenlignet for likhet med andre sekvenser i GenBank-databasen ved hjelp av verktøyet BLAST [basic local alignment search tool] (Altschul et al., 1990).

PCR av 18S rRNA-genet: den genetiske identiteten til FLA ble fastslått gjennom PCR og sekvensering av en del av 18S rRNA-genet (ca 600 bp) som tidligere beskrevet (Otterholt and Charnock, 2011b). I ett tilfelle viste elektroforese av PCR-produktet tilstedeværelse av 2 bånd. Hvert bånd ble rensset ved hjelp av Gel-M™ Gel Extraction System (Viogene, Taiwan) og brukt direkte til sekvensering. Sekvenssøk ble utført som beskrevet over.

Statistikk

Statistikk-funksjonene i Excel® (Microsoft, Washington, USA) og GraphPad Prism® 5.0 software (La Jolla, CA, USA) ble benyttet til analyse av datasettet. Resultatene er gitt som gjennomsnittsverdier, 'unbiased' standardavvik fra gjennomsnittsverdiene, og middelveidene.

Log-10 transformerte data (med addisjon av + 1 til nullverdier før transformasjon) ble brukt i sammenligninger. $\alpha = 0,05$ ble brukt som terskel for signifikanstesting. Før sammenligninger ble en F-test brukt for å vise om variansen i uavhengige datasett var signifikant. For å undersøke om datasettet var normal-distribuert, ble D'Agostino and Pearsons omnibus-test benyttet. En uavhengige gruppers t-test ble brukt for å undersøke mulige forskjeller mellom resultater for ute- og innekran. Spearman's rank-korrelasjon ble brukt til å undersøke korrelasjoner mellom kolonitallet på STX- og TC-petrifilmer.

Resultater og diskusjon

Aerobt kimtall (TC)

I alt 88 prøver (87 kraner) ble undersøkt for tilstedeværelsen av heterotroft kimtall (TC), *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* og frittlevende aerobe protozoer. TC-verdier gir et mål på generell mikrobiologisk kvalitet og høye tall kan indikere biofilmdannelse. Testing for de andre mikrobenes fremskaffet informasjon om grupper med mer spesifikk relevans for helse. De fleste testede kranene (74) var kombinerte kjøkken varmt- og kaldtvannsansamler, 9 var kombinerte kraner på bad og/eller toaletter og 3 var utendørs kaldtvannskraner. I tillegg ble 1 kaldtvannsdispenser (springvann) og 1 dusjslange testet.

For de 88 prøvene ble det målt TC mellom 0/mL (15 prøver) og meget høye verdier, >100,000/mL (4 prøver). Følgende deskriptive statistikk (gjennomsnittsverdien \pm SA; middelværdien) gjel-

der for datasettet på 88 prøver: (16275 \pm 63689; 94). For kombinerte kjøkkenkraner (N= 74) og bad-/toalettkraner (N = 9) var de tilsvarende verdiene henholdsvis 18263 \pm 69106; 94 og 8702 \pm 16639; 440. For å sammenligne TC-verdier for kjøkken og bad-/toalettkraner ble en uavhengige gruppers t-test utført på log-transformerte talldata. T-statistikken var ikke signifikant, $t(81) = 1.158$, $p = 0.25$ (*two-tailed*). Dette indikerer at kranens plassering i huset ikke er en signifikant faktor for dens generelle hygieniske kvalitet.

Identifikasjon av *Enterobacteriaceae*

Kun 2 prøver (begge var kombinerte kjøkkenkraner) ga kolonier på EB. Koloniene var typiske for *Enterobacteriaceae* (se metoddelen). Roscozym-ENT identifiserte den ene bakterien som enten *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens* eller *Koserella trabulsi* (ID code = 1430) og den andre som enten *Kluyvera* spp. eller *Averyella dalhousiensis* (ID code 5630). En vurdering av litteraturen tyder på at ingen av disse artene er vesentlig sykdomsfremkallende eller har relevans som hygieniske indikatorer (Podschun et al., 2001; Sarria et al., 2001; Johnson et al., 2005). Dermed ble det ikke gjort forsøk på å komme fram til en definitiv identifikasjon. Dessuten vokste ingen av koloniene på *E. coli*-spesifikk agar. Biofilmer i kraner synes dermed ikke å inneholde kjente enteriske patogene bakterier.

Identifikasjon av kolonier på STX

Ifølge produsenten er STX-petrifilm selektiv og differensiell for *S. aureus*, men

også andre koagulase-positive staphylokokker, som for eksempel *S. hypicus*, *S. intermedius* og *S. schleiferi*, kan gi kolonier som ligner på *S. aureus* kolonier. Disse artene er relevante i veterinærmedisinsk sammenheng (Sasaki et al., 2010). Det er ukjent i hvilken grad koloniene på STX som ikke var *S. aureus* var andre stafylokokker. Det var en positiv og signifikant korrelasjon mellom kimtallene på TC og STX ($\rho = 0.56$; $p = 0.0028$ (one tailed), $N = 23$). Om koloniene på

STX var stafylokokker, indikerer denne statistikken at kraner som er koloniserte med et høyt antall kim også har en større sjanse til å inneholde medlemmer av denne slekten. En slik korrelasjon er blitt rapportert tidligere for drikkevann (Lamka et al., 1980). Av i alt 86 prøver, ga 26 % kolonier på STX petrifilm. Spredningen i datasettet var 2 – 1000/mL. Dermed kan en betydelig andel av huskraner være kolonisert med arter med potensiell signifikans for menneske- og

	Nærmeste slektning ^a (GenBank Accession number)	Sekvensen-lengden (bp)	%-vis likhet med nærmeste slektning	Kommentarer/GenBank Accession Number
(1)	<i>Hartmanella vermiformis</i> (AB525836.1)	577	99	Fra kombinert kran (bad/toalett)/ JQ361080
(2)	<i>Acanthamoeba polyphaga</i> (U07415.1)	698	100	Fra utendørs kaldtvannskran ^b / JQ361081
(3)	<i>Hartmanella vermiformis</i> (AB525836.1)	577	99	Fra utendørs kaldtvannskran ^b / JQ361082
(4)	<i>Hartmanella vermiformis</i> (AY502960.1)	577	100	Fra kombinert kran (bad/toalett) ubrukt i en uke/ JQ361083
(5)	<i>Staphylococcus warneri</i> ^c (JN644590.1) <i>Staphylococcus pasteurii</i> ^c (FR839699.1/JN257087.1)	511	100	Fra dusjslange/ JQ361084
(6)	<i>Staphylococcus aureus</i> (FR821779.1)	553	100	Fra kombinert kran (bad/toalett) brukt i en uke hver måned/ JQ361085

^a sammenligninger er med tidligere rapporterte sekvenser. Maksimumsidentitet er basert på likhet over hele det sekvenserte området

^b 2 FLA ble påvist i den samme prøven

^c Maksimumsidentitet med de fleste *S. aureus*-sekvenser var 99%. Det var 100% likhet med én publisert sekvens.

Tabell 1. Identifikasjon av mikrober isolert fra innsiden av kraner basert på 16S/18S rDNA-gensekvensering

dyrehelse. Imidlertid var *S. aureus* kun til stede på en av i alt 27 STX petrifilmer med kolonier (~280/mL). Isolatet viste ikke meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)-fenotypen. Kranen som var opphav til *S. aureus* var kun i bruk i en uke i hver måned. Bruksfrekvensen kan da være en faktor med relevans for kontaminering med *S. aureus*. Ingen andre STX-kolonier ga en positiv agglutinasjonstest og kun en annen prøve ga klassisk *S. aureus*-lignende vekst på BP. Dette isolatet hadde opphav i en dusj-slange og ikke i en kran. Gensekvenseringsstudier indikerer at denne arten sannsynligvis var enten *S. pasteurii* eller *S. warneri*, tabell 1, og disse artene bør da tilføres produsentens liste over arter som ligner *S. aureus* på STX. *S. pasteurii* and *S. warneri* er koagulase-negative staphylococci (CoNS). CoNS er lenge blitt sett på som en del av den naturlige saprofyttiske floraen. Imidlertid har noen CoNS i løpet av de 2 siste tiår blitt vesentlige i forbindelse med infeksjoner hos immunsvekkede verter (Brigante et al., 2008).

Det konkluderes med at petrifilmer kan være nyttige for isolasjon av *S. aureus* fra kraner, men at denne arten sjelden er til stede, i hvert fall i Norge. Abdulreesh og Organji, (2011) fant *S. aureus* på innsiden av kraner og på kranfiltere. Resistensbestemmelsestesting viste også tilfeller av oksacillin- og vancomycinresistens. Denne studien ble utført i Saudi-Arabia hvor både klimaet og drikkevannskvaliteten er vesentlig annerledes enn i Norge og flere studier må nå til for å kartlegge artens utbredelse i vannsystemer.

Tilstedeværelsen av frittlevende protozoer i kraner

Kun 3 prøver viste tilstedeværelsen av protozoer. I alle tilfeller var det frittlevende amøber (FLA) som ble funnet. En utendørs kaldtvannskran var kontaminert med 2 FLA-arter. De 2 andre prøvene som testet positivt for FLA var kraner på bad/toalett (kombinert varmt/kaldt vann). Metoden som ble brukt for isolasjon av protozoer er tidligere vist seg å være egnet for et bredt spekter av ciliater, flagellater og amøber (Otterholt and Charnock, 2011b). Funn av kun amøber kan forklares med tilstedeværelsen av disse i kraner i form av varmere-sistente cyster. Tre av totalt 4 FLA arter var *Hartmannella vermiformis*. Den siste var den hornhinne-patogene *Acanthamoeba polyphaga* (Tabell 1). *A. polyphaga* cyster kan tåle høye og lave temperaturer, uttørking og desinfeksjon (Marcianon-Cabral and Cabral, 2003). Disse egenskapene er sannsynligvis nødvendige for å overleve i kran som fører varmt vann. Svaberprøver av kraner på kjøkken og bad har tidligere vist FLA inkludert *Acanthamoeba*-arter (Seal et al., 1992; Kilvington et al., 2004). Selv om *Acanthamoebae* er vanlige i mange miljøer (Page, 1988), er funn av *A. polyphaga* allikevel viktig: mitokondrielt DNA-genotype fra amøber isolert fra pasienter med *Acanthamoeba* hornhinnebetennelse var i noen tilfeller identiske med amøber isolert fra kransvaber i den smittede hus (Kilvington et al., 2004). Funnet tyder på at kontaminerte kraner kan være kilde til FLA-infeksjoner. Bruk av kranvann til skylling og oppbevaring av

kontaktlinser er blitt foreslått som en sannsynlig rute for øyeinfeksjon med *Acanthamoeba* (Kilvington et al., 2004 og siterte kilder). Tilfeller av alvorlig kontaktlinserelatert *Acanthamoeba* hornhinnebetennelse er også tidligere blitt dokumentert i Norge (Aasly and Bergh, 1992). Også her ble kontaminert vann brukt til vask av linsene mistenkt som sannsynlig kilde.

H. vermiformis utgjorde 3 av 4 FLA funn. Denne og andre *Hartmannella*-arter er tidligere påvist i varmtvannsprøver og *H. vermiformis* er den dominerende FLA i springvann og i kjøletårn (Cateau et al., 2008 og siterte kilder). *H. vermiformis* er mindre viktig enn *Acanthamoeba* i infeksjonssammenheng, men infeksjoner er blitt rapportert. Arten er blitt isolert fra spinalvæske til en pasient med *meningococcal* og bronchopneumoni (Centeno et al., 1996). Det er i tillegg noen rapporterte tilfeller av hornhinneinfeksjoner med *H. vermiformis* (Aitken et al., 1996; Kennedy et al., 1995). En annen, mye diskutert bekymring i forhold til FLA, inkludert *Acanthamoeba*- og *Hartmannella*-arter, er rollen de kan spille som *Trojanske hester* i spredningen av sykdomsframkallende arter som for eksempel *Legionella pneumophila* og *Mycobacterium*-arter: disse artene kan overleve og formere seg i amøber hvor de er beskyttet fra desinfeksjonsmidler. Leseren henvises til Thomas and Ashbolt (2011) for en oversikt over dette temaet.

Konklusjoner

Studien har vist at kranarmaturer sannsynligvis ikke er en vesentlig kilde til enteriske gramnegative patogene bakterier,

men kan være en kilde til både frittlevende amøber og *S. aureus*. Selv om et fåtall *S. aureus* i drikkevann ikke kan vurderes som en vesentlig helserisiko, ville situasjonen være en annen om multiresistens blir påvist ved isolatene.

Det heterotrofe kimtallet viste stor variasjon og i noen tilfeller ble svært høye tall (> 100,000/mL) registrert. Dette tyder på biofilmdannelse og er et potensielt viktig funn. Identifikasjon eller gruppering av kimtallet er nå ønskelig for å evaluere dens relevans for folkehelsen. Framtidig arbeid bør også være rettet mot å identifisere faktorene som bidrar til de store variasjonene i kimtallet, slik at kraner kan bli produsert og vedlikeholdt på en måte som holder kontaminasjonen på et lavt nivå.

Referanser

- Aasly, K., Bergh, K., 1992. *Acanthamoeba* keratitis; report of the first Norwegian cases. *Acta Ophthalmol.* 70, 698-701.
- Abdulreesh, H.H., Organji, S.R., 2011. The prevalence of multidrug-resistant *Staphylococci* in food and the environment of Makkah, Saudia Arabia. *J. Microbiol* 6, 510-513.
- Aitken, D., Hay, J., Kinnear, F.B., Kirkness, C.M., Lee, W.R. Seal, D.V., 1996. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* infection. *Ophthalmol.* 103, 485-494.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local

alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.

Brigante, G., Grazia Menozzi, M., Pini, B., Porta, R., Somenzi, P., Sciacca, A., Spanu, T., Stefani, S., 2008. Identification of Coagulase-Negative Staphylococci by Using the BD Phoenix System in the Low-Inoculum Mode. *J. Clin. Microbiol.* 11, 3826-3828.

Cateau, E., Imbert, C., Rodier, M.,-H., 2008. *Hartmannella vermiformis* can be permissive for *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 475-477.

Centeno, M., Rivera, F., Cerva, L., Tsutsumi, V., Gallegos, E., Calderón, A., Ortiz, R., Bonilla, P., Ramírez, E., Suárez, G., 1996. *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. *Arch. Med. Res.* 27, 579-586.

Haysom, I., Sharp, A., 2005. *Bacterial contamination of domestic kitchens over a 24-hour period.* *Br Food J.* 107, 453-466.

Johnson, A.S., Tarr, C.L., Brown, B.H. Jr., Birkhead, K.M., Farmer, J.J., 3rd 2005. First case of septicemia due to Enteric Group 58 (*Enterobacteriaceae*) and its designation as *Averyella dalhousiensis* gen. nov., sp. nov., based on strains from 20 additional cases. *Journal of Clin. Microbiol.* 43, 5195-5201.

Kennedy, S.M., Devine, P., Hurley, C., Ooi, Y.-S., Collum, L.M.T., 1995. Corneal

infection with *Hartmannella vermiformis* in contact-lens wearer. *Lancet* 346, 637-638.

Kilvington, S., Gray, T., Dart, J., Morlet, N., Beeching, J. R., Frazer, D.G., Matheson, M., 2004. *Acanthamoeba* keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 165-169.

Lamka, K.G., LeChevallier, M.W., Seidler, R.J., 1980. Bacterial contamination of drinking water supplies in a modern rural neighbourhood. *Appl. Microbiol. Microbiol.* 39, 734-738.

Lancellotti, M., de Oliveira, M.P., de Avila, F.A., 2007. Research on *Staphylococcus* sp. In biofilm formation in water pipes and sensibility to antibiotics. *Braz. J. Oral. Sci.* 6, 1283-1288.

LeChevallier, M.W., Seidler, R.J., 1980. *Staphylococcus aureus* in rural drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 739-742.

Marciano-Cabral, F., Cabral, G., 2003. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 273-307.

Otterholt E, Charnock, C., 2011a. Microbial quality and nutritional aspects of Norwegian brand waters. *Int J. Food Microbiol.* 144, 455-463.

Otterholt, E., Charnock, C., 2011b. Identification and phylogeny of the small

- eukaryote population of raw and drinking waters. *Wat. Res.* 45, 2527-2538.
- Page, F.C., 1988. *A new key to freshwater and soil gymnamoebae. Freshwater Biological Association, Ambleside, England.*
- Podschun, R., Fischer, A. Ullmann, U., 2001. Characterisation of *Hafnia alvei* isolates from human clinical extraintestinal specimens: haemagglutinins, serum resistance and siderophore synthesis. *J. Med. Microbiol.* 50, 208–214.
- Sarria, J.C., Vidal, A.M., Kimbrough, R.C., 3rd., 2001. Infections caused by *Kluyvera* species in humans. *Clin. Infect. Dis.* 33, 69-74.
- Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirotaki, S., Kawakami, T., Fukata, T., Hiramatsu, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. 2010. *J. Clin. Microbiol.*, 48, 75-769.
- Scott, E.A., 1996. Foodborne disease and other hygiene issues in the home. *J. Appl. Bacteriol.* 89, 5-9.
- Seal, D., Stapleton, F., Dart, J., 1992. Possible environmental sources of *Acanthamoeba* spp in contact lens wearers. *Brit. J. Ophthalmol.*, 76, 424-427.
- Thomas, J.M., Ashbolt, N.J., 2011. Do free living amoeba in treated drinking water systems present an emergent health risk? *Environ. Sci. and Technol.* 45, 860-869.