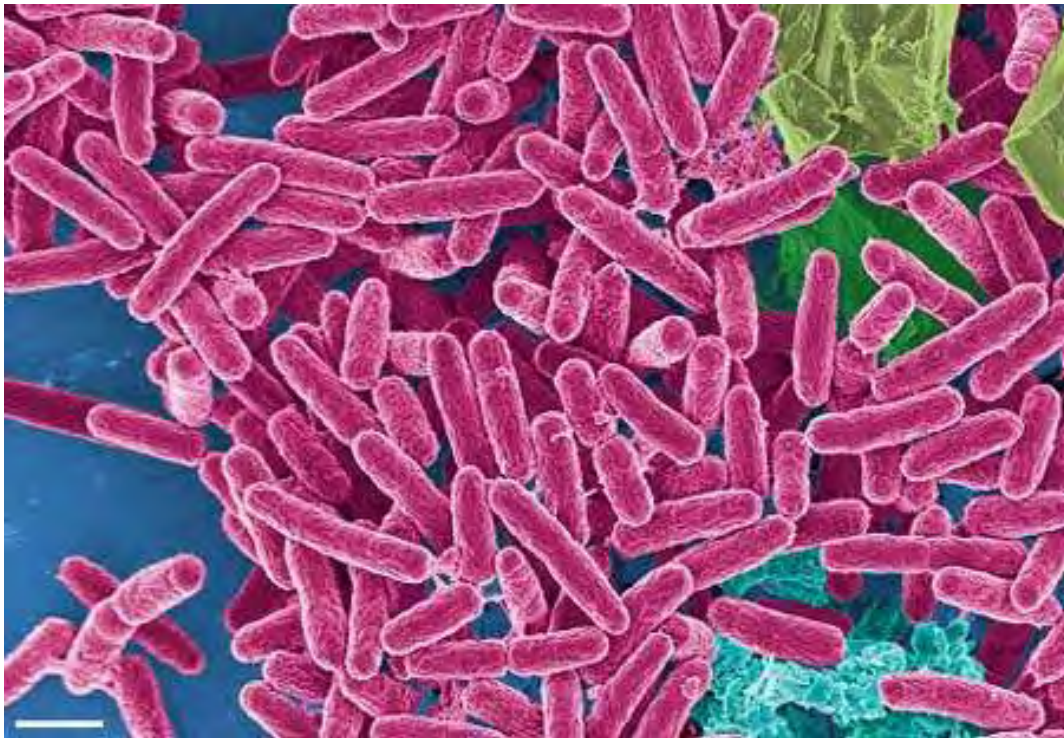


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΔΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΤΣΟΜΠΙΑΝΟΓΛΟΥ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΑΣ REAL-TIME PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ
ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ PSEUDOMONAS
ÆRUGINOSA ΣΕ ΠΟΣΙΜΑ ΝΕΡΑ»



ΛΑΡΙΣΑ 2013

«Ανάπτυξη μιας Real-Time PCR για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του βακτηρίου Pseudomonas Aeruginosa σε πόσιμα νερά»

«Development of a Real-Time PCR for the detection and quantitative determination of bacterium Pseudomonas Aeruginosa in drinking water»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ: Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (Επιβλέπων).

ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ: Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ: Λέκτορας Βιοπληροφορικής στη Γενωμική, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, στο Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας στη Λάρισα. Με την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής, μέσα από αυτές τις λίγες σειρές, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν για την ολοκλήρωσή της.

Πρωτίστως, ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγηση και την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής, όσο και για τις επιστημονικές γνώσεις και εμπειρίες που μου μετέδωσε καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης μου.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μόσιαλο Δημήτριο Επίκουρο Καθηγητή Βιοτεχνολογίας Μικροβίων όπως και τον κ. Αμούτζια Γρηγόριο Λέκτορα Βιοπληροφορικής στη Γενωμική, που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα, μέλος του Ειδικού Τεχνικού και Διδακτικού προσωπικού του Τμήματος και κυρίως στον υποψήφιο διδάκτορα Τσακογιάννη Δημήτρη για την συνεργασία και την καθοδήγηση τους καθώς και για την σημαντική βοήθεια που μου παρείχαν. Χωρίς αυτούς δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, Κώστα και Έφη, για την άνευ όρων βοήθεια και αμέριστη κατανόηση που επέδειξαν όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς αυτούς, αρωγούς και συνοδοιπόρους, δεν θα μπορούσα να πετύχω τους στόχους μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το νερό το προοριζόμενο για ανθρώπινη κατανάλωση πρέπει να είναι από κάθε άποψη αβλαβές για την υγεία του ανθρώπου, οργανοληπτικά άμεμπτο και απολύτως καθαρό, απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς και οποιεσδήποτε ουσίες σε αριθμούς και συγκεντρώσεις που αποτελούν ενδεχόμενο κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία.

Η υδατογενής μετάδοση των μικροβίων είναι ένας πολύ αποτελεσματικός τρόπος για την ευρεία και ταυτόχρονη εξάπλωση ασθενειών σε ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού. Μεταξύ αυτών των μικροβίων σημαντική θέση καταλαμβάνει το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa*, λόγω της ιδιαίτερης σημασίας τους για τη δημόσια υγεία. Αυτός ο οργανισμός έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται και να ευδοκιμεί σε μία ποικιλία περιβαλλόντων, και κυρίως υδάτινων, όπως λίμνες και ποτάμια, στα συστήματα παροχής νερού, στο έδαφος και λιγότερο συχνά στο πόσιμο νερό.

Η επαφή του βακτηρίου αυτού με εξασθενημένο πληθυσμό προκαλεί αρκετές εξονοσοκομειακές και ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις κάθε χρόνο, σε μεγαλύτερο ποσοστό περιπτώσεων εμφανίζονται οι λοιμώξεις του αναπνευστικού (π.χ. ινοκυστική νόσος). Η παρουσία της στο πόσιμο νερό σχετίζεται ίσως περισσότερο με την ικανότητά της να αναπτύσσει βιοφίλμ σε είδη υγιεινής, παρά από την παρουσία της στο σύστημα παροχής νερού ή στο επεξεργασμένο πόσιμο νερό (εμφιαλωμένο νερό, ανθρακούχο κ.ά.). Έχουν καταγραφεί παγκοσμίως, λοιμώξεις από τη χρησιμοποίηση μολυσμένων μη επεξεργασμένων επιφανειακών και υπόγειων υδάτων καθώς επίσης και λοιμώξεις από τη κατανάλωση πόσιμου νερού και οστρακοειδών.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* στο πόσιμο νερό. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν συνολικά 29 δείγματα πόσιμου νερού, εκ των οποίων τα 22 προέρχονταν από το δίκτυο ύδρευσης, τα 4 ήταν εμφιαλωμένα νερά που κυκλοφορούσαν στο εμπόριο, τα 2 ήταν από εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων και το 1 προέρχονταν από εν λειτουργία μηχανήματα ψύκτη νερού. Επειδή η *Pseudomonas aeruginosa* βρίσκεται συνήθως στο νερό σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, επιλέχθηκε μεγάλος όγκος δειγμάτων (4lt) και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσρόφησης – έκλουσης με ηλεκτραρνητικά φίλτρα έτσι ώστε να συγκεντρωθεί το βακτήριο σε μικρότερο όγκο. Ακολούθως εφαρμόστηκε σε κάθε δείγμα η τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης σε Πραγματικό Χρόνο (Real – Time PCR), η οποία μπορεί γρήγορα και με μεγάλη ευαισθησία να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει το γενετικό υλικό του υπό εξέταση βακτηρίου. Η μέθοδος αυτή, η οποία αποτελεί ένα καλό εργαλείο για την ανίχνευση λοιμώξεων που προκαλούνται από τα γνωστά είδη του γένους *Pseudomonas*, χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για να ανιχνεύσει το γονίδιο *gyrB* της *Pseudomonas aeruginosa* με τη χρήση του εξειδικευμένου ζεύγους εκκινητικών μορίων PA722F / PA899R σε δείγματα πόσιμων νερών.

Από τα 29 δείγματα τα 7 βρέθηκαν θετικά με την Real – Time PCR. Αυτά τα δείγματα είχαν συγκεντρωθεί από διάφορες περιοχές της Ελλάδος, χωρίς να έχει προαναφερθεί στην εκάστοτε περιοχή κάποιο κρούσμα μόλυνσης από *Pseudomonas aeruginosa* στο πόσιμο νερό. Στα υπόλοιπα 22 δείγματα πόσιμου νερού που εξετάστηκαν με την ίδια μέθοδο και τις τεχνικές που περιγράφονται στην παρούσα μελέτη, δεν ανιχνεύτηκε *Pseudomonas aeruginosa*, είτε γιατί δεν υπήρχε κάποια επιμόλυνση στα συγκεκριμένα δείγματα είτε γιατί το βακτηριακό τους φορτίο ήταν πολύ μικρό.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εργασίας, είναι υπαρκτός ο κίνδυνος μόλυνσης του πληθυσμού από αεριογόνο ψευδομονάδα μέσω των συστημάτων οικιακής χρήσης ζεστού ή κρύου νερού, μέσω του δικτύου ύδρευσης, αλλά και μέσω κατανάλωσης εμφιαλωμένων νερών. Η συγκέντρωση του βακτηρίου αυτού μπορεί να αποτελέσει δείκτη της καλής κατάστασης ενός δικτύου διανομής νερού, καθώς και της καλής ποιότητας του πόσιμου νερού. Κρίνεται σκόπιμο επομένως, η απαγόρευση που υπάρχει από τη νομοθεσία στην χρήση αυτών των συστημάτων παροχής νερού από τον πληθυσμό, όταν υπερβαίνονται τα επιτρεπτά όρια περιεκτικότητας της *Pseudomonas aeruginosa* στο δίκτυο ύδρευσης.

Σύμφωνα με την Νομοθετική Οδηγία 98/83/EC για το πόσιμο νερό (EU, 1998) της Ευρωπαϊκής Ένωσης, μικροοργανισμοί – δείκτες, όπως η *Ps. aeruginosa*, θα πρέπει να παρακολουθούνται σε τακτική βάση στο πόσιμο νερό προκειμένου να ελέγχεται συστηματικά η μικροβιακή ποιότητα του νερού των δημόσιων συστημάτων παροχής νερού, έτσι ώστε να περιοριστούν οι λοιμώξεις που προκαλούνται από την *Pseudomonas aeruginosa*, ιδιαίτερα από πολυανθεκτικά στελέχη της, τα οποία μπορεί να προκαλέσουν επιδημίες.

ABSTRACT

The water intended for human consumption must be in all respects harmless to human health, organoleptic flawless and perfectly clean, free from pathogenic microorganisms and any substances in numbers or concentrations that might constitute a potential risk to public health.

The waterborne transmission of microbes is a very effective way for widespread and simultaneous spread of disease in the population. Among these microbes, important position is occupied by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, because of its importance to public health. This microorganism has the ability to adapt and thrive in a variety of environments, particularly water environments, such as lakes and rivers, in water systems, in soil and less frequently in drinking water.

The contact of this bacterium with weakened population causes several outpatient and hospital – acquired infections every year with a greater percentage of cases appearing in respiratory infections (e.g. cystic fibrosis). Its presence in drinking water is probably related more to the ability to develop biofilms in sanitary ware, despite its presence in the water supply system or in the treated drinking water (bottled water, carbon water, etc.). Worldwide infections have been recorded from using contaminated untreated surface water and groundwater as well as infections from consumption of drinking water and shellfish.

The purpose of this study was the detection and quantification of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria in drinking water. The present study examined a total of 29 samples of drinking water, of which 22 came from the water mains, the 4 was bottled waters that were marketed in, 2 were from food processing factories and one came from machines in operation water cooler. Because *Pseudomonas aeruginosa* is usually in water at very low concentrations, large volume samples (4lt) and the method of adsorption - elution with electronegative filters were chosen to be used, so as to concentrate the bacterium in a smaller volume. Then each sample was submitted to Polymerase Chain Reaction in Real Time (Real - Time PCR), which can quickly and with great sensitivity detect and quantify the genetic material of the bacterium. This method, which is a good tool for detecting infections caused by the known species of the genus *Pseudomonas*, was successfully used to scan the *gyrB* gene of *Pseudomonas aeruginosa* using the pair of primers PA722F / PA899R in samples of drinking waters.

Of the 29 samples tested, only 7 were found positive using with Real - Time PCR. These samples were collected from various regions of Greece, without any previous report on the area of contamination by *Pseudomonas aeruginosa* in drinking water. In the remaining 22 tested samples of drinking water by the same method and technique described in this study, *Pseudomonas aeruginosa* was not detected, either because there was no contamination of the concrete samples either because the bacterial load was very low.

According to our results, there is a real risk of contamination of the population by *Pseudomonas aeruginosa* via household hot or cold water systems, through the water supply and through consumption of bottled water. It should be banned by law to use these systems to provide water for the population, if it exceeds the permissible content of *Pseudomonas aeruginosa* in water supply network.

According to the Legislative Council Directive 98/83/EC on drinking water (EU, 1998) of the European Union, microorganisms – indicators such as *Ps. aeruginosa*, should be routinely monitored in drinking water in order to systematically checked the microbial water quality of public water supply systems in order to reduce the infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*, particularly multidrug – resistant strains which can cause epidemics.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

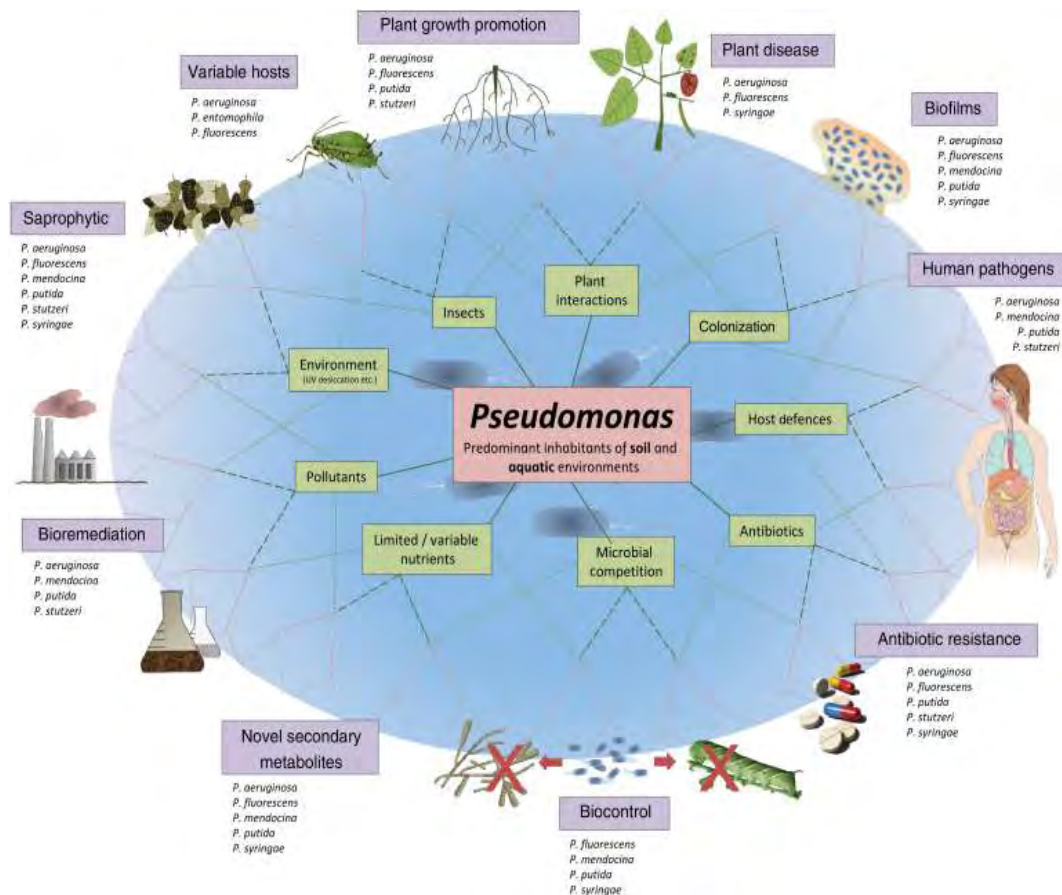
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	6
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΓΕΝΟΥΣ <i>PSEUDOMONAS</i>	10
2. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	11
3. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ.....	13
4. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	14
4.1 ΔΟΜΗ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ.....	15
4.2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΟΜΗ.....	16
4.2.1 ΠΡΩΤΕΪΝΗ F.....	17
4.2.2 ΈΛΥΤΡΟ ΚΑΙ ΤΡΙΧΙΔΙΑ.....	18
4.3 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ.....	19
4.4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ.....	21
5. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ – ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΙΟΦΙΛΜ.....	21
6. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.....	23
7. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	25
8. ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ.....	28
9. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	30
10. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ΣΕ ΠΟΣΙΜΑ ΝΕΡΑ.....	33
11. ΤΡΟΠΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	36
11.1 ΚΛΑΣΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
11.1.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	37
11.1.2 TEST API.....	38
11.1.3 ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ CLSM.....	38
11.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	40
11.2.1 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR).....	40
11.2.2 REAL – TIME PCR.....	41
11.2.3 MULTIPLEX PCR.....	41
ΣΚΟΠΟΣ	43
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	44
1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ ΠΟΣΙΜΟΥ ΝΕΡΟΥ.....	44
2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	46
2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ – ΈΚΛΟΥΣΗΣ ΑΠΟ ΗΛΕΚΤΡΑΡΝΗΤΙΚΑ ΦΙΛΤΡΑ.....	46
2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΘΙΣΗΣΗΣ ΜΕ PEG.....	47
3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ.....	47
4. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>gyrB</i>	49

5. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	50
6. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	51
7. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ REAL – TIME PCR.....	51
7.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	51
7.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ (LIGATION).....	52
7.3 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	52
7.4 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΣΤΕΡΗ ΚΑΙ ΥΓΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	52
7.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	53
7.6 ΠΕΨΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	53
8. ΣΕΙΡΙΑΚΕΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ.....	53
9. REAL – TIME PCR.....	54
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	56
1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ -ΕΚΚΛΟΥΣΗΣ ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΑΡΝΗΤΙΚΑ ΦΟΡΤΙΣΜΕΝΑ ΦΙΛΤΡΑ.....	56
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ ΜΕ PEG.....	57
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR ΜΕ ΖΕΥΓΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ PA722F / PA899R.....	57
4. ΣΕΙΡΙΑΚΕΣ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ.....	58
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ REAL – TIME PCR.....	59
5.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΤΗΣ REAL – TIME PCR.....	59
5.2 ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ REAL – TIME PCR.....	62
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	64
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	69

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΓΕΝΟΥΣ *PSEUDOMONAS*

Το γένος *Pseudomonas* περιλαμβάνει περισσότερα από 140 είδη βακτηρίων τα οποία είναι παθογόνα, όχι μόνο των φυτών και των ζώων, αλλά και του ανθρώπου. Μέλη του γένους *Pseudomonas* εμφανίζουν αξιοσημείωτη μεταβολική και φυσιολογική ποικιλομορφία, γεγονός που τους επιτρέπει να αποικίζουν διάφορους χερσαίους και υδάτινους οικολογικούς θώκους (Palleroni and Norberto, 2010). Συγχρόνως, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω της σπουδαιότητάς τους σε ασθένειες τόσο των ανθρώπων όσο και των φυτών, και λόγω της συνεχούς αυξανόμενης δυνατότητάς τους να αξιοποιηθούν σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Το λειτουργικό και περιβαλλοντικό φάσμα του βακτηρίου *Pseudomonas spp.* Ο κοινός πρόγονος της *Pseudomonas* αντιμετώπισε ένα ευρύ φάσμα αβιοτικών και βιοτικών περιβαλλόντων, που οδήγησε στην εξέλιξη ενός πλήθους χαρακτηριστικών και τρόπων ζωής με σημαντική επικάλυψη μεταξύ των ειδών. (Silby et al., 2011)

Το γένος *Pseudomonas* περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Migulla (1894) και αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης από την αρχή της ανάπτυξης της επιστήμης της Μικροβιολογίας. Στην έκδοση του 1933, το εγχειρίδιο Bergeley αφιέρωσε ένα κεφάλαιο στην ταξινόμηση του γένους *Pseudomonas* με κριτήριο τα μορφολογικά του χαρακτηριστικά, όμως ο καθορισμός των απομονωμένων στελεχών του γένους ήταν αμφιλεγόμενος. Το 1966, σε μια εκτεταμένη μελέτη, έγιναν προσπάθειες να ξεκαθαριστεί η ταξινόμηση του γένους *Pseudomonas*, καταγράφοντας την ανάπτυξη 246 στελεχών σε 146 διαφορετικές οργανικές ενώσεις. Τελικά, ο Stanier και οι συνεργάτες του (1996) δημοσίευσαν μια συνολική αξιολόγηση της ταξινόμησης του γένους *Pseudomonas* spp., που καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τους φαινοτύπους και τις βιοχημικές δυνατότητες του κάθε στελέχους.

Η ανάπτυξη της τεχνικής απομόνωσης του DNA από βακτήρια, επέτρεψε τις πρώτες μελέτες ομολογίας αλληλουχιών του DNA μεταξύ των στελεχών που ανήκαν στο γένος *Pseudomonas*. Το 1973 ο Pelleroni, αξιοποιώντας τις δυνατότητες απομόνωσης DNA και rRNA, ομαδοποίησε τα στελέχη του γένους αυτού, με βάση μετρήσεις της ομολογίας μεταξύ DNA – rRNA των διαφόρων στελεχών. Στις αρχές τις δεκαετίας του '80, άρχισε να χρησιμοποιείται ως κριτήριο για την ταξινόμηση των βακτηρίων η αλληλουχία του 16s rRNA, το οποίο παραμένει σε χρήση μέχρι και σήμερα.

Το γένος *Pseudomonas* περιλαμβάνει φθορίζοντα είδη (*Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*) και μη – φθορίζοντα είδη (*Ps. mendocina*, *Ps. stutzeri*) (Peix et al., 2009). Τα περισσότερα από τα είδη του γένους είναι σαπροφυτικά και ο αριθμός των ειδών που ανήκουν στο γένος αυξάνεται σχεδόν κάθε χρόνο. Το 2006 είχαν πιστοποιηθεί 106 είδη και το 2009 ο αριθμός έφτασε τα 119 (Mullet et al., 2010). Μόνο 25 από τα είδη αυτά προκαλούν στον άνθρωπο ευκαιριακές λοιμώξεις. Συγκεκριμένα τα είδη *Pseudomonas aeruginosa* και *Pseudomonas maltophilia* απομονώνονται σε μεγάλο ποσοστό (80%) από κλινικά δείγματα ασθενών με λοιμώξεις από ψευδομονάδες, γι' αυτό και συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον (Blondel – Hill et al., 2007).

2. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Η *Pseudomonas aeruginosa* PA01 ήταν η 25^η βακτηριακή αλληλουχία γονιδιώματος που ολοκληρώθηκε και η πρώτη πλήρης αλληλουχία του γονιδιώματος της *Pseudomonas* που απομονώθηκε από μια αυστραλιανή πληγή τη δεκαετία του 1950 (Stover et al., 2000). Το στέλεχος PA01 υπήρξε και εξακολουθεί να είναι η κύρια αναφορά για τις γενετικές και λειτουργικές μελέτες σχετικά με την *Ps. aeruginosa*. Η *Ps. aeruginosa* περιγράφηκε για πρώτη φορά ως ένα ξεχωριστό βακτηριακό είδος στο τέλος του 19^{ου} αιώνα μετά την ανάπτυξη των αποστειρωμένων μέσων καλλιέργειας από τον Παστέρ.

Το 1882 ο Carle Gessard, χημικός και μικροβιολόγος από το Παρίσι, ανακάλυψε την *Pseudomonas aeruginosa* κατά τη διάρκεια ενός πειράματος για την επιστημονική του μελέτη: «Από το μπλε και το πράσινο χρώμα των επιδέσμων». Στο πείραμα αυτό ταυτοποιήθηκε το βακτήριο μέσω των υδατοδιαλυτών χρωστικών ουσιών του, οι οποίες έδωσαν κυανοπράσινη χρώση μετά υπό την έκθεσή τους σε υπεριώδης ακτινοβολία (UV). Αργότερα, η χρώση αυτή αποδόθηκε στην πυοκυανίνη, μια χρωστική ουσία της *Ps. aeruginosa*. Μαζί με τα πειραματικά του ευρήματα, ο Carle Gessard, καθόρισε τη σωστή ονομασία του στελέχους *Pseudomonas aeruginosa*, καθώς και την χρωστική ουσία της και ανέπτυξε τη θεωρία του για την παθογόνο φύση και τις μολυσματικές ομοιότητες που έχει η *Pseudomonas aeruginosa* με παρόμοιους μικροοργανισμούς.



Εικόνα 2. Απεικόνιση κυττάρων *Ps. aeruginosa* (www.cellsalive.com)

Ο Charrin το 1890 χαρακτήρισε την *Pseudomonas aeruginosa* ως ένα ευκαιριακά παθογόνο αερόβιο βακτήριο, το οποίο έχει μια αξιοσημείωτη ικανότητα να προσαρμόζεται και να ευδοκιμεί σε μία ποικιλία περιβαλλόντων: ύδατος (Pellett et al., 1983), (Kimata et al., 2004), εδάφους (Cavalca et al., 2000), επαγγελματικών χώρων επεξεργασίας υγρών μετάλλων (Karadzic et al., 2006), κλινικών (Wolfgang et al., 2003), νοσοκομείων, αστικών λυμάτων (Schwartz et al., 2006) και βιομηχανικών αποβλήτων (Karadzic et al., 2006).

Οι περισσότερες ασθένειες που προκαλεί η *Ps. aeruginosa* στον άνθρωπο δεν προέρχονται από την κατανάλωση του πόσιμου νερού αλλά από την επαφή με αυτό. Νερό μολυσμένο με αυτό το βακτήριο μπορεί να μολύνει τροφές και ποτά που το περιέχουν, τους υποβιβάζει την ποιότητα και μπορεί να αποτελέσουν φορείς παραπέρα μετάδοσης. Σκεύη που έρχονται σε επαφή με αυτό, όπως νεροχύτες, μπάνια κλπ., μπορεί να μολυνθούν και να αποτελέσουν εστίες μόλυνσης σε νοσοκομεία. Ωστόσο, η παρουσία του βακτηρίου στο νερό των νοσοκομείων ή μονάδων παρασκευής φαρμακευτικών προϊόντων μπορεί να είναι σοβαρό πρόβλημα προκαλώντας μολύνσεις σε πληγές και εγκαύματα.

Πρωτίστως, αποτελεί ένα νοσοκομειακό παθογόνο βακτήριο. Σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου Λοιμώξεων (CDC), το σύνολο των λοιμογόνων περιπτώσεων

από *Pseudomonas aeruginosa* σε νοσοκομεία των ΗΠΑ ήταν κατά μέσο όρο 0,4%, και το βακτήριο είναι το τέταρτο πιο συχνά απομονωμένο νοσοκομειακό παθογόνο αντιπροσωπεύοντας το 10,1% του συνόλου των νοσοκομειακών λοιμώξεων. Τα διάφορα στελέχη *Ps. aeruginosa* μπορεί να ταξινομηθούν για επιδημιολογικές μελέτες με οροτυπία, λυσιτυπία, πυοσινοτυπία ή με το αντιβιογράμμα. Σήμερα η ορολογική τυποποίηση γίνεται με 17 ειδικούς αντιορούς, έναντι του σωματικού αντιγόνου, σύμφωνα με το I.A.T.S. (International Antigenic Typing System) (Pier and Thomas, 1982). Σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή, η βακτηριακή μόλυνση μπορεί να επιφέρει μια πληθώρα ασθενειών, όπως πνευμονία, ενδοκαρδίτιδα και μηνιγγίτιδα.

Η *Pseudomonas aeruginosa* εμφανίζει έμφυτη αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά και μπορεί να προσαρμοστεί όταν εκτίθεται σε αντιμικροβιακούς παράγοντες και να αναπτύξει νέες αντιστάσεις. Έτσι, επιτρέπεται στο βακτήριο να ευδοκιμήσει και να αναπτυχθεί περαιτέρω, ακόμη και κατά τη διάρκεια θεραπείας. Επί του παρόντος, έχει γίνει έρευνα για τη θεραπεία της εν λόγω λοίμωξης, η οποία οδήγησε στη γονιδιωματική αλληλουχία της *Ps. aeruginosa* και στη χρήση ενός συστήματος εκροής – αναστολέων, που συμβάλλουν στη αντιμικροβιακή αντοχή του βακτηρίου.

Με τέτοια ικανότητα επιβίωσης έναντι των αντιβιοτικών και αυξανόμενο ρυθμό μόλυνσης, το βακτήριο πρέπει να παρακολουθείται προσεκτικά στις εστίες μόλυνσης, και κυρίως σε νοσοκομεία, το γονιδιώμά του να ενημερώνεται συνεχώς σε μια βάση δεδομένων και γενικότερα να παρακολουθείται παγκοσμίως λόγω του δυναμικού του ως πιθανό βιολογικό όπλο.

3. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Το γένος *Pseudomonas* ανήκει στα γ – πρωτεοβακτήρια, στην οικογένεια των Pseudomonadaceae, ενώ περιλαμβάνει περισσότερα από 191 είδη (Euzebay, 1997). Ο μικροοργανισμός *Pseudomonas aeruginosa* ή πυοκυανική / αεριογόνος Ψευδομονάδα, είναι βακτηριακό είδος του γένους *Pseudomonas*. Η *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonas*: ψευδής μονάς, *aeruginosa*: πρασινάδα χαλκού), είναι ένα Gram – αρνητικό, μη σπορογόνο, ελυτροφόρο βακτηρίδιο, μήκους 1.5-5μm και διαμέτρου 0.5-1μm.

Η αεριογόνος ψευδομονάδα φέρει τα γενικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων του γένους. Τα κύτταρά της διατάσσονται μεμονωμένα, σε ζεύγη ή σε μικρές αλυσίδες. Όλα τα στελέχη έχουν την ικανότητα κίνησης μέσω του μαστιγίου, ενώ μερικά από αυτά έχουν περισσότερα από ένα μαστίγια. Χαρακτηρίζεται ως κινητό βακτήριο και αυστηρά αερόβιο, χρησιμοποιώντας το O₂ για να του παρέχεται ο βέλτιστος μεταβολισμός. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να χρησιμοποιήσει τα νιτρικά άλατα ως εναλλακτικό δέκτη ηλεκτρονίων και με τον τρόπο αυτό να αναπτύσσεται αναερόβια.



Εικόνα 3. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κυττάρων. Σχηματισμός μεμβρανών λόγω *Ps. aeruginosa* σε επιθηλιακά κύτταρα τραχείας ποντικού. (www.ftns.wau.nl/micr/edu)

4. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Το γενετικό περιεχόμενο της *Pseudomonas aeruginosa* αντανακλά τον τρόπο ζωής αυτού του πανταχού παρόν βακτηριακού είδους. Τα στελέχη της βρέθηκαν σε διάφορα περιβαλλοντικά ενδιαίτηματα, καθώς και σε ζωικούς και ανθρώπινους ξενιστές, όπου μπορούν να ενεργούν ως ευκαιριακά παθογόνα. Ο αποικισμός αυτού του ευρέος φάσματος οικοτόπων συμβαδίζει με τη δυνατότητα της *Ps. aeruginosa* να εκμεταλλεύεται πολλές διαφορετικές πηγές διατροφής και μεγάλες δυνατότητες προσαρμογής στις νέες (ή μεταβαλλόμενες) περιβαλλοντικές συνθήκες.

Η μεταβολική ευελιξία της αεριογόνου ψευδομονάδας παρέχεται από γονίδια που κωδικοποιούν όχι μόνο τα ένζυμα που συμμετέχουν σε μεταβολικές οδούς, αλλά και από ένα πολύ υψηλό αριθμό μετεγγραφικών ρυθμιστών. Περισσότερα από 500 ρυθμιστικά γονίδια εντοπίστηκαν στο γονιδίωμα του στελέχους *PAOI* (Stover et al., 2000). Τα γονιδιώματα των στελεχών της *Ps. aeruginosa* είναι μεγαλύτερα από εκείνα των περισσότερων αλληλουχημένων βακτηρίων.

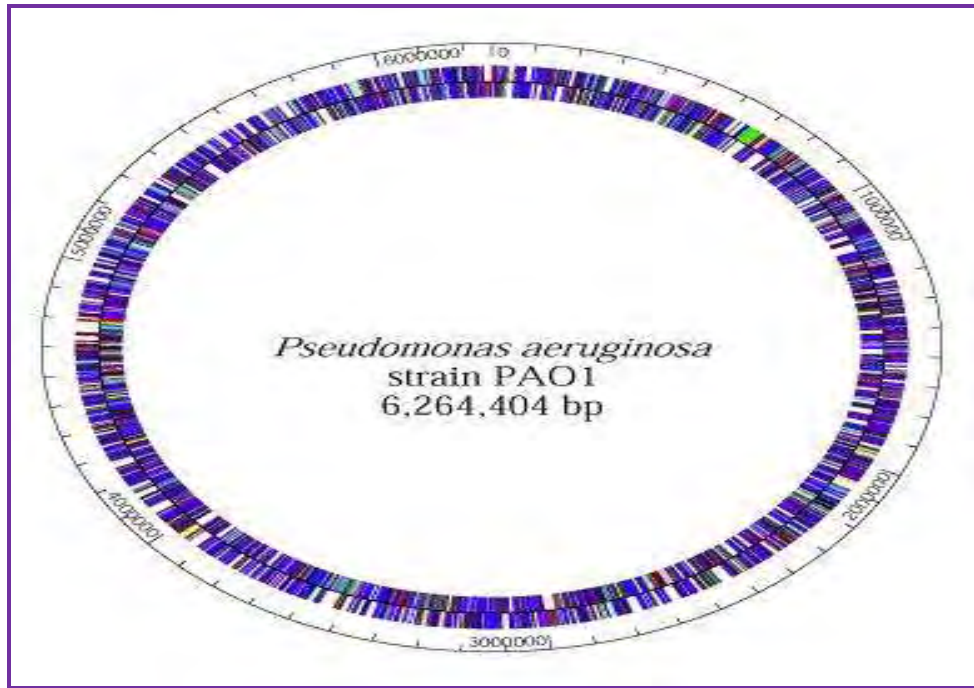
4.1 ΔΟΜΗ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ

Τα δύο στελέχη που έχουν την πλήρη αλληλουχία του γονιδιώματος είναι η *Pseudomonas aeruginosa PA01* και η *Pseudomonas aeruginosa PA14*. Το γονιδίωμα της *Pseudomonas aeruginosa* αποτελεί ένα συνδυασμό ενός καλά διατηρημένου πυρήνα και των διαφόρων μεταβλητών βοηθητικών τμημάτων που το απαρτίζουν. Εντός των ειδών, το μέγεθος του γονιδιώματος κυμαίνεται μεταξύ 5,5 και 7 MBP (Schmidt et al., 1996), με 65 – 67% περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη. Η απόκλιση στο μέγεθος του γονιδιώματος προκαλείται από το λεγόμενο «γονιδίωμα – αξεσουάρ».

Το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος, το γονιδίωμα – πυρήνας, βρίσκεται σε όλα τα στελέχη της *Ps. aeruginosa* με το αντίστοιχο DNA, κυρίως ομοαξονικά διατεταγμένα (Römling et al., 1995). Το γονιδίωμα του πυρήνα, με λίγες εξαιρέσεις των τόπων που υπόκεινται σε διαφοροποίηση επιλογής, αποτελείται από χαμηλό επίπεδο νουκλεοτιδικής απόκλισης της τάξεως των 0,5 – 0,7% (Spencer et al., 2003), (Cramer et al., 2011) και από μια διατηρημένη συνταινία των γονιδίων στο ίδιο χρωμόσωμα, είτε αυτά συνδέονται μεταξύ τους είτε όχι (Wiehlmann et al., 2007).

Το «γονιδίωμα – αξεσουάρ» αποτελείται από DNA στοιχεία μέσα από ένα φάσμα μερικών εκατοντάδων βάσεων έως και 200kbp. Το ελάχιστο μέγεθος ενός «γονιδιώματος – αξεσουάρ» ορίστηκε ως ένα σύμπλεγμα τεσσάρων τουλάχιστον συνεχόμενων ORFs που δεν είναι διατηρημένα σε όλα τα στελέχη της *Ps. aeruginosa* (Mathee et al., 2008). Η *Pseudomonas aeruginosa* μπορεί με τη βοήθεια του «γονιδιώματος – αξεσουάρ» να επικοινωνεί με άλλα είδη και γένη μέσω της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. Ως εκ τούτου, ένα χρωμόσωμα *Ps. aeruginosa* συχνά περιγράφεται δομικά ως μωσαϊκό ενός διατηρημένου γονιδιώματος – πυρήνα, που διακόπτεται συχνά από τα εισαχθέντα τμήματα του «γονιδιώματος – αξεσουάρ».

Η *Pseudomonas aeruginosa* έχει ένα ενιαίο και υπερσπειρωμένο κυκλικό χρωμόσωμα στο κυτταρόπλασμά της. Μεταφέρει, επίσης, μια πληθώρα κινητοποιούμενων χρωμοσωμικών πλασμιδίων που είναι πολύ σημαντικά για τον τρόπο ζωής του οργανισμού ως παθογόνο. Τα πλασμίδια TEM, OXA και PSE, για παράδειγμα, είναι κωδικοποιημένα για την παραγωγή της β-λακταμάσης, η οποία είναι απαραίτητη για την αντοχή του μικροοργανισμού στα αντιβιοτικά, επιτρέποντας έτσι στη *Pseudomonas aeruginosa* να αποτελεί ένα «τρομερό» παθογόνο.



Εικόνα 4. Γένωμα *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. (Pseudomonas Genome Database)

Το 2000 μια ομάδα εθελοντών επιστημόνων (Stover et al., 2000) του Ινστιτούτου Παθολογίας της Ουάσιγκτον και του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου της Καλιφόρνια, εργάστηκαν στο πρόγραμμα PseudoCAP (Pseudomonas aeruginosa Community Annotation Project), που αφορούσε τη δημοσίευση της πλήρους αλληλουχίας του γονιδιώματος της *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Ο σκοπός των επιστημόνων μέσω αυτής της έρευνας, ήταν να παρέχουν νέες πληροφορίες σχετικά με την οικολογική ευελιξία και τη γενετική πολυπλοκότητα του βακτηρίου αυτού, καθώς και την παθογένεια που παρουσιάζει, βασιζόμενοι στη γνωστή γονιδιωματική αλληλουχία του PAO1.

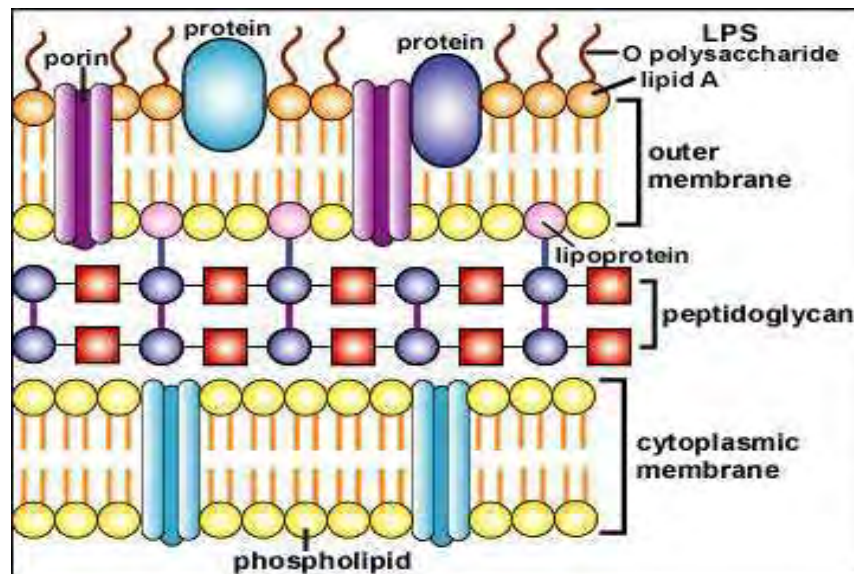
Σε 6.264.404 ζεύγη βάσεων, το βακτηριακό γονιδίωμα του PAO1 είναι το μεγαλύτερο που έχει ποτέ αλληλουχηθεί. Επίσης περιέχει 5.570 προβλεπόμενα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης ORFs (predicted open reading frames) και επομένως πλησιάζει τη γενετική πολυπλοκότητα των απλών ευκαρυωτικών, όπως του *Saccharomyces cerevisiae*.

4.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΟΜΗ

Η *Pseudomonas aeruginosa* χαρακτηρίζεται ως ένα κινητό, μη σπορογόνο, μαστιγοφόρο βακτηρίδιο, ραβδοειδούς σχήματος. Ο κυτταρικός φάκελός της είναι όμοιας μορφολογίας με αυτόν των Gram – αρνητικών βακτηρίων και αποτελείται από την εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη με ενδιάμεσο το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης (Εικόνα 5). Η εξωτερική μεμβράνη αποτελείται από φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες και λιποπολυσακχαρίτες (LPS). Οι πρωτεΐνες της

εξωκυτταρικής μεμβράνης είναι συντηρημένες ανάμεσα στα στελέχη, ενώ οι πολυσακχαριδικές αλυσίδες (αντιγόνα O) παίζουν ρόλο στην ορολογική διάκριση των στελεχών. Το 90% περίπου των στελεχών φέρουν ένα πολυσακχαρικό έλυτρο (πολική βλεφαρίδα), που προστατεύει το βακτήριο από τη φαγοκυττάρωση και από επικίνδυνες για αυτό ουσίες.

Η πρωτεΐνη F, το έλυτρο και τα τριχίδια αυτού του βακτηριακού κυττάρου αποτελούν τα πιο σημαντικά του δομικά στοιχεία, διότι παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της λοιμογόνου δράσης της *Pseudomonas aeruginosa*.



Εικόνα 5. Σχηματική δομή του κυτταρικού τοιχώματος Gram – αρνητικού βακτηρίου. (www.cat.cc.md.us/toll/u1fig10b.html)

4.2.1 ΠΡΩΤΕΪΝΗ F

Δεδομένου ότι η *Ps. aeruginosa* είναι ένα Gram – αρνητικό βακτήριο, περιβάλλεται από μια εξωτερική μεμβράνη η οποία περιέχει την πρωτεΐνη F (OprF). Η OprF λειτουργεί ως πορίνη, επιτρέποντας σε ορισμένα μόρια και ιόντα να εισέλθουν στα κύτταρα, αλλά και ως δομική πρωτεΐνη, διατηρώντας το βακτηριακό κυτταρικό σχήμα. Η OprF παρέχει στην εξωτερική μεμβράνη της ψευδομονάδας ένα όριο αποκλεισμού της τάξεως των 500Da, μπορεί να μειώνει τη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης.

Μια πολυφαινοτυπική ερευνητική προσέγγιση έδειξε ότι η OprF απαιτείται για τον έλεγχο της μολυσματικότητας της αεριογόνου ψευδομονάδας μέσω του συστήματος της «απαρτίας αντίχνευσης». Η απουσία τη OprF έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη προσκόλληση σε ζωικά κύτταρα, την έκκριση των τοξινών ExoT και ExoS μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου III (T3SS), και τέλος την παραγωγή των λοιμογόνων παραγόντων της «απαρτίας αντίχνευσης», οι οποίοι είναι η πυοκυανίνη, ελαστάση, λεκτίνη PA – 1L και εξωτοξίνη A. (Fito-Boncompagni et al., 2010). Η ιδιότητα αυτή της πρωτεΐνης OprF είναι επιθυμητή, διότι θα μειώσει την

πρόσληψη των επιβλαβών ουσιών εντός του κυττάρου και θα δώσει στην *Ps. aeruginosa* μια υψηλή αντίσταση στα αντιβιοτικά.

4.2.2 ΈΛΥΤΡΟ ΚΑΙ ΤΡΙΧΙΔΙΑ

Η *Ps. aeruginosa* χρησιμοποιεί το μοναδικό και πολικό έλυτρό της (flagellum) για να κινηθεί και για να εμφανίσει χημειοταξία σε χρήσιμα μόρια, όπως τα σάκχαρα. Τα στελέχη της έχουν έλυτρο Α ή Β τύπου, μια ταξινόμηση που βασίζεται κυρίως στο μέγεθος και την αντιγονικότητα της υπομονάδας φλαγκελλίνης. Το έλυτρο είναι πολύ σημαντικό κατά τα πρώτα στάδια της μόλυνσης από ψευδομονάδα, γιατί μπορεί να προσκολλάται στους ιστούς των ξενιστών και να εισχωρεί σε αυτούς.

Παρομοίως, τα τριχίδια (pili) της *Ps. aeruginosa* συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην ικανότητά της να προσκολλάται σε βλεννογόνες επιφάνειες και επιθηλιακά κύτταρα. Συγκεκριμένα, η άκρη του τριχιδίου της αεριογόνου ψευδομονάδας είναι υπεύθυνη για την προσκόλληση στην κυτταρική επιφάνεια του ξενιστή. Η *Ps. aeruginosa* έχει τριχίδια N – μεθυλ – φαινυλ – αλανίνης (NMePhe) ή τύπου IV τριχίδια (Lederberg et al., 2000). Τα τριχίδια αυτά χαρακτηρίζονται ως μακριά πολικά νημάτια, συντιθέμενα από ομοπολυμερή της πρωτεΐνης πιλίνη, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο pilA.



Εικόνα 6. Πολυανθεκτικά στελέχη της *Ps. aeruginosa*. (<http://www.bioquell.com>)

Συνολικά, το έλυτρο και τα τριχίδια της *Ps. aeruginosa* διαθέτουν παρόμοιες λειτουργίες προσκόλλησης και παρόμοιες νηματοειδείς δομές επί της επιφάνειας του κυττάρου. Επιπλέον, η κινητικότητά τους ελέγχεται με το γονίδιο RpoN, κυρίως υπό δυσμενείς θρεπτικές και περιβαλλοντικές συνθήκες, ειδικά κατά την αρχική τους προσκόλληση στον ανθρώπινο ξενιστή (Darija et al., 2007).

Μετά τη μόλυνση του ξενιστή η *Ps. aeruginosa* στερείται σιδήρου, τον οποίο παίρνει από τα αποθέματα του οργανισμού, με αποτέλεσμα να κλονίζεται ο έμφυτος μηχανισμός άμυνας του ανθρώπου. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος, η *Ps. aeruginosa* συνθέτει δύο σιδηροφόρα: την πυοκελίνη και την πυοβερντίνη, τα οποία μεταφέρει στο εξωτερικό του κυττάρου της. Αυτά τα σιδηροφόρα προσκολλούνται στο μόριο του σιδήρου και τον επαναφέρουν μέσα στο κύτταρο. Επιπλέον, η *Ps. aeruginosa* μπορεί να χρησιμοποιήσει για τις

ανάγκες της σε σίδηρο αυτό των εντεροβακτηριών, ένα ειδικό σιδηροφόρο που παράγεται από το *E. coli* για τη μεταφορά του σιδήρου.

4.3 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Η *Pseudomonas aeruginosa* αποτελείται από πολλά στελέχη, συμπεριλαμβανομένων των εξής στελεχών:

- *Pseudomonas aeruginosa* PA01
- *Pseudomonas aeruginosa* PA7
- *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP - PA14
- *Pseudomonas aeruginosa* 2192

Καλλιεργείται εύκολα στα κοινά θρεπτικά υλικά με άριστη θερμοκρασία αναπτύξεως στους 37°C. Είναι το μόνο είδος του γένους που αναπτύσσεται στους 42°C και η ιδιότητα αυτή διαφοροποιεί την *Ps. aeruginosa* από τις υπόλοιπες ψευδομονάδες. Όλα τα στελέχη παράγουν καταλάση και οξειδάση, ενώ δεν παράγουν H₂S. Η *Ps. aeruginosa* δε ζυμώνει τη γλυκόζη, ενώ τη διασπά οξειδωτικά, χωρίς παραγωγή αερίου, επειδή περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις κυττοχρωματικής οξειδάσης, αντίθετα, δε διασπά τη λακτόζη ή τη μαλτόζη. Οι τροφικές απαιτήσεις του βακτηρίου είναι ελάχιστες, ενώ είναι δυνατό να χρησιμοποιήσει το ατμοσφαιρικό CO₂ ως μόνη πηγή άνθρακα και το αμμώνιο ως πηγή αζώτου.

Τα περισσότερα από τα παραπάνω στελέχη απομονώθηκαν με βάση την ιδιαίτερα ευχάριστη οσμή σταφυλιών της αμινοακετοφαινόνης, την παραγωγή πυοκυανίνης και του σχηματισμού αποικιών σε διάφορα θρεπτικά μέσα (π.χ. αιματούχο άγαρ, McConkey άγαρ).

Περισσότερα από το 50% των στελεχών της *Ps. aeruginosa* παράγουν μια υδατοδιαλυτή χρωστική, την πυοκυανίνη, που έχει χρώμα κυανοπράσινο και χαρακτηρίζει τα στελέχη της χωρίς να χρειάζονται περισσότερες βιοχημικές δοκιμασίες για την τυποποίησή τους. Η πυοκυανίνη χρωματίζει τα εκκρίματα των λοιμώξεων που οφείλονται στην συγκεκριμένη ψευδομονάδα, για αυτό και ονομάζεται αεριογόνος ή πυοκυανική.

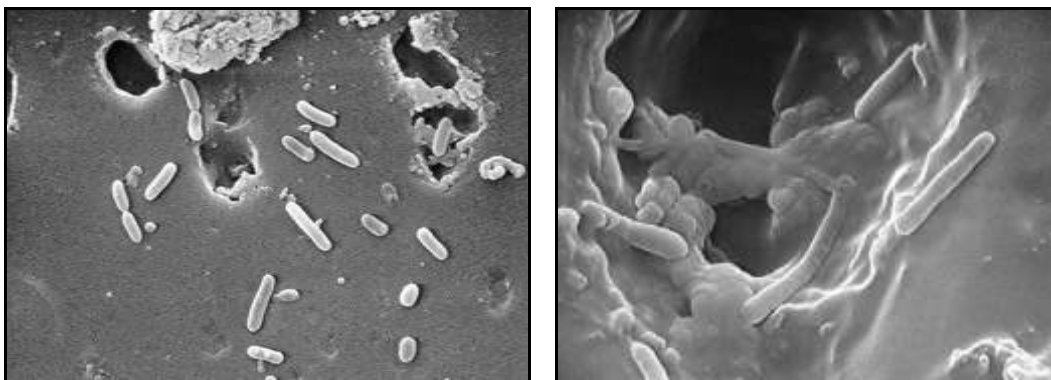
Όταν καλλιεργείται σε στερεά θρεπτικά υλικά μπορεί να δώσει ποικίλους τύπους αποικιών. Οι αποικίες μπορεί να είναι επίπεδες ή κυρτές με κυματώδη ή διαβρωμένη περιφέρεια, διαμέτρου 1-5mm. Στο McConkey άγαρ παρατηρούνται άχρωμες αποικίες διότι το βακτηρίδιο δε διασπά τη λακτόζη. Τα τρυβλία με στελέχη *Ps. aeruginosa* που παράγουν την πράσινη χρωστική πυοκυανίνη αποκτούν πράσινο σκούρο σχετικά χρώμα και μια ευχάριστη μυρωδιά φρούτου ή τσαγιού του βουνού.



Εικόνα 7. Καλλιέργεια *Ps. aeruginosa* σε τρυβλίο McConkey. Παραγωγή πυοκυανίνης.
(www.students.washington.edu/chena mos/medtechpics)

Οι Ψευδομονάδες παράγουν σπανιότερα και άλλες χρωστικές, όπως τις πυοερυθρίνη, πυομελανίνη και φθοριοσεΐνη. Η φθοριοσεΐνη είναι μία πράσινη φθορίζουσα χρωστική και οι καλλιέργειες του μικροοργανισμού που την παράγουν φθορίζουν, όταν προσπέσει σε αυτές υπεριώδης ακτινοβολία. Η πυοερυθρίνη είναι μία σκούρα ερυθρά χρωστική και η πυομελανίνη έχει χρώμα καστανόμαυρο.

Η *Ps. aeruginosa* είναι ένα πολύ σημαντικό βακτηρίδιο εδάφους, το οποίο είναι ικανό να καταβολίζει ένα ευρύ φάσμα οργανικών μορίων, όπως πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες και να κατασκευάζει ραμνολιπίδια, κινολόνες, υδροκυάνιο, φαιναζίνες, και λεκτίνες. Η δυνατότητα αυτού του μικροοργανισμού, το καθιστά ικανό να είναι πάντα παρόν σε περιβάλλοντα, όπως το έδαφος, το νερό, ο άνθρωπος, τα ζώα, τα φυτά, τα λύματα και τα νοσοκομεία (Lederberg et al., 2000). Επίσης, παρουσιάζει ενδογενή ανθεκτικότητα σε πολλά διαφορετικά είδη χημειοθεραπευτικών παραγόντων, καθώς και σε αντιβιοτικά, καθιστώντας το έτσι ένα πολύ δύσκολο εξαλείψιμο παθογόνο βακτήριο (Lederberg et al., 2000). Σε όλα τα oligotροπικά υδάτινα οικοσυστήματα, που περιέχουν υψηλή περιεκτικότητα σε διαλυμένο οξυγόνο και χαμηλά θρεπτικά φυτικά συστατικά, η *Ps. aeruginosa* είναι ο κυρίαρχος κάτοικος και αυτό την καθιστά τον πιο άφθονο οργανισμό στη γη.



Εικόνα 8. Ηλεκτρονικές μικρογραφίες σάρωσης της *Pseudomonas aeruginosa*. (Centers for Disease Control and Prevention (CDC))

4.4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Η *Ps. aeruginosa* είναι ένα προαιρετικά αερόβιος μικροοργανισμός. Παρόλο που μπορεί να χρησιμοποιεί παραπάνω από 75 οργανικές ενώσεις προκειμένου να αναπτυχθεί, μπορεί εύκολα να μεγαλώσει σε περιβάλλον οξικού οξέος και θεικού αμμωνίου, από όπου εξασφαλίζει άνθρακα και άζωτο. Αναπτύσσεται συνήθως σε θερμοκρασίες 25 °C έως 37 °C., επιβιώνει όμως και σε πιο ακραίες θερμοκρασίες. Ιδιαίτερα, η ικανότητά της να αναπτύσσεται στους 42 °C, τη διαχωρίζει από τα άλλα είδη του γένους.

Με προτιμώμενο μεταβολισμό αυτόν της αναπνοής, μπορεί και αποκτάει ενέργεια με μεταφορά ηλεκτρονίων από τη γλυκόζη, που είναι ένα μειωμένο υπόστρωμα, προς το οξυγόνο, που είναι ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων. Η γλυκόζη οξειδώνεται σε γλυκονικό οξύ στο περίπλασμα και εισέρχεται στο εσωτερικό της εσωτερικής μεμβράνης του βακτηριακού κυττάρου από ένα συγκεκριμένο ενεργό – εξαρτώμενο σύστημα πρόσληψης γλυκονικού οξέος. Μόλις βρεθεί στο εσωτερικό φωσφορυλιώνεται σε 6 – P – γλυκονικό οξύ, το οποίο θα εισέλθει στο κεντρικό μεταβολισμό για να παράγει ενέργεια για το κύτταρο.

Ωστόσο, όταν η *Ps. aeruginosa* βρίσκεται σε αναερόβιες συνθήκες, χρησιμοποιεί τα νιτρικά ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων. Υπό οξειδωτικές συνθήκες στρες, το βακτήριο συνθέτει σίδηρο ή μαγνήσιο, που περιέχουν ένζυμα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD), τα οποία καταλύουν την αντίδραση του O⁻ σε H₂O₂ και O₂. Τέλος, με τη χρήση καταλάσης αποτοξινώνει το H₂O₂ σε O₂ και H₂O (Lederberg et al., 2000).

Εκτός από την αντοχή στα διάφορα θρεπτικά υλικά, η *Ps. aeruginosa* επιβιώνει σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, στα ήπια αντισηπτικά και τα κοινά αντιβιοτικά (Blondel – Hill et al., 2007).

5. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ – ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΙΟΦΙΛΜ

Η *Ps. aeruginosa* χαρακτηρίστηκε ως ένας μικροοργανισμός «πανταχού παρών», δεδομένου ότι μπορεί να επιβιώσει τόσο σε αβιοτικό όσο και σε ανθρώπινο περιβάλλον. Αυτή του η ευελιξία οφείλεται σε ένα μεγάλο αριθμό ενζύμων που επιτρέπουν στην *Ps. aeruginosa* να χρησιμοποιεί μια ποικιλία ουσιών ως θρεπτικά συστατικά. Επιπλέον, έχει την ικανότητα να αλλάζει τον τρόπο καλλιέργειάς της από βλενώδη σε μη – βλενώδη περιβάλλοντα, με ταυτόχρονη σύνθεση αλγινικού οξέος (βλενώδης πολυσακχαρίτης). Έτσι, μπορεί να πολλαπλασιαστεί σε πλούσια σε οργανικές ύλες υδάτινα οικοσυστήματα, αλλά και στην επιφάνεια οργανικών υλών που διαβρέχονται από νερό.

Αν και οι περισσότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του βακτηρίου αυτού και των φυτών είναι επιζήμιες για τα φυτά, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι έχει βρεθεί ένα στέλεχος της *Ps. aeruginosa* που όντως υποστηρίζει την ανάπτυξη των

φυτών. Το χαρακτηριστικό αυτό, σε συνδυασμό με την ικανότητα της *Ps. Aeruginosa* να υποβαθμίζει τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, προτείνει μελλοντικές χρήσεις της για την περιβαλλοντική αποτοξίνωση των συνθετικών χημικών ουσιών και φυτοφαρμάκων, καθώς και για βιομηχανικούς σκοπούς.

Φυσικό περιβάλλον της *Ps. aeruginosa* αποτελεί το έδαφος και ιδιαίτερα όπου υπάρχει νερό και βλάστηση. Στο αβιοτικό περιβάλλον, ανιχνεύεται συνήθως σε δεξαμενές πόσιμου νερού, που έχουν ρυπανθεί από τα ζώα και τον άνθρωπο, όπως σε υπονόμους και νεροχύτες, εντός και εκτός νοσοκομειακών εγκαταστάσεων. Επίσης, μπορεί να βρεθεί σε πισίνες, τζακούζι και ιαματικές πηγές, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που αποτελούν ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη του βακτηρίου. Η άμεση επαφή μεταξύ του δέρματος και του μολυσμένου νερού από θερμές πηγές προκαλεί κνησμό στο μολυσμένο δέρμα, το αλλοιώνει και τελικά χρωματίζεται έντονα κόκκινο.

Η *Ps. aeruginosa* τείνει να σχηματίζει βιοφίλμ, τα οποία είναι πολύπλοκες βακτηριακές κοινότητες που προσκολλώνται σε μια ποικιλία επιφανειών, όπως μέταλλα, πλαστικά, ιατρικά υλικά εμφυτευμάτων, αλλά και σε ιστούς. Τα βιοφίλμ από τη στιγμή που σχηματίζονται είναι πολύ δύσκολο να καταστραφούν. Ανάλογα με τη θέση τους στο περιβάλλον που σχηματίζονται, μπορούν είτε να το ωφελούν είτε να το ζημιώνουν. Για παράδειγμα, τα βιοφίλμ που αναπτύσσονται στο εσωτερικό των σωλήνων νερού, μπορούν να διαβρώσουν και φράξουν τους σωλήνες αυτούς και κατ' επέκταση να επηρεάσουν τη δημόσια υγεία (Εικόνα 9). Αντιθέτως, αυτά που βρίσκονται σε βράχους και βότσαλα μέσα σε λίμνες και νερόλακκους, είναι μια σημαντική πηγή τροφής για πολλούς υδρόβιους οργανισμούς.

Clean Water and Biofilm Contamination



Εικόνα 9: Ανάπτυξη βιοφίλμ της *Ps. aeruginosa* σε σωλήνες υδρεύσεως (<http://www.sanecotec.com>)

Επιπλέον, η *Ps. aeruginosa* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας υγιών ατόμων, αποικίζοντας περιοχές όπως ο γαστρεντερικός σωλήνας, το δέρμα, οι μασχάλες και το περίνεο (Blondel – Hill et

al., 2007). Σε άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως ασθενείς με κυστική ίνωση (CF – cystic fibrosis), μπορεί να προκαλέσει χρόνιες μολύνσεις και θεωρείται η κύρια αιτία θανάτου από Gram – αρνητικά βακτήρια. Η πρόκληση της ινοκυστικής νόσου (CF) οφείλεται σε συγκεκριμένο στέλεχος της αεριογόνου ψευδομονάδας και πιο συγκεκριμένα στην εισπνοή του βακτηριδίου από τους ασθενείς, με αποτέλεσμα το σχηματισμό βιοφίλμ στον ανοσοκατασταλαμένο οργανισμό.

6. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένας ευκαιριακά παθογόνος μικροοργανισμός, ο οποίος δεν προκαλεί συνήθως ασθένειες σε υγιείς ανθρώπους. Έχει ελάχιστες διατροφικές απαιτήσεις και μπορεί να ανεχθεί μια μεγάλη ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών. Ανάλογα με τις συνθήκες, όμως, προκύπτουν συχνά επιδερμικές λοιμώξεις όταν η *Ps. aeruginosa* διαπερνά τις άμυνες του ανθρώπινου ξενιστή και εισέρχεται στο σώμα μέσω του δέρματος στην περιοχή ενός ανοικτού τραύματος.

Η *Ps. aeruginosa* μπορεί να μεταδοθεί σε ένα ξενιστή μέσω φοιτών (μικροβιοφόρες ουσίες), φορέων και εργαζομένων σε νοσοκομεία, που είναι πιθανοί φορείς για τα πολλαπλασιαζόμενα και ανθεκτικά στα αντιβιοτικά στελέχη του παθογόνου αυτού. Επιπλέον, οποιαδήποτε βακτηριακή παρουσία έχει ήδη εμφανιστεί στο δέρμα του θύματος εγκαύματος, προτού η ζημία μετατραπεί από έναν αβλαβές οργανισμό στην επιφάνεια του δέρματος σε μία πηγή μόλυνσης στην κυκλοφορία του αίματος και στους σωματικούς ιστούς του ίδιου ατόμου. Τέλος, η μετάδοση αυτού του βακτηρίου μπορεί να γίνει και μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων πόσιμων νερών, είτε αυτά προέρχονται από οικιακά δίκτυα ύδρευσης είτε από νοσοκομειακά δίκτυα.

Οι βλεφαρίδες και τα τριχίδια της *Ps. aeruginosa* διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στη μόλυνση των εγκαυμάτων και των πληγών και η απουσία τους από τα στελέχη αυτού του βακτηρίου μειώνει τη λοιμογόνο δράση του. Χωρίς αυτούς τους μορφολογικούς λοιμογόνους παράγοντες, η *Ps. aeruginosa* παρουσιάζει ένα σημαντικά μειωμένο ποσοστό επιβίωσης στο σημείο του τραύματος και μια μειωμένη ικανότητα διάδοσης εντός του οργανισμού ξενιστή. Η εξάπλωση της *Ps. aeruginosa* εντός των οργανισμών – ξενιστών εξαρτάται, επίσης, από την παραγωγή ελαστάσης του μικροοργανισμού, καθώς και άλλους μηχανισμούς πρωτεάσης. Η βακτηριακή ελαστάση και άλλες βακτηριακές πρωτεάσες διασπών τις πρωτεΐνες του ξενιστή, συμπεριλαμβανομένων των δομικών πρωτεϊνών που βρίσκονται μέσα σε μεμβράνες, διαταράσσοντας τα φυσικά εμπόδια του ξενιστή κατά την εξάπλωση της μόλυνσης.

Αποτελεί ένα μικροοργανισμό συχνά εμφανιζόμενο στις νοσοκομειακές κοινότητες και στους οίκους ευγηρίας, που θεωρούνται σημαντική πηγή βακτηριαμίας μέσω των ιατροτεχνολογικών προϊόντων. Επομένως, μπορεί να προκαλέσει θανατηφόρες λοιμώξεις σε ανοσοκατασταλαμένα άτομα, σε ασθενείς

με σοβαρά εγκαύματα, με σοβαρές δερματικές βλάβες, σε ασθενείς που πάσχουν από κυστική ίνωση, καθώς και σε χρόνιους πνευμονοπαθείς όπου προκαλεί κυρίως πνευμονία. Μετά από σοβαρή βλάβη του δέρματος, ο επιπολασμός της *Ps. aeruginosa* στο περιβάλλον αυξάνει την πιθανότητα της πρόσβασης του βακτηρίου στην κυκλοφορία του αίματος μέσα από το βαθιά εκτιθέμενο επιδερμικό ιστό του εγκαύματος του θύματος.

Οι λοιμώξεις που προκαλεί η *Ps. aeruginosa* είναι σοβαρές και επικίνδυνες, γιατί αφενός μεν προκαλεί νόσο σε άτομα ήδη επιβαρυνόμενα από άλλα νοσήματα, αφετέρου δε γιατί εμφανίζει ανθεκτικότητα στα περισσότερα αντιβιοτικά. Μετά την εγκατάσταση μικροβιαμίας από το βακτήριο αυτό, η θνητότητα ανέρχεται στο 70% των περιπτώσεων (Δημητρακόπουλος, 1982). Εξαιρουμένου του στελέχους της κυστικής ίνωσης, τα περισσότερα στελέχη της *Ps. aeruginosa* που επιτίθενται σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή, δεν είναι βλεννογόνα στελέχη. Ακόμα κι αν ένας μικρός αριθμός ασθενών που μολύνθηκαν, τελικά αναπτύξει σοβαρή σήψη (αλλοίωση δέρματος με παρουσία μαύρων στιγμάτων), οι περισσότεροι ασθενείς δεν θα εμφανίσουν προφανείς παθολογικές επιδράσεις του αποικισμού του βακτηρίου αυτού.

Η *Ps. aeruginosa* αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα του 3 – 6% των εξωνοσοκομειακών λοιμώξεων. Αντίθετα, όπως προαναφέρθηκε, ευθύνεται για ευκαιριακές λοιμώξεις σε διάφορες ομάδες ασθενών που νοσηλεύονται στο νοσοκομείο. Οι λοιμώξεις που προκαλεί είναι ενδονοσοκομειακές και εξωνοσοκομειακές και είναι οι παρακάτω:

Ⓞ **Κυστική ίνωση:** Το βακτήριο ανιχνεύεται στο αναπνευστικό σύστημα των ατόμων που πάσχουν από ινοκυστική νόσο του παγκρέατος. Πάνω από το 90% των στελεχών που απομονώνονται από τα πτύελα τέτοιων ασθενών έχουν βλενώδη χαρακτήρα, που σχετίζεται άμεσα με τη σοβαρότητα της νόσου.

Ⓞ **Ουρολοιμώξεις:** Προκαλούνται σε νοσοκομειακούς ασθενείς μετά από καθετηριασμό, κυστεοσκόπηση ή χειρουργικές επεμβάσεις του ουροποιητικού.

Ⓞ **Λοιμώξεις εγκαυμάτων:** Παρατηρείται εξωγενής αποικισμός του εγκαύματος, προερχόμενος από το νοσοκομειακό περιβάλλον, που μπορεί να εξελιχθεί σε διαπύηση του εγκαύματος, με βαθιές βλάβες του δέρματος, με συχνό επακόλουθο τη βακτηριαιμία και το θάνατο.

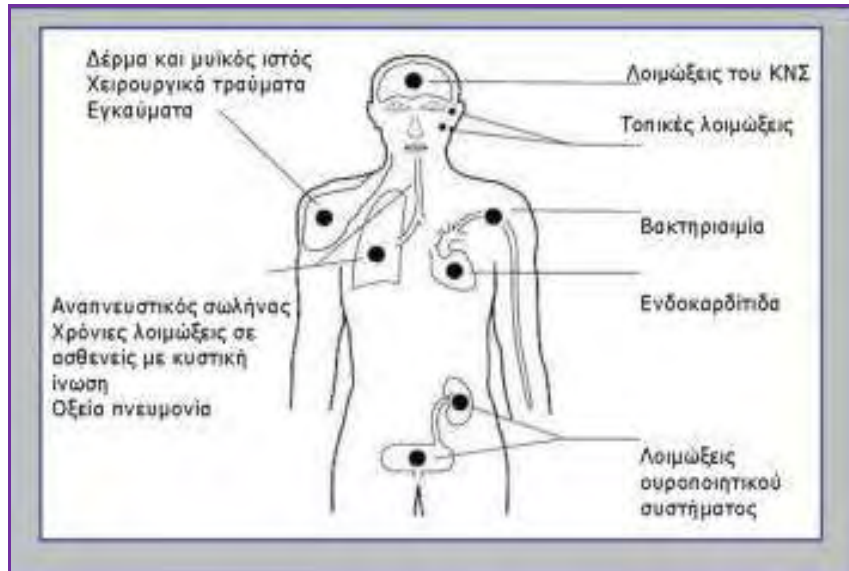
Ⓞ **Δερματικές λοιμώξεις:** Προκαλεί από κηλιδώδεις (κυτταρίτιδα, χρόνια παρονυχία, πυοδερματίτιδα κτλ.) μέχρι και φλυκταινώδεις βλάβες του δέρματος (γαγγραινώδες έκθυμα), όπως επίσης και θυλακίτιδα (Khabbaz, 1983), (Gustafson, 1983).

Ⓞ **Εξωτερική ωτίτιδα:** Μετά από κολύμβηση σε δεξαμενές (Swimmer's ear).

Ⓞ **Λοιμώξεις του οφθαλμού:** Προκαλείται επιπεφυκίτιδα και δακρυοκυστίτιδα μετά από χειρουργικές επεμβάσεις του κερατοειδούς.

Ⓞ **Λοιμώξεις Κ.Ν.Σ. – Αναπνευστικού:** Προκαλεί πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή μηνιγγίτιδα ή λοιμώξεις του αναπνευστικού σε νοσοκομειακούς ασθενείς μετά τη χρήση μολυσμένων αναπνευστήρων. Οι λοιμώξεις αυτές μπορεί να καταλήξουν σε βαρεία νεκρωτική πνευμονία με θνητότητα μέχρι και 80%.

- Ⓢ **Οστεομυελίτιδα:** Παρατηρείται κυρίως σε τοξικομανείς, σε ασθενείς που είναι σε αιματοδιάλυση και σε καθετηριασμούς της υποκλειδίου φλέβας.
- Ⓢ **Ενδοκαρδίτιδα:** Η θνητότητα ανέρχεται στο 70% των περιπτώσεων.
- Ⓢ **Σηπτική αρθρίτιδα:** Η *Ps. aeruginosa* αποτελεί το αίτιο σε ποσοστό 10% των αρθρίτιδων από Gram – αρνητικά βακτήρια.
- Ⓢ **Διαρροϊκό σύνδρομο:** Προσβάλλονται κυρίως τα νεογνά.



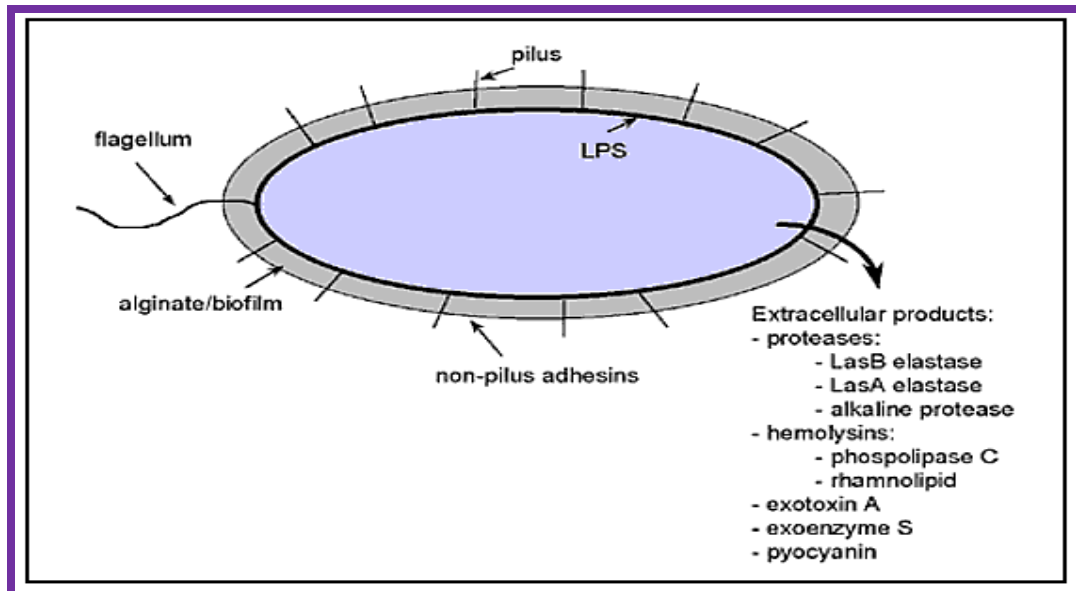
Εικόνα 11. Περιοχές λοίμωξης από *Ps. aeruginosa*

7. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η *Ps. aeruginosa* σπάνια προκαλεί ασθένεια σε υγιείς ανθρώπους. Συνήθως, συνδέεται με ασθενείς των οποίων το ανοσοποιητικό σύστημα βρίσκεται σε κίνδυνο λόγω ασθένειας ή τραυμάτων. Είναι ένα βακτήριο που αποκτά πρόσβαση σε ιστούς ασθενών μέσω εγκαυμάτων ή μέσω μιας σοβαρότερης νόσου, όπως η κυστική ίνωση (CF). Ο τρόπος με τον οποίο η *Pseudomonas aeruginosa* ασκεί την παθογόνο δράση της είναι πολύπλοκος και δεν έχει ακόμα πλήρως αποσαφηνιστεί. Πολλοί κυτταρικοί παράγοντες του μικροβίου αλλά και εξωκυττάρια προϊόντα έχουν κατά καιρούς ενοχοποιηθεί.

Η παθογένεια των στελεχών της *Ps. aeruginosa* στους ιστούς οφείλεται στους λοιμογόνους της παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να αποικίσουν τα κύτταρα του ξενιστή της. Οι παράγοντες αυτοί είναι διάφορες τοξίνες και ένζυμα που παράγονται και εκκρίνονται από αυτά τα βακτηριακά στελέχη, όπως για παράδειγμα η αλκαλική πρωτεάση, η ελαστάση, η αιμολυσίνη, η φωσφολιπάση C, το εξωένζυμο S, η εξωτοξίνη A, διάφορες χρωστικές και άλλα (Εικόνα 12). Αρχικά, η *Ps. aeruginosa* προσκολλάται στις ιστικές επιφάνειες χρησιμοποιώντας το έλκτρο, τα τριχίδια και το εξωένζυμο S που έχει, στη συνέχεια αναπαράγεται για να δημιουργήσει μολυσματικές μάζες και τέλος προκαλεί βλάβη στους ιστούς

με τη βοήθεια των λοιμογόνων παραγόντων της. Δεδομένου ότι οι ισχυρές οικοτοξίνες και ενδοτοξίνες που απελευθερώνονται από το βακτήριο κατά τη βακτηριαμμία συνεχίζουν να μολύνουν τον ξενιστή, ακόμη και μετά τη θανάτωση του βακτηρίου μέσω αντιβιοτικών, οι οξείες ασθένειες που προκαλούνται από *Ps. aeruginosa* τείνουν να είναι χρόνιες και απειλητικές για τη ζωή.

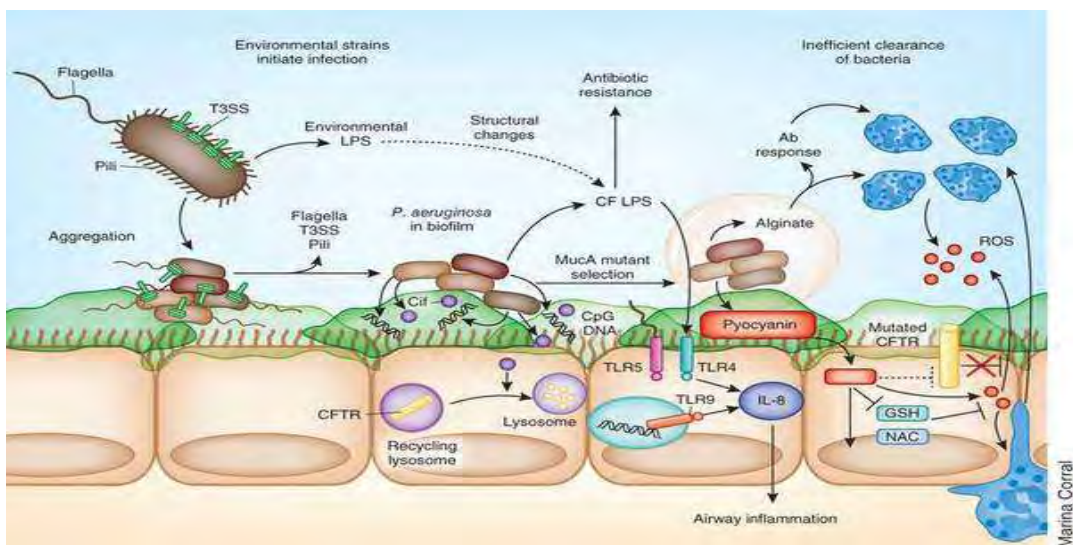


Εικόνα 12: Κυτταρικοί και εξωκυττάριοι λοιμογόνοι παράγοντες της *Ps. aeruginosa*. (<http://www.drlera.com>)

Η εξωτοξίνη A, για παράδειγμα, είναι η πλέον τοξική πρωτεΐνη που παράγεται από την *Ps. aeruginosa*, καταλύει την ADP – ριβοσυλίωση προς σχηματισμό ADP – ριβοζυλ – EF – 2, το οποίο αναστέλλει την πρωτεϊνική σύνθεση των κυττάρων του ξενιστή. Η ελαστάση, από την άλλη, είναι μια εξωκυτταρική πρωτεάση ψευδαργύρου που επιτίθεται στις ευκαρυωτικές πρωτεΐνες, όπως το κολλαγόνο και την ελαστίνη, καταστρέφει τις δομικές πρωτεΐνες του κυττάρου και καταβολίζει την ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη και τις πρωτεΐνες ορού – A (Lederberg et al., 2000). Το εξωένζυμο S, εμποδίζει τα στάδια ανάπτυξης των κυττάρων, η λευκοσιδίνη λύει τα λευκοκύτταρα, ενώ το αιμολυτικό λιπίδιο της *Ps. aeruginosa* δρα κατά των μακροφάγων. Επιπλέον, τα περισσότερα στελέχη εκκρίνουν μία οι περισσότερες χρωστικές, με πιο γνωστή την πυοκυανίνη, η οποία αναστέλλει την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η ανάπτυξη της *Ps. aeruginosa*. Η χρωστική αυτή έχει ισχυρή τοξική δράση, γιατί σε συνδυασμό με την πυοχελίνη, επάγει οξειδωτικό στρες και, τουλάχιστον in vitro, μπορεί να θανατώσει ενδοθηλιακά κύτταρα (Blondel – Hill et al., 2007).

Η αεριογόνος ψευδομονάδα προκαλεί αναπνευστικές λοιμώξεις κυρίως στους ασθενείς με ινοκυστική νόσο. Η κυστική ίνωση (CF) είναι κληρονομική

ασθένεια και είναι η πιο κοινή αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή σε Καυκάσιους. Το υπεύθυνο γονίδιο της βρίσκεται στο έβδομο χρωμόσωμα και παρουσιάζει πολύ μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων και απαλείψεων γονιδιακών περιοχών. Η δράση του φυσιολογικού χρωμοσώματος συνδέεται με την μεταφορά ιόντων χλωρίου και νατρίου δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Για αυτό το λόγο στους ασθενείς με κυστική ίνωση, υπάρχει διαταραχή της ισορροπίας νερού και αλάτων, με αποτέλεσμα την παραγωγή υπερβολικής βλέννας στους πνεύμονες και στο γαστρεντερικό σωλήνα. Η μεγάλη ποσότητα της βλέννας αποτελεί ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη δυνητικά παθογόνων, όπως η *Ps. aeruginosa*. Επομένως, ασθενείς με CF προσβάλλονται από την εισπνεόμενη αεριογόνο ψευδομονάδα, αυτή περνά στους πνεύμονες μέσω των αεραγωγών με τη βοήθεια του ελύτρου, των τριχιδίων και του συστήματος έκκρισης T3SS που έχει και μεταφέρεται τελικά στη ζώνη υποξίας (περιοχή χωρίς οξυγόνο), όπου μπορεί και κινείται ελεύθερα. Στη θέση αυτή, μετατρέπεται από αερόβιο σε αναερόβιο μικροοργανισμό και ξεκινά να σχηματίζει βιοφίλμ υπό αναερόβιες συνθήκες. Μόλις σχηματιστούν τα βιοφίλμ, κάθε νέα εισπνεόμενη *Ps. aeruginosa* διαισθάνεται την βακτηριακή της κοινότητα εντός του ασθενούς οργανισμού και εκκρίνει μικρού μοριακού βάρους φερομόνες. Αυτές ενισχύουν την επικοινωνία μεταξύ των ψευδομονάδων, βοηθούν στην περαιτέρω ανάπτυξη των βιοφίλμ και ενισχύουν την ανθεκτικότητα της *Ps. aeruginosa* έναντι των αντιβιοτικών, όπως τικαρκιλίνη, κεφαζιδίμη, τομπραμισίνη και σιπροφλοξασίνη.



Εικόνα 13. Προσαρμογή του εισπνεόμενου βακτηριδίου *Ps. aeruginosa* στον αεραγωγό ασθενών με κυστική ίνωση (Cohen and Prince, 2012).

Επιπλέον, η *Ps. aeruginosa* αποδείχθηκε ότι μολύνει τα ζώα. Σε πείραμα, εγχύθηκε ενδοφλέβια ένεση παθογόνου *Ps. aeruginosa* σε ποντικούς, οι οποίοι πέθαναν εντός 24-48hrs. Με έγχυση μικρότερης δόσης, εμφανίστηκαν χαρακτηριστικές ενδείξεις λοίμωξης, όπως απώλεια βάρους, εστιακές αλλοιώσεις στο ήπαρ, στη σπλήνα και τα νεφρά, που ακολουθείται από θάνατο εντός 3-10

ημερών. Η *Ps. aeruginosa* έχει επίσης βρεθεί ότι προκαλεί κρούσματα πνευμονίας σε ινδικά χοιρίδια.

8. ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

Ο μέσος χρόνος επιβίωσης της *Ps. aeruginosa* στους μόνιμα αποικισμένους ασθενείς είναι σημαντικά μικρότερος από αυτόν των ασθενών που δεν είναι αποικισμένοι. Για αυτόν το λόγο η πρόληψη της χρόνιας λοίμωξης από *Ps. aeruginosa* αποτελεί έναν από τους σημαντικούς στόχους στη θεραπεία των λοιμώξεων που προκαλεί. Μέχρι πρόσφατα θεωρείτο ότι εφ' όσον η *Ps. aeruginosa* αποικίσει τον αναπνευστικό βλεννογόνο είναι αδύνατο να εκριζωθεί. Αυτό σήμερα θεωρείται ότι είναι εφικτό σε αρκετούς ασθενείς, με την προϋπόθεση της έγκαιρης ανίχνευσης του αποικισμού και της έντονης και κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής. Η πρόσφατη εγκατάσταση της ψευδομονάδας χαρακτηρίζεται από χαμηλό μικροβιακό φορτίο, ευαισθησία της ψευδομονάδας στα αντιβιοτικά και απουσία βλεννωδών στελεχών.

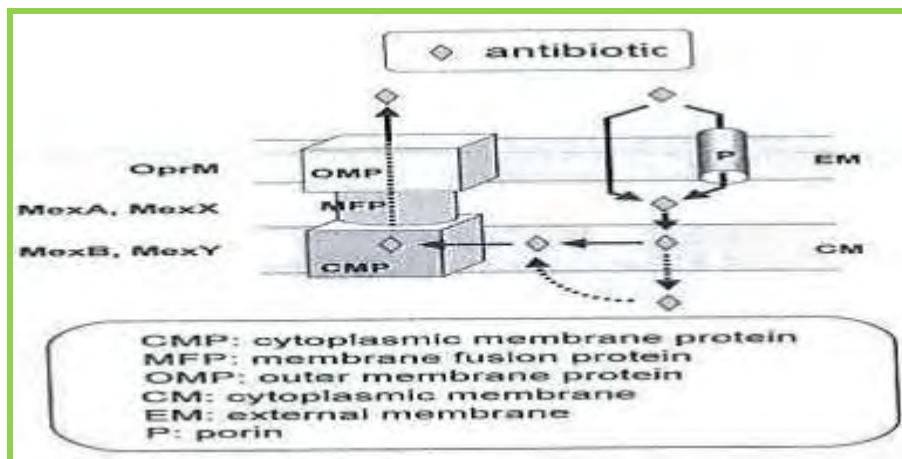
Μεγάλη σημασία έχει η έγκαιρη ανίχνευσή της, η οποία επιτυγχάνεται με συχνή λήψη καλλιιεργειών (τουλάχιστον ανά τρίμηνο), ώστε να επιτευχθεί θεραπευτική εκρίζωση πριν αυτή μετατραπεί σε ψευδομονάδα με βλεννώδες περιβλήμα. Για την εκρίζωση της πρόσφατα εγκατασταθείσας *Ps. aeruginosa* δεν υπάρχουν ομοφωνίες. Ένα γενικό περίγραμμα αντιμετώπισης είναι η χορήγηση σιπροφλοξασίνης για 3 εβδομάδες έως 3 μήνες σε συνδυασμό με εισπνεόμενα αντιβιοτικά με ή χωρίς ενδοφλέβια αντιψευδομοναδική αγωγή. Αντιβιοτικά με αντιψευδομοναδική δράση βρίσκουμε στις β- λακτάμες (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, μονοβακτάμες, καρβαπενάμες), στις αμινογλυκοσίδες, στις κινολόνες και στις πολυμυξίνες. Η θεραπεία της χρόνιας και σοβαρής λοίμωξης από *Ps. aeruginosa* στηρίζεται: (α) στην περιοδική χορήγηση ενδοφλέβιας αγωγής με δύο αντιψευδομοναδικά αντιβιοτικά (συνδυασμός αμινογλυκοσίδης και β – λακταμικού αντιβιοτικού) κατά τις παροξύνσεις της χρόνιας πνευμονοπάθειας και (β) τη χορήγηση εισπνεόμενων αντιβιοτικών στα μεσοδιαστήματα των ενδοφλεβίων αγωγών.

Πράγματι, ο πιο διαδεδομένος τρόπος θεραπείας ασθενών που έχουν μολυνθεί με την αεριογόνο ψευδομονάδα είναι η χορήγηση αντιβιοτικών. Όμως, η εμπειρική επιλογή των αντιβιοτικών γίνεται δύσκολα λόγω της συνεχούς εξελισσόμενης αντίστασης της *Ps. aeruginosa* στα αντιβιοτικά, και κυρίως λόγω εμφάνισης ενός πολυδύναμου, ανθεκτικού φαινοτύπου (MDR - Multi drug Resistance). Αυτή η κατάσταση του στελέχους της ψευδομονάδας, καθώς και μία ακατάλληλη θεραπεία, επηρεάζουν αρνητικά την έκβαση της θεραπείας των ασθενών (Hirsch and Tam, 2010).

Η ανθεκτικότητά της *Ps. aeruginosa* στα περισσότερα από τα συνηθισμένα αντιβιοτικά είναι ένα γεγονός που καθιστά την λοίμωξη από *Ps. aeruginosa*, αρκετά επικίνδυνη ειδικά σε άτομα με ήδη επιβαρυνόμενο ανοσοποιητικό. Η

ανθεκτικότητα της *Ps. aeruginosa* στα αντιβιοτικά οφείλεται στην ικανότητά της να αντιλαμβάνεται πότε το εξωτερικό στρώμα των βιοφίλμ καταστρέφεται, με αποτέλεσμα να ενδυναμώνει τα εσωτερικά στρώματα για να αποκαταστήσει τη βακτηριακή κοινότητα. Επιπλέον, αυτό που αυξάνει την άμυνα της *Ps. aeruginosa* έναντι πολλών χημειοθεραπευτικών παραγόντων και αντιβιοτικών είναι η εγγενής τους αντίσταση, που οφείλεται στη χαμηλή διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης. Αυτό προκαλείται είτε από την παραγωγή της πορίνης oprD, είτε από την παραγωγή των β – λακταμασών ενάντια στις πολυανθεκτικές αντλίες εκροής και στα αντιβιοτικά της β – λακτάμης. Το γονιδίωμα της *Ps. aeruginosa* έχει πολυάριθμες αντλίες εκροής, μεταξύ των οποίων οι MexAB – OprM και MexXY – OprM.

Οι κύριες αντλίες εκροής στην *Ps. aeruginosa* ανήκουν στην οικογένεια RND (Resistance - Nodulation - Division), οι οποίες χρησιμοποιούν κινητήρια δύναμη πρωτονίων ως πηγή ενέργειας. Αποτελούν ένα τριμερές σύστημα, που αποτελείται από μια αναπόσπαστη κυτταροπλασματική μεμβράνη που μεταφέρει το πρωτόνιο - φάρμακο, από ένα εξωτερικό μεμβρανικό κανάλι και μία περιπλασμική πρωτεΐνη σύντηξης, που συνδέει τις δύο άλλες πρωτεΐνες. Το σύστημα αυτό, επιτρέπει την αποβολή του υποστρώματος από την εσωτερική μεμβράνη απευθείας στο εξωκυτταρικό μέσο (Mesaros et al., 2005) (Εικόνα 14). Δέκα συστήματα εκροής έχουν χαρακτηριστεί για την *Ps. aeruginosa*, μεταξύ των οποίων τα MexAB – OprM και MexXY – OprM, τα οποία είναι επαγώγιμα όταν εκτίθεται σε αντιβιοτικά υποστρώματα (Avrain and Mertens, 2013).



Εικόνα 14. Πολυανθεκτικό σύστημα αντλίας εκροής RND της *Ps. Aeruginosa* (Mesaros et al., 2005)

Η θεραπεία της ανθεκτικότητας της *Ps. aeruginosa* μέσω των αντλιών εκροής χρησιμοποιείται μόνο σε πολύ εξειδικευμένα εργαστήρια. Ωστόσο, η πολυπλοκότητα της αντίστασης της ψευδομονάδας με τους φαινοτύπους MDR, και η απουσία διαγνωστικών εργαλείων, είναι πιθανότατα οι βασικοί λόγοι για την εγκατάλειψη χρήσης αυτού του μηχανισμού.

9. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Παρά την ευρεία κατανομή του μικροοργανισμού στο φυσικό του περιβάλλον, ο άνθρωπος είναι ο κύριος ξενιστής του. Η αεριογόνος ψευδομονάδα σαν ένοικος της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου είναι γνωστή από το 1880 (Barker, 1954). Τα ποσοστά αποικισμού εξαρτώνται από τη θέση του σώματος που αποικίζεται και ποικίλουν στα υγιή άτομα από μελέτη σε μελέτη: δέρμα 0 – 2%, ρινικός βλεννογόνος 0 – 3,3%, φάρυγγας 0 – 6% και κόπρανα 2,6 – 24%. Ο ρυθμός αποικισμού είναι κάπως υψηλότερος για νοσοκομειακούς ασθενείς, όπως άτομα που υφίστανται μεταμοσχεύσεις, διαβητικά άτομα, νεογνά, ασθενείς με κυστική ίνωση του παγκρέατος, εγκαυματίες κτλ. (Cross et al., 1983), και αναμφισβήτητα αυξάνει σημαντικά στη διάρκεια της παραμονής του ασθενούς στο νοσοκομείο.

Οι περισσότερες λοιμώξεις από ψευδομονάδα αποκτώνται είτε μέσα σε νοσοκομειακές εγκαταστάσεις, όπου ο αμυντικός μηχανισμός των ασθενών έχει κατασταλεί (π.χ. από κάποια ασθένεια ή αντιβιοτική θεραπεία) και επομένως είναι επιρρεπής σε μολύνσεις, είτε μέσω κατανάλωσης μολυσμένου νερού από *Ps. aeruginosa*. Όσον αφορά νοσοκομειακές λοιμώξεις, αρχικά, αποικίζονται από *Ps. aeruginosa* οι εγκαυματίες στον εντερικό τους σωλήνα και κατόπιν στην περιοχή του εγκαύματος.

Το ποσοστό αποικισμού, όμως, είναι υψηλότερο σε αιματολογικούς ασθενείς με οξεία λευχαιμία ή άλλες δυσπλασίες του μυελού. Σε ασθενείς με κακοήθεια απομονώνεται η *Ps. aeruginosa* από μία τουλάχιστον θέση σε ποσοστό 30% και αποτελεί το κύριο παθογόνο αίτιο σε ασθενείς με ινοκυστική νόσο με ποσοστό της τάξεως των 64 – 87% για χρόνια αποικισμό. Ο αποικισμός κατά την είσοδο σε μονάδα εντατικής θεραπείας σχετίζεται με την ηλικία, διάρκεια προηγούμενης παραμονής σε νοσοκομείο, την παρουσία ή όχι νόσου του γαστρεντερικού σωλήνα και την παρεντερική χορήγηση αντιβιοτικών (Stoodley and Thom, 1970), (Thomas et al., 1975).

Από την πρώτη αναγνωρισμένη αναφερθείσα λοίμωξη από το μικροοργανισμό το 1890, η αεριογόνος ψευδομονάδα συνδέεται με περιπτώσεις βακτηριαιμίας, με ποσοστό θνησιμότητας περίπου στο 50%. Η υψηλή θνησιμότητα οφείλεται σε συνδυασμό παραγόντων, όπως την υψηλή αντοχή του μικροοργανισμού αυτού στα αντιβιοτικά, την παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων και τοξινών κ.ά., με σημαντικότερο, όμως, την εξασθένηση της άμυνας του ξενιστή.

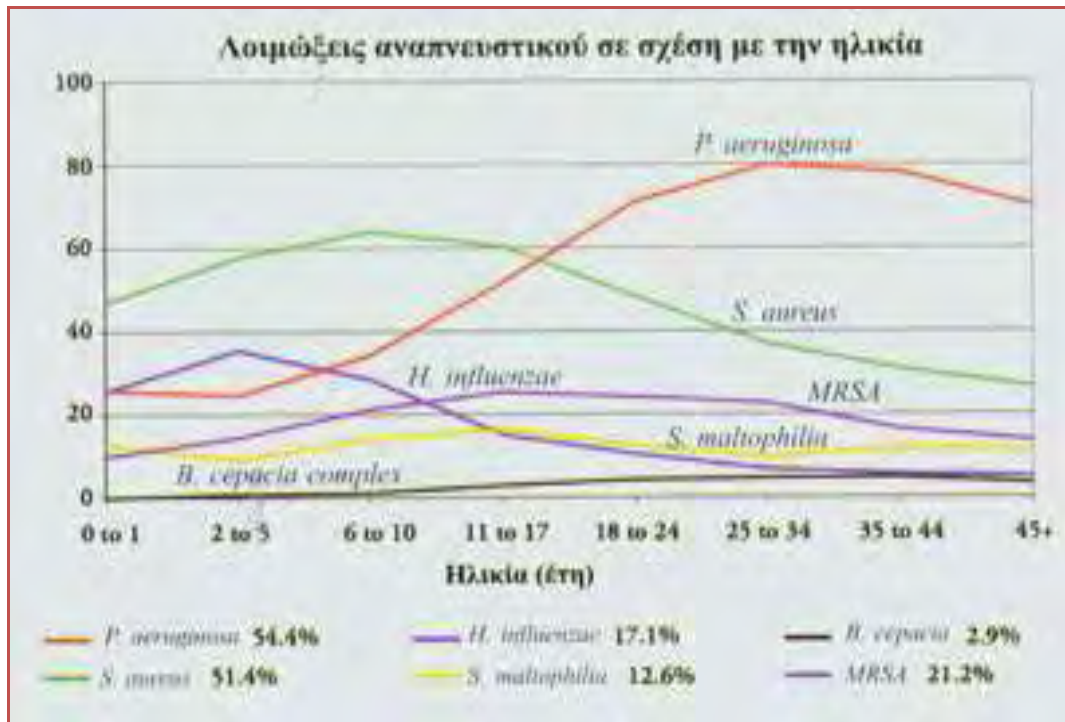
Στη *Ps. aeruginosa* οφείλεται το 10% όλων των Gram – αρνητικών συστηματικών λοιμώξεων, ενώ συνδέεται με το 50% της θνητότητας. Πιστεύεται ότι ο μικροοργανισμός αυτός μεταδίδεται στους ασθενείς είτε μέσω του νοσοκομειακού δικτύου ύδρευσης, είτε μέσω του νοσηλευτικού προσωπικού, είτε μέσω μολυσμένων αντικειμένων (Αντωνιάδης και συν., 1999). Επομένως, είναι ένα θανατηφόρο παθογόνο βακτηρίδιο που προκαλεί λοιμώξεις με ιδιαίτερα

υψηλά ποσοστά θνησιμότητας σε νοσοκομειακούς ασθενείς (Siegman et al., 1998), (Bodey et al., 1985), (Brewer et al., 1996), (Rello et al., 1997):

- ✿ 34% σε ασθενείς με βακτηριαιμία,
- ✿ 45% σε ασθενείς με νοσοκομειακή πνευμονία
- ✿ 70% σε ασθενείς με ενδοκαρδίτιδα
- ✿ 12% σε ασθενείς με ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος
- ✿ 8% σε ασθενείς με λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων
- ✿ 90% σε ασθενείς με κυστική ίνωση
- ✿ 10% σε ασθενείς με λοιμώξεις του αίματος κτλ.

Η σπουδαιότητα εφαρμογής αξιόπιστων εργαλείων για τον επιδημιολογικό έλεγχο της *Ps. aeruginosa* αποδεικνύεται από τα αποτελέσματα μεγάλων επιδημιολογικών ερευνών. Σύμφωνα με τη μελέτη του “European prevalence of infection in Intensive Care (EPIC)”, η *Ps. aeruginosa* ήταν το συχνότερο (28,7%) Gram – αρνητικό είδος που απομονώθηκε από ασθενείς με βρογχοπνευμονία, οι οποίοι νοσηλεύτηκαν σε 1417 μονάδες εντατικής θεραπείας σε 17 χώρες της δυτικής Ευρώπης (Vincent et al., 1995). Σύμφωνα με τη μελέτη του “National Nosocomial Infections Surveillance” (NNIS), 39.810 στελέχη Gram – αρνητικών βακτηριδίων συλλέχθηκαν στις Η.Π.Α. μεταξύ 1990 και 1999. Η *Ps. aeruginosa* υπερίσχυε (17%) μεταξύ των Gram – αρνητικών που συνδέθηκαν αιτιολογικά με νοσοκομειακή πνευμονία σε μονάδες εντατικής θεραπείας (CDC, 1999). Σύμφωνα με το SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program), η *Ps. aeruginosa* ήταν το τρίτο σε συχνότητα (10,6%) παθογόνο ανάμεσα σε 4267 στελέχη που απομονώθηκαν από αιματοκαλλιέργειες κατά το έτος 1997 στον Καναδά, Η.Π.Α. και Λατινική Αμερική (Diecema et al., 1997).

Η *Ps. aeruginosa* είναι το συχνότερο αίτιο χρόνιας ενδοβρογχικής λοίμωξης σε ασθενείς με κυστική ίνωση, και η συχνότητά της αυξάνεται με την ηλικία και την εξέλιξη της νόσου. Αποτελεί την κύρια αιτία νοσηρότητας και επιταχύνει την έκπτωση της αναπνευστικής λειτουργίας. Το 80% των ενηλίκων ασθενών με κυστική ίνωση έχουν χρόνια λοίμωξη από *Ps. aeruginosa*. Το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ) διεξήγαγε μια έρευνα σύμφωνα με την οποία μελετήθηκαν και συγκρίθηκαν όλα τα πιθανά παθογόνα βακτήρια που μπορούν να αποικίσουν τον αναπνευστικό βλεννογόνο και να προκαλέσουν λοιμώξεις του αναπνευστικού. Όπως διαπιστώνεται από το διάγραμμα της Εικόνας 15, η *Ps. aeruginosa* εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό λοιμώξεων του αναπνευστικού σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς, και το ποσοστό αυτό αυξάνεται αναλογικά με την αύξηση της ηλικίας του ασθενή (Κατελάρη και συν., 2010).



Εικόνα 15. Συχνότητα των διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών στις βρογχικές εκκρίσεις ανά ηλικία από δεδομένα καταγραφής στην Ελλάδα από 25.411 ασθενείς που πάσχουν από κυστική ίνωση. (<http://www2.keelrno.gr>)

Παρόλο που η *Ps. aeruginosa* εμφανίζεται κυρίως σε νοσοκομειακές περιπτώσεις λοιμώξεων, έγιναν ανάλογες έρευνες για να καθοριστεί κατά πόσο η κατανάλωση πόσιμου νερού, μολυσμένου από την αεριογόνο ψευδομονάδα, μπορεί να προκαλέσει τους διάφορους τύπους λοιμώξεων που προαναφέρθηκαν.

Σύμφωνα με μια μελέτη που έγινε στο Πανεπιστήμιο της Αντίγκουα, βρέθηκε ότι ο πληθυσμός της *Ps. aeruginosa*, τόσο στα πόσιμα νερά όσο και στα λύματα, υπερέβαινε κατά πολύ άλλους βακτηριακούς πληθυσμούς, όπως της *Shingella* και της *Salmonella*. Αυτός ο πληθυσμός βρέθηκε ότι σχετίζεται με λοιμώξεις του αναπνευστικού και της ουροδόχου κύστης και ότι αποδείχθηκε ότι η *Ps. aeruginosa* ήταν ιδιαίτερα ανθεκτική έναντι της πενικιλίνης G, που χρησιμοποιείται ως αντιβιοτικό σε τέτοιες περιπτώσεις (Rodriguez et al., 2012).

Επιπροσθέτως, υπήρξαν μια σειρά από κρούσματα που αφορούν την *Ps. aeruginosa*, στα οποία η κατανάλωση νερού είναι το κύριο αίτιο και η βασική πηγή της μόλυνσης. Ασθενείς που μολύνθηκαν με *Ps. aeruginosa* παρουσίασαν τους ίδιους γονότυπους που ανιχνεύθηκαν σε νερό της βρύσης (Bert et al., 1998), (Trautmann et al., 2001). Αυτό το είδος του προβλήματος επιλύθηκε μετά από υδραυλική αντικατάσταση (Ferroni et al., 1998).

Όλα τα παραπάνω στοιχεία καθιστούν επιτακτική την ανάγκη συνεχούς επιδημιολογικής επιτήρησης της ώστε να περιοριστούν οι λοιμώξεις που προκαλούνται από την *Pseudomonas aeruginosa*, ιδιαίτερα από πολυανθεκτικά

στελέχη της, τα οποία μπορεί να προκαλέσουν επιδημίες. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για την επιδημιολογική επιτήρηση της *Ps. aeruginosa*:

(α) Φαινοτυπικές μέθοδοι, στις οποίες ανήκουν η βιοτυπία, η λυσιτυπία, η πρωτεΐνοτυπία, η πυοσινοτυπία, η αντοτυπία και η οροτυπία.

(β) Γονοτυπικές μέθοδοι, στις οποίες ανήκουν η πλασμιδοτυπία, η ριβοτυπία, η ανάλυση του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο.

10. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ΣΕ ΠΟΣΙΜΑ ΝΕΡΑ

Η *Pseudomonas aeruginosa* ανήκει σε μια μεγάλη ομάδα βακτηρίων που ζουν ελεύθερα και είναι πανταχού παρόντα στο περιβάλλον. Ως ευκαιριακό παθογόνο βακτήριο, είναι ένας συχνά απαντώμενος φυσικός υδρόβιος οργανισμός και συνεπώς προσαρμόζεται εύκολα σε ολιγοτροφικές περιβαλλοντικές συνθήκες, οι οποίες χαρακτηρίζουν πολλά συστήματα πόσιμου νερού. Αυτός ο οργανισμός βρίσκεται συχνά σε φυσικά ύδατα, όπως λίμνες και ποτάμια σε συγκεντρώσεις 10/100ml. Ωστόσο, δεν βρίσκεται συχνά στο πόσιμο νερό, παρά μόνο στο 2% των δειγμάτων και σε συγκεντρώσεις 3 – 4 CFU/mL (Allen and Geldreich, 1975). Η *Pseudomonas aeruginosa* έχει βρεθεί στο μη επεξεργασμένο εμφιαλωμένο μεταλλικό νερό (Hunter, 1993), (Naze et al., 2010), στο νερό της βρύσης (Trautmann et al., 2001) και στο νερό των συστημάτων παροχής (Emde et al., 1992).

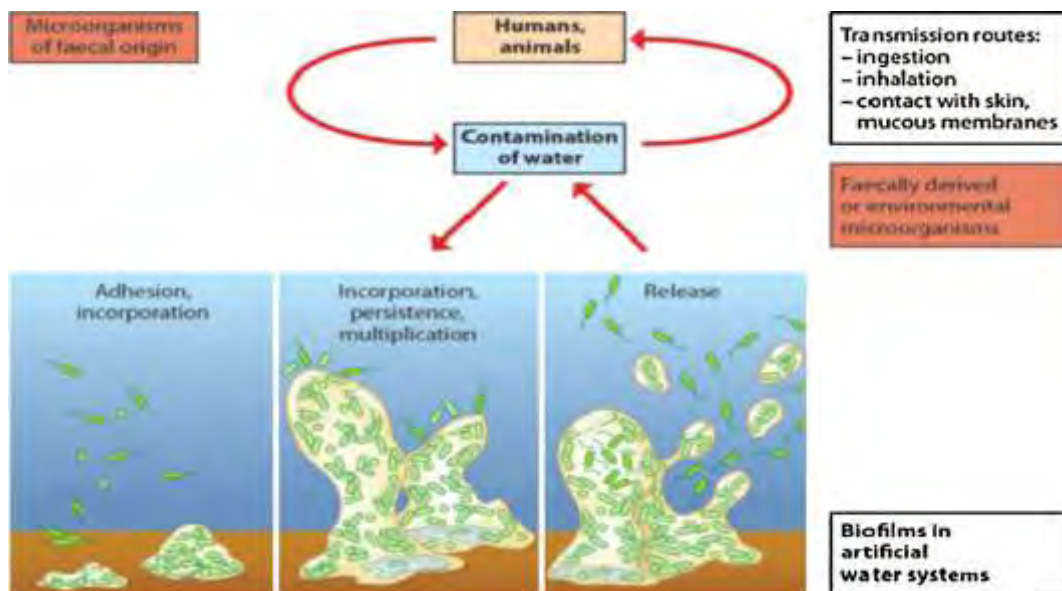
Η ικανότητα της αεριογόνου ψευδομονάδας να αποικίζει διάφορα περιβάλλοντα, και κυρίως υδάτινα, και η επαφή του βακτηρίου αυτού με εξασθενημένο πληθυσμό προκαλεί αρκετές περιπτώσεις εξωνοσοκομειακών λοιμώξεων κάθε χρόνο (Lavenir et al., 2007). Η παρουσία της στο πόσιμο νερό σχετίζεται ίσως περισσότερο με την ικανότητά της να αναπτύσσει βιοφίλμ σε είδη υγιεινής, όπως βρύσες, ντους, κλπ., παρά από την παρουσία της στο σύστημα παροχής νερού ή στο επεξεργασμένο πόσιμο νερό (εμφιαλωμένο νερό, ανθρακούχο κ.ά.). Παρόλα αυτά, η *Ps. aeruginosa* μπορεί να επιβιώσει σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό.

Αν και πολλά έχουν γραφτεί για τα βιοφίλμ στη βιομηχανία του πόσιμου νερού, πολύ λίγα έχουν αναφερθεί σχετικά με το ρόλο της *Ps. aeruginosa* στα βιοφίλμ. Το νερό της βρύσης φαίνεται να είναι μια σημαντική οδός μετάδοσης του βακτηρίου σε νοσοκομεία, λόγω αποικισμού της αεριογόνου ψευδομονάδας στις νοσοκομειακές υδραυλικές εγκαταστάσεις. Δεν είναι ακόμα σαφές αν τα αποτελέσματα του βακτηριακού αποικισμού οφείλονται στο σύστημα παροχής νερού (δίκτυο ύδρευσης) ή λόγω του προσωπικού του νοσοκομείου. Λοιμώξεις που μπορούν να προκληθούν από την *Ps. aeruginosa*, μπορούν να μειωθούν σημαντικά με την τοποθέτηση φίλτρων στις βρύσες (Mena and Gerba, 2009).

Ακόμα και σε χαμηλά όρια ανίχνευσης στα πόσιμα νερά, η *Ps. aeruginosa* ως παθογόνο βακτήριο μπορεί κατά λάθος να προσκολληθεί σε ήδη σχηματισμένα

βιοφίλμ, τα οποία στη συνέχεια λειτουργούν ως δεξαμενές του περιβάλλοντος τους και αντιπροσωπεύουν μια πιθανή πηγή της μόλυνσης του νερού.

Οποιαδήποτε αποκόλληση από τα βιοφίλμ οφείλεται στη συνεχή διάβρωση λόγω της συνεχούς παροχής νερού. Επιπλέον, οι «κηλίδες» των βιοφίλμ μπορούν να αποσπαστούν, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται τοπικά υψηλές πυκνότητες κυττάρων στην υδατική φάση («σύννεφα») (Εικόνα 16). Αν οι άνθρωποι ξενιστές είναι ευαίσθητοι και έχουν εκτεθεί στο μολυσμένο νερό, ο κίνδυνος για την υγεία είναι παρών. Στην πραγματικότητα, περίπου το 95% των βακτηριακών αριθμών σε ένα σύστημα παροχής πόσιμου νερού βρίσκονται στις επιφάνειες, ενώ μόνο το 5% βρίσκεται στην υδατική φάση και ανιχνεύεται με τη δειγματοληψία, όπως συνήθως χρησιμοποιούνται για την ποιότητα ελέγχου του νερού (Flemming et al., 2002).

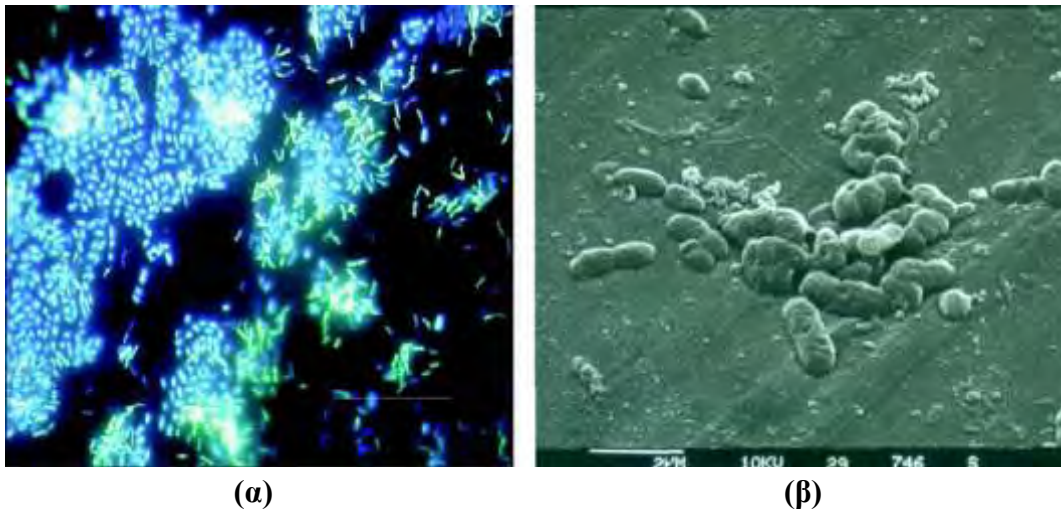


Εικόνα 16. Ο ρόλος των βιοφίλμ ως περιβαλλοντικές δεξαμενές και ως πηγές μόλυνσης των συστημάτων πόσιμου νερού (Wingender, 2011).

Η *Ps. aeruginosa* είναι ένα βακτήριο το οποίο είναι σε θέση να πολλαπλασιάζεται ταχύτατα στο πόσιμο νερό, υπό ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης, καθώς και στα τρόφιμα που περιέχουν νερό (Legnani et al., 1999), (Grobe et al., 2001), (Leclerc et al., 2002). Οι τυχόν υψηλές συγκεντρώσεις της *Ps. aeruginosa* που ανιχνεύονται σε περιβαλλοντικά ή κλινικά δείγματα οφείλονται κυρίως σε παράγοντες που ευνοούν την ανάπτυξη αυτού του βακτηρίου, όπως υψηλή θερμοκρασία, αφθονία θρεπτικών συστατικών, υγρασία και ελλιπής αερισμός. Το γεγονός αυτό μπορεί να επιφέρει σοβαρό κίνδυνο στην παραγωγή τροφίμων και να αποτελέσει επικείμενη απειλή για την ανθρώπινη υγεία.

Η στρατηγική των προμηθευτών πόσιμου νερού είναι να περιορίσουν την ανάπτυξη της *Ps. aeruginosa* και κατ' επέκταση το σχηματισμό βιοφίλμ και

βασίζεται στην εξάντληση των θρεπτικών συστατικών ως στόχο της επεξεργασίας νερού. Τα βιοφίλμ είναι παρόντα σε όλες τις εσωτερικές επιφάνειες και αντιπροσωπεύουν τοπικές συσσωρεύσεις κυττάρων, αλλά εμφανίζονται συνήθως λεπτά και ανομοιογενή (Εικόνα 17). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην παρουσιάζονται αυξημένοι μικροβιακοί αριθμοί στην πορεία του νερού προς τον καταναλωτή. Οι προμηθευτές, όμως, του πόσιμου νερού ελέγχουν μόνο την παραγωγή του πόσιμου νερού και την παροχή του μέσω των συστημάτων ύδρευσης, αλλά και τη διανομή του νερού στις βιομηχανίες τροφίμων (WHO, 2004a). Ο έλεγχος αυτός είναι απαραίτητος για την αποφυγή καταστάσεων που μπορούν να επιφέρουν βακτηριακή ανάπτυξη, όπως στασιμότητα και σκληρότητα του νερού, μη επαρκή υλικά σύνδεσης, διάβρωση σωλήνων νερού κτλ., και να οδηγήσουν στο τέλος σε ανεπιθύμητο σχηματισμό βιοφίλμ (WHO, 2004b, 2006). Αυτό θα μπορούσε να είναι και ο λόγος για την παρουσία *Pseudomonas aeruginosa* σε μία ισπανική εταιρεία, όπου οι αγωγοί ύδρευσης ήταν 20 ετών.



Εικόνα 17. (α) Σχηματισμός βιοφίλμ στην επιφάνεια του χάλυβα μετά από 14 ημέρες έκθεσης σε πόσιμο νερό, όπως απεικονίζονται με μικροσκοπία επιφθορισμού με μεγέθυνση $\times 1000$ (Donlan, 2002) **(β)** Μικρογράφημα ηλεκτρονίων σάρωσης μικροαποικιών που σχηματίζονται σε χάλυβα μετά την έκθεση για 14 ημέρες σε πόσιμο νερό.

Οι κίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία που συνδέονται με την έκθεση σε *Ps. aeruginosa* μέσω της κατάποσης του πόσιμου νερού εκτιμήθηκαν χαμηλοί. Ο κίνδυνος είναι ελαφρώς υψηλότερος, αν κάποιο άτομο λαμβάνει αντιβιοτικό ανθεκτικό στην *Ps. aeruginosa*. Το γεγονός ότι κάποια άτομα υπό θεραπεία με χορήγηση αμικιλλίνης είναι πιο επιρρεπή σε γαστρεντερική μόλυνση λόγω της *Pseudomonas aeruginosa*, οφείλεται πιθανότατα σε καταστολή της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας, η οποία θα επιτρέψει το βακτήριο αυτό να αποικίσει.

Παρά το γεγονός ότι η *Ps. aeruginosa* έχει τη φήμη ότι είναι ένα ανθεκτικό σε απολύμανση βακτήριο, οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι δεν παρουσιάζει καμία σημαντική αντίσταση στα απολυμαντικά που χρησιμοποιούνται για την

επεξεργασία του πόσιμου νερού, όπως το χλώριο, οι χλωραμίνες, το όζον και το ιώδιο. Το 1990, μέσω μιας ερευνητικής μελέτης, ο Wolfe απέδειξε ότι η *Ps. aeruginosa* είναι ελαφρώς ανθεκτικότερη στην απολύμανση με υπεριώδη ακτινοβολία (UV) από ό,τι τα περισσότερα άλλα βακτήρια.

Η παρουσία της *Ps. aeruginosa* στο πόσιμο νερό είναι δείκτης υποβάθμισης της βακτηριολογικής ποιότητας και συνήθως σχετίζεται με παράπονα οσμής, γεύσης και θολότητας σε χαμηλές παροχές του νερού στο δίκτυο ή αύξηση της θερμοκρασίας του. Η συγκέντρωση του βακτηρίου αυτού μπορεί να αποτελέσει δείκτη της καλής κατάστασης ενός δικτύου διανομής νερού, καθώς και της καλής ποιότητας του πόσιμου νερού. Οι τεχνικές μοριακής βιολογίας έχουν χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια για την εξέταση του νερού για ποικίλους σκοπούς, όπως για τον έλεγχο και τη βελτιστοποίηση της ποιότητας του νερού (Frahm et al., 1998), (Frahm and Obst, 2003), (Grobe et al., 2001), (Schwartz et al., 1998, 2003). Σύμφωνα με την Νομοθετική Οδηγία 98/83/EC για το πόσιμο νερό (EU, 1998) της Ευρωπαϊκής Ένωσης, μικροοργανισμοί – δείκτες, όπως η *Ps. aeruginosa*, θα πρέπει να παρακολουθούνται σε τακτική βάση στο πόσιμο νερό προκειμένου να ελέγχεται συστηματικά η μικροβιακή ποιότητα του νερού των δημόσιων συστημάτων παροχής νερού.

11. ΤΡΟΠΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Η απλή και ταχεία ανίχνευση της *Ps. aeruginosa* είναι απαραίτητη για την πιο αποτελεσματική προστασία της δημόσιας υγείας. Αυτό ισχύει ιδιαίτερος σε νοσοκομεία και κλινικές εγκαταστάσεις, όπου υπάρχει μεγάλος κίνδυνος μόλυνσης και ανάπτυξης, έκθεσης και διάδοσης, καθώς και μόλυνσης των ευαίσθητων ομάδων ατόμων. Δοκιμές έγκυρες και γρήγορες, οδηγούν σε έγκαιρη ανίχνευση, έτσι ώστε να μπορούν να εφαρμοστούν στρατηγικές παρέμβασης για τη μείωση της έκθεσης των εκάστοτε ατόμων στη μόλυνση.

Για την ταυτοποίηση της *Pseudomonas aeruginosa* αλλά και για τη διάγνωση των λοιμώξεων που μπορεί να προκαλέσει, χρησιμοποιούμε τόσο κλασσικές όσο και μοριακές μεθόδους ανίχνευσης.

11.1 ΚΛΑΣΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι κλασσικές μέθοδοι ανίχνευσης μικροοργανισμών σε δείγματα περιλαμβάνουν την άμεση μικροσκοπική παρατήρηση ύστερα από κατάλληλη χρώση (άμεσο παρασκεύασμα), την απομόνωση σε καλλιέργεια και την αναγνώριση μέσω μιας σειράς χαρακτηριστικών αντιδράσεων (βιοχημικές αντιδράσεις).

11.1.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Για την εργαστηριακή διάγνωση, η *Ps. aeruginosa* αναπτύσσεται και απομονώνεται σε αιματούχο άγαρ, tryptic soy ή MacConkey άγαρ. Ουσίες, όπως η σετριμίδη, ακεταμίδη, νιτροφουραντοΐνη και το C390 προστίθενται στα μέσα ανάπτυξης σαν εκλεκτικοί παράγοντες, προκειμένου να απομονωθεί το βακτήριο αυτό από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα (Blondel – Hill et al., 2007). Οι αποικίες περιβάλλονται συχνά από πράσινο χρώμα, άλλο αναγνωριστικό χαρακτηριστικό τους, που οφείλεται στην παραγωγή της κυανοπράσινης χρωστικής πυοκυανίνης. Ταυτοποιείται από τη χρώση κατά Gram, από τη μορφολογία, το χρώμα και την ευχάριστη χαρακτηριστική οσμή της.

Ένας άλλος τύπος αποικιών εμφανίζεται κυρίως σε στελέχη της *Ps. aeruginosa* που απομονώνονται από πτύελα ασθενών με ινοκυστική νόσο του παγκρέατος. Οι αποικίες που σχηματίζονται είναι σχετικά μεγάλες και πολύ βλενώδεις και είναι δύσκολη η παραλαβή μεμονωμένων αποικιών. Μετά από συνεχή ανακαλλιέργειες παρατηρείται ελάττωση της ικανότητας παραγωγή βλέννης ή και απώλεια αυτής, με αποτέλεσμα την παραγωγή μακροσκοπικά μη βλενώδων αποικιών, των καλούμενων *revertant* (Govan, 1975).



Εικόνα 18. Αποικίες *Ps. aeruginosa* σε τρυβλίο με MacConkey άγαρ.
(Blondel – Hill et al., 2007)

Ένα ακόμα κύριο χαρακτηριστικό που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της αεριογόνου ψευδομονάδας είναι η παραγωγή οξειδάσης. Για την αντίδραση της οξειδάσης χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα 1% του αντιδραστήριου τέτρα – μέθυλο – παραφαινυλοδιαμίνη, με το οποίο καλύπτονται οι αποικίες. Μετά την απομάκρυνση του αντιδραστήριου, η αλλαγή των αποικιών σε μπλε – μωβ δηλώνει το θετικό αποτέλεσμα, την παραγωγή δηλαδή οξειδάσης από την *Ps. aeruginosa* (Blondel – Hill et al., 2007).

11.1.2 TEST API

Μετά την ανάπτυξη του βακτηρίου στην καλλιέργεια για τουλάχιστον 24hrs, ακολουθεί μια σειρά δοκιμών βιοχημικών αντιδράσεων, οι οποίες ελέγχουν συνήθως την παρουσία ειδικών ενζύμων και στο σύνολό τους χαρακτηρίζουν το μικροοργανισμό που εξετάζεται. Για τον έλεγχο παρουσίας των ειδικών ενζύμων στην *Pseudomonas aeruginosa* χρησιμοποιούνται αντιδράσεις οξειδάσης. Για μικροοργανισμούς, όπως η αεριογόνος ψευδομονάδα, οι βιοχημικές αντιδράσεις που χρησιμοποιούνται βασίζονται στην ικανότητα στην αλλαγή του χρώματος δεικτών pH, ανάλογα με την οξύτητα του προϊόντος.

Επομένως, για την ταυτοποίηση του μικροοργανισμού αυτού χρησιμοποιούνται έτοιμα εμπορικά συστήματα ταυτοποίησης που βασίζονται σε βιοχημικές αντιδράσεις, όπως το API20 NE (bioMerieux Vitek, Marcy l'Etoile, France) και το RapID NF Plus (Remel Inc., Lenexa, Kans) (Blondel – Hill et al., 2007).



Εικόνα 19. Test API για την ταυτοποίηση πολλών Gram – αρνητικών βακτηρίων ταυτόχρονα

11.1.3 ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ CLSM

Η συνεστιακή μικροσκοπία CLSM (confocal laser scanning microscopy) αποτελεί μια συμβατική μέθοδο ανίχνευσης μικροοργανισμών, όπου με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης με laser και κατάλληλη χρώση του βακτηριακού κυττάρου, παρατηρούνται οπτικές «τομές» στα υπό εξέταση δείγματα. Η χρήση laser ελαχιστοποιεί τις πιθανές βλάβες που μπορεί να υποστεί το δείγμα κατά τη μέθοδο, επομένως οι τρισδιάστατες κυτταρικές δομές είναι ευκρινέστερες και η παρακολούθηση της κίνησης των μορίων των ζωντανών κυττάρων γίνεται ευκολότερη. Η ταυτοποίηση μέσω της μικροσκοπικής αυτής παρατήρησης δεν είναι πάντα εύκολη, είτε γιατί κάποια βακτήρια δε χρωματίζονται καλά με τις υπάρχουσες χρώσεις, είτε γιατί ακόμα και αν χρωματίζονται είναι δύσκολο να εντοπιστούν λόγω της μικρής συγκέντρωσής

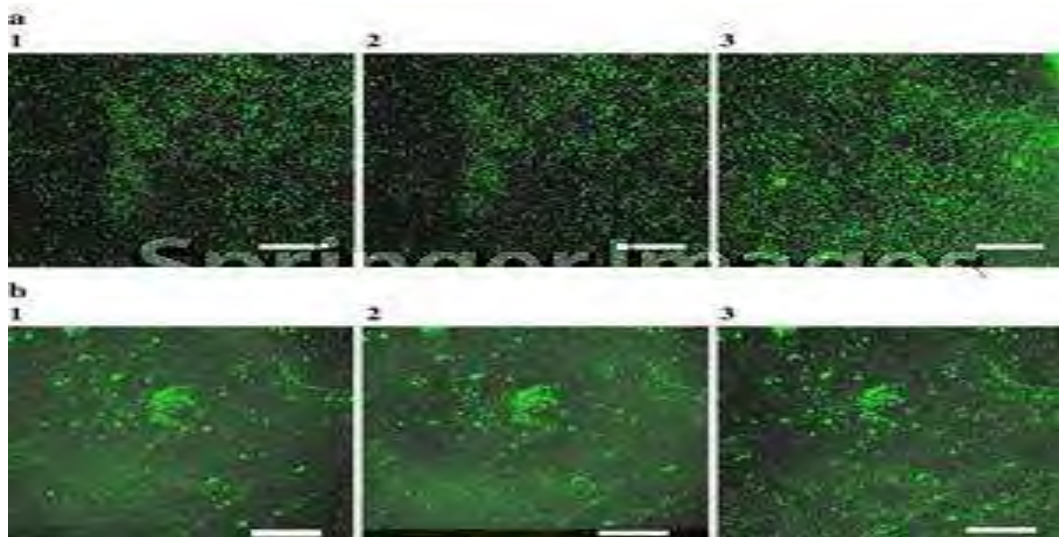
τους σε κλινικά δείγματα, όπως αίμα, πτύελα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Η *Ps. aeruginosa* λόγω της κυανοπράσινης πυοκυανίνης που περιέχει, φθορίζει στα εκάστοτε δείγματα με τη χρήση της CLSM (Εικόνα 20).

Η χρήση της συνεστιακής μικροσκοπίας CLSM χρησιμοποιείται για:

α) την παρατήρηση της εισόδου των λοιμογόνων παραγόντων (βακτηρίων, παρασίτων και ιών) στα κύτταρα και τους ιστούς του οργανισμού, καθώς και για τη μελέτη της πορείας και της εδραίωσης της λοίμωξης σε πραγματικό χρόνο, με σκοπό την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων,

β) τη μελέτη των κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος και τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλα συστήματα του οργανισμού και

γ) την παρατήρηση της εξέλιξης καρκινικών όγκων και την κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν σε μετάσταση προκειμένου να αναπτυχθούν νέα στοχευμένα φάρμακα.



Εικόνα 20. Οπτικές τομές ζωντανών κυττάρων της *Ps. aeruginosa* που ελήφθησαν με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με λέιζερ (CLSM), μέσω των οποίων βλέπουμε την παροχή των σωματιδίων βιοφίλμ και εκτιμούμε το ποσοστό κάλυψης επιφάνειάς τους: **(α)** ένα μονοειδικό βιοφίλμ που σχηματίζεται από την *Pseudomonas aeruginosa* σε ασθενείς χωρίς κυστική ίνωση και **(β)** βιοφίλμ πτυέλων ασθενών με κυστική ίνωση (CF), που εμφανίζουν το δομικό μοτίβο ενός πολυειδικού βακτηριακού βιοφίλμ (Spasenovski et al., 2010).

11.2 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα τελευταία χρόνια επιδιώκεται όλο και περισσότερο η ανάπτυξη και χρήση μοριακών τεχνικών ως επιπρόσθετο διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση των βακτηρίων και των λοιμώξεων που αυτά προκαλούν. Οι τεχνικές αυτές έχουν βελτιώσει κατά πολύ την ειδικότητα των μεθόδων για την ανίχνευση διαφόρων τύπων ασθενειών έως και καρκινωμάτων, καθώς επίσης έχουν μειώσει

τον κίνδυνο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων που μπορεί να προκύψουν από τα βιοχημικά τεστ. Οι μοριακές μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί στη Βακτηριολογία για τη μελέτη της αντοχής των μικροβίων στα αντιβιοτικά, την ανίχνευση απαιτητικών ή βραδέως αναπτυσσομένων βακτηρίων και στην ταχεία ανίχνευση των σοβαρών βακτηριακών λοιμώξεων, ακόμα και μετά από χορήγηση αντιβιοτικών.

11.2.1 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Την τελευταία δεκαετία, η ολοένα αυξανόμενη εφαρμογή της τεχνικής της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) έχει δώσει νέα ώθηση στις διαγνωστικές τεχνικές και ιδιαίτερα σε αυτές της Μικροβιολογίας αντικαθιστώντας τις συμβατικές μεθόδους (βιοχημικές δοκιμασίες, μικροσκοπική παρατήρηση, κυτταροκαλλιέργειες, ανοσολογικές μέθοδοι). Η PCR αποτελεί μια πιο ειδική και ευαίσθητη μέθοδο, εφόσον στοχεύει σε γονιδιακό επίπεδο και έχει αποδειχθεί πως είναι ικανή να ανιχνεύσει την ύπαρξη μικροοργανισμών ακόμα και σε παθολογικά υλικά με πολύ χαμηλό μικροβιακό φορτίο. Επί του παρόντος, η PCR χρησιμοποιείται ευρύτατα λόγω της αξιοπιστίας και της ευαισθησίας που παρέχει ως μέθοδος, αν και δεν παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη βιωσιμότητα του υπό εξέταση βακτηρίου *Ps. aeruginosa* (Khan and Yadav, 2004), (Anuj et al., 2009), (Deschaght et al., 2009), (Feizabadi et al., 2010), (Subrayan et al., 2010). Για τη γενετική ταυτοποίηση και το χαρακτηρισμό του ειδών *Pseudomonas* μέσω των μεθόδων PCR έχουν αναφερθεί διάφορα γονίδια – στόχοι, όπως 16S rRNA (Relman et al., 1992), *toxA* (Khan and Cerniglia, 1994), *oprI*, *oprL* (De Vos et al., 1997), *algD* (da Silva Filho et al., 2004) και *gyrB* (Qin et al., 2003).

Συγκεκριμένα, η PCR, σύμφωνα με σχετικές δημοσιεύσεις μπορεί να ανιχνεύει την ύπαρξη παθογόνων βακτηρίων, όπως η *Ps. aeruginosa*, ακόμα και σε περιπτώσεις που οι καλλιέργειες είναι αρνητικές (Cherian et al., 1998), (Pandit et al., 2005). Αυτό συμβαίνει πολύ συχνά όταν η λήψη των βιολογικών υλικών έχει γίνει μετά τη χορήγηση του αντιβιοτικού, οπότε ο πληθυσμός των βακτηρίων σε αυτά έχει μειωθεί σημαντικά. Για το λόγο αυτό, η PCR αποτελεί πλέον σημαντικό εργαλείο στη διάγνωση μικροβιακών νόσων και λοιμώξεων που προκαλούνται από βακτήρια όπως η *Pseudomonas aeruginosa*, όπου η ταχεία και ακριβής ανίχνευση του μικροοργανισμού παίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία και την επιδημιολογική επιτήρηση.

11.2.2 REAL – TIME PCR

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR), που ονομάζεται επίσης αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time – PCR), είναι μια εργαστηριακή τεχνική της μοριακής βιολογίας βασισμένη στην απλή μέθοδο της PCR. Η qPCR χρησιμοποιείται για να ενισχύσει και ταυτόχρονα να ποσοτικοποιήσει ένα στοχευόμενο μόριο DNA, για μία ή περισσότερες ειδικές

αλληλουχίες στο ίδιο δείγμα DNA. Η ποσότητα αυτή μπορεί να είναι είτε ένας απόλυτος αριθμός των αντιγράφων είτε ένας ημι – ποσοτικός προσδιορισμός.

Η διαδικασία της qPCR ακολουθεί τη γενική αρχή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και το βασικό χαρακτηριστικό της είναι ότι το ενισχυμένο DNA ανιχνεύεται καθώς η αντίδραση εξελίσσεται σε "πραγματικό χρόνο". Η Real-time PCR υπερέρχει από τις συμβατικές μεθόδους ως προς την διαγνωστική ικανότητα και την ταχύτητά. Υπάρχουν δύο μέθοδοι για την ανίχνευση των προϊόντων με Real – Time PCR: (α) με τη χρήση μη ειδικών φθορίζουσων χρωστικών που παρεμβάλλονται με οποιοδήποτε δίκλωνο μόριο DNA, όπως τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I, και (β) με τη βοήθεια ειδικών ανιχνευτών DNA, που αποτελούνται από ολιγονουκλεοτίδια επισημασμένα με μια φθορίζουσα χρωστική, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση μόνο μετά την υβριδοποίηση του ανιχνευτή με τη συμπληρωματική του αλληλουχία (VanGuilder et al., 2008).

Κατ' επέκταση, με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός του βακτηριακού φορτίου και τα προϊόντα που προκύπτουν από τη Real – Time PCR μπορούν να διαχωριστούν ελέγχοντας τις καμπύλες αποδιάταξης. Έτσι, εκτός από την υπερβολική ευαισθησία και επαναληψιμότητα της μεθόδου, η διαδικασία της qPCR δίνει την δυνατότητα στον ερευνητή να παρακολουθεί την αντίδραση της PCR σε πραγματικό χρόνο.

11.2.3 MULTIPLEX PCR

Στην Πολλαπλή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης ή Multiplex PCR, όπως ονομάζεται διαφορετικά, ενισχύονται ταυτόχρονα δύο ή περισσότερες αλληλουχίες γενετικού υλικού σε μια αντίδραση (Tang et al. 1999). Τα εκκινητικά μόρια (primers) που χρησιμοποιούνται στις πολλαπλές PCR πρέπει να είναι σχεδιασμένα προσεκτικά, ώστε να έχουν όσο το δυνατόν πιο κοντινές θερμοκρασίες υβριδισμού και να μην έχουν συμπληρωματικά άκρα για να μπορεί να αποφεύγεται ο διμερισμός τους.

Η ανάπτυξη τεχνικών πολλαπλής PCR αποτελεί χρονοβόρα διαδικασία, εφόσον απαιτεί τέλεια και συγχρονισμένη βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι εξίσου ικανοποιητικά για όλες τις αλληλουχίες που ενισχύονται. Ιδιαίτερα σημαντική και χρήσιμη κρίνεται η εφαρμογή μεθόδων Multiplex PCR στη Μικροβιολογία, καθώς παρέχουν τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης δύο ή περισσότερων μικροοργανισμών ή ειδών ή ακόμα και στελεχών σε ένα δείγμα, με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα.

ΣΚΟΠΟΣ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας μοριακής μεθόδου, η οποία θα μπορούσε να ανιχνεύει και ταυτόχρονα να ποσοτικοποιεί γρήγορα και με μεγάλη ευαισθησία σε πραγματικό χρόνο την παρουσία του βακτηρίου *Pseudomonas Aeruginosa* σε δείγματα πόσιμου νερού.

Για την ταχεία ανίχνευση της *Pseudomonas aeruginosa* σε πόσιμα νερά σχεδιάστηκε το ζεύγος εκκινήτων PA722F / PA899R, στο γονίδιο *gyrB* και διερευνήθηκε σύμφωνα με την ποσοτική μέθοδο της Real – Time PCR.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ ΠΟΣΙΜΟΥ ΝΕΡΟΥ

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε τους μήνες Ιούνιο και Ιούλιο του 2008 και το Νοέμβριο του 2009, από διάφορες περιοχές της Θεσσαλίας, Μακεδονίας και Ηπείρου (Πίνακας 1). Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν συνολικά 29 δείγματα πόσιμου νερού, εκ των οποίων τα 22 προέρχονταν από το δίκτυο ύδρευσης (δείγματα με κωδικοποίηση «Δ.Υ.»), τα 4 ήταν εμφιαλωμένα νερά που κυκλοφορούσαν στο εμπόριο (δείγματα με κωδικοποίηση «ΕΜΦ.»), τα 2 ήταν από εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων (δείγματα με κωδικοποίηση «Ε.Τ») και το 1 προέρχονταν από εν λειτουργία μηχάνημα ψύκτη νερού (δείγματα με κωδικοποίηση «Ψ.»).

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε πλαστικά αδιαφανή δοχεία χωρητικότητας 4lt τα οποία πριν την κάθε χρήση πλένονταν με απιονισμένο νερό. Η μεταφορά τους στο εργαστήριο γινόταν με ισοθερμικό δοχείο εντός 12 ωρών από τη δειγματοληψία και αμέσως χωρίς άλλη καθυστέρηση γίνονταν η περαιτέρω επεξεργασία τους.

Όλα τα δείγματα των πόσιμων νερών ταυτοποιήθηκαν στο εργαστήριο Μικροβιολογίας – Ιολογίας με την μέθοδο της Real – Time PCR, σύμφωνα με την δημοσίευση του C.S. Lee και των συνεργατών του το 2011, για την ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό του παθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων παρουσιάζεται στον παρακάτω Πίνακα 1.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν και πέντε δείγματα νερού, τα οποία φέρουν την κωδικοποίηση «884, 885, 886, 887, 888». Τα δείγματα αυτά ταυτοποιήθηκαν αρχικά από εγκεκριμένο εργαστήριο βιοχημικών αναλύσεων της Αττικής για ποικίλους μικροοργανισμούς, με απομόνωση των εκάστοτε βακτηρίων σε κυτταροκαλλιέργειες και καταμέτρηση των αντίστοιχων ζωντανών βακτηριακών πληθυσμών.

Στη συνέχεια, μετά από κατάλληλη επεξεργασία, τα 5 αυτά δείγματα νερού ταυτοποιήθηκαν με την μέθοδο της Real – Time PCR για την ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό της *Pseudomonas aeruginosa* και χρησιμοποιήθηκαν ως θετικά control για τα υπό εξέταση δείγματα πόσιμου νερού της παρούσας μελέτης.

α/α	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΤΟΠΟΣ	ΝΟΜΟΣ	ΔΕΙΓΜΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
1	23-6-08	ΤΥΡΝΑΒΟΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	NTR 1	Ε.Τ.
2	24-6-08	ΠΑΛΑΜΑΣ	ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	PL 2	Δ.Υ.
3	25-6-08	ΑΓΙΟΚΑΜΠΟΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	AGK 3	Δ.Υ.
4	26-6-08	ΑΓΙΑ	ΛΑΡΙΣΑΣ	AG 4	Δ.Υ.
5	27-6-08	ΑΡΜΕΝΙΟ	ΛΑΡΙΣΑΣ	ARM 5	Δ.Υ.
6	28-6-08	ΚΑΡΔΙΤΣΑ	ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	KR 6	Δ.Υ.
7	28-6-08	ΛΑΡΙΣΑ	ΛΑΡΙΣΑΣ	SX 7	Ψ.
8	29-6-08	ΒΡΥΟΤΟΠΟΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	BRT 8	Δ.Υ.
9	30-6-08	ΣΕΡΡΕΣ	ΣΕΡΡΩΝ	SER 9	Δ.Υ.
10	30-6-08	ΚΑΤΕΡΙΝΗ	ΠΙΕΡΙΑΣ	KAT 10	Δ.Υ.
11	1-7-08	ΚΑΛΑΜΠΑΚΑ	ΤΡΙΚΑΛΩΝ	KAL11	Δ.Υ.
12	1-7-08	ΙΤΕΑ	ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	ΙΤΕΑ 12	Δ.Υ.
13	2-7-08	ΟΜΟΡΦΟΧΩΡΙ	ΛΑΡΙΣΑΣ	OMRF 13	Δ.Υ.
14	2-7-08	ΓΙΑΝΟΥΛΗ	ΛΑΡΙΣΑΣ	GIAN 14	Δ.Υ.
15	4-7-08	ΙΩΑΝΝΙΝΑ	ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ	ΙΟΑΝ 15	Δ.Υ.
16	4-7-08	ΒΙΠΕ	ΛΑΡΙΣΑΣ	ΒΙΠΕ 16	Ε.Τ.
17	5-7-08	ΕΜΦΙΑΛ. ΑΥΡΑ	ΑΙΓΙΟ	ΑΥΡΑ 17	ΕΜΦ.
18	5-7-08	ΕΜΦ. ΣΑΜΑΡΙΝΑ	ΛΑΡΙΣΑΣ	SAM 18	ΕΜΦ.
19	5-7-08	ΕΜΦ. ΖΑΓΟΡΙ	ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ	ZAG 19	ΕΜΦ.
20	6-7-08	ΚΕΝΤΡΟ ΛΑΡΙΣΑΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	LAR 20	Δ.Υ.
21	6-7-08	ΕΜΦ. ΛΟΥΤΡΑΚΙ	ΚΟΡΙΝΘΟΣ	LOUT 21	Ε.Μ.
22	7-7-08	ΒΟΛΟΣ	ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	BOL 22	Δ.Υ.
23	7-7-08	ΚΟΖΑΝΗ	ΚΟΖΑΝΗΣ	KOZ 23	Δ.Υ.
24	8-7-08	ΣΚΑΛΟΧΩΡΙ	ΚΑΣΤΟΡΙΑΣ	SKAL 24	Δ.Υ.
25	8-7-08	ΝΕΑΠΟΛΗ	ΚΟΖΑΝΗΣ	NEAP 25	Δ.Υ.
26	9-7-08	ΘΕΡΜΗ	ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	THES 26	Δ.Υ.
27	8-11-09	ΚΡΥΟΒΡΥΣΗ	ΛΑΡΙΣΑΣ	R1	Δ.Υ.
28	8-11-09	ΚΑΡΥΑ	ΟΛΥΜΠΟΥ	R2	Δ.Υ.
29	8-11-09	ΣΙΚΑΜΙΝΕΑ	ΟΛΥΜΠΟΥ	R3	Δ.Υ.

Πίνακας 1. Κωδικοποίηση δειγμάτων πόσιμου νερού, τόπος (περιοχή – νομός) και τύπος προέλευσης καθώς και ημερομηνία συλλογής των δειγμάτων.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

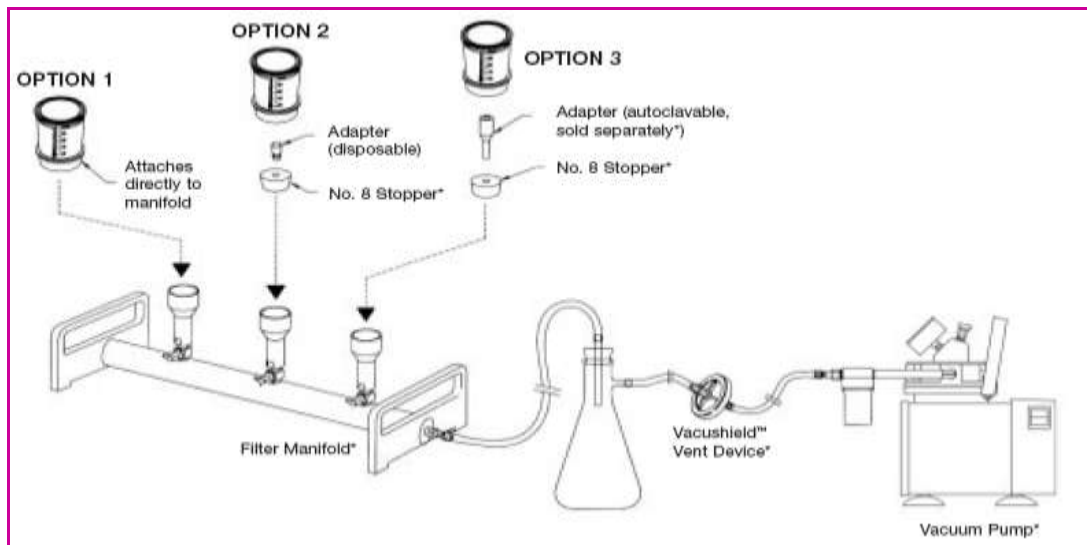
Λόγω του μεγάλου όγκου των δειγμάτων του πόσιμου νερού, καθώς και λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης των βακτηρίων σε αυτά, προηγούνται πάντοτε μέθοδοι συγκέντρωσης των υδάτων πριν την απομόνωση των βακτηρίων. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διατριβή είναι η μέθοδος έκλυσης – προσρόφησης σε ηλεκτραρνητικά φίλτρα και η μέθοδος καθίζησης με PEG. Η επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο βιολογικής προστασίας επιπέδου 2 (Biological Safety Cabinet Level 2, BSCL 2).

2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ – ΈΚΛΟΥΣΗΣ ΑΠΟ ΗΛΕΚΤΡΑΡΝΗΤΙΚΑ ΦΙΛΤΡΑ

Αρχικά γίνεται φυγοκέντρωση σε 1000rpm για 2min, 4lt κάθε δείγματος πόσιμου νερού και 100ml κάθε δείγματος νερού ιαματικών πηγών και στη συνέχεια το υπερκείμενο κάθε δείγματος ρυθμίζεται σε pH = 3,8 με προσθήκη HCl 3N. Έπειτα, τα βακτηριακά σώματα φορτίζονται θετικά παρουσία Mg^{2+} , με τη προσθήκη $Mg_2Cl_2 \cdot 6H_2O$ (Merck, Germany) σε τελική συγκέντρωση 0,05M και ακολουθεί αργή ανάδευση μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση του μίγματος.

Ακολούθως, με τη βοήθεια μιας συσκευής αρνητικής πίεσης (Εικόνα 21), τοποθετούνται ηλεκτραρνητικά φορτισμένα φίλτρα (MF-Millipore) διαμέτρου 47mm και μεγέθους πόρου 3μm, μέσω της οποίας φιλτράρεται ξεχωριστά το κάθε δείγμα με στόχο την προσρόφηση των βακτηριακών σωματιών στην επιφάνεια του φίλτρου. Ο χρόνος ολοκλήρωσης φιλτραρίσματος ποικίλει ανάλογα με το δείγμα.

Τα φίλτρα, στη συνέχεια, αφαιρούνται από τη συσκευή και τοποθετούνται σε τρυβλία petri (60x15mm), όπου και υποβάλλονται σε διπλή έκλυση με 10ml διαλύματος αποτελούμενο από Tris Base 0.05M με pH = 9 εμπλουτισμένου με 3% BSA. Η έκλυση πραγματοποιήθηκε με αργή ανάδευση για 10min την κάθε φορά. Τα εκλούμενα διαλύματα που προκύπτουν, ρυθμίζονται σε pH = 7 με τη βοήθεια HCl 3N, ενώ το φίλτρο που αφαιρέθηκε φυλάσσεται στα τρυβλία petri στους 4°C.



Εικόνα 21. Συσκευή αρνητικής πίεσης για το φιλτράρισμα των δειγμάτων νερού.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ ΜΕ PEG

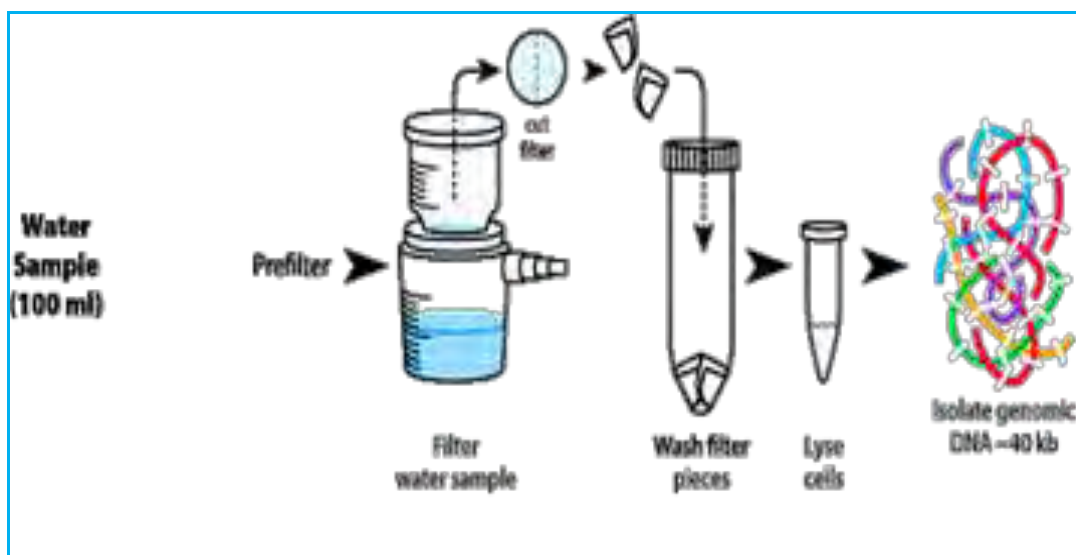
Η συγκέντρωση των υπερκείμενων υγρών έγινε μέσω της τεχνικής συγκέντρωσης με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG). Στα διαλύματα που προέκυψαν μετά την έκλυση, προστέθηκαν 10% w/v PEG 6000 καθώς και NaCl (Sigma, USA) με τελική συγκέντρωση 0,5M. στη συνέχεια, ακολούθησε ολονύχτια (overnight) αργή ανάδευση στους 4°C.

Την επόμενη ημέρα, τα διαλύματα μοιράστηκαν σε σωλήνες (tubes) των 2ml και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 1h στους 4°C στις 11.000 rpm. Με την ολοκλήρωση αυτής της διαδικασίας δημιουργήθηκε ίζημα σε κάθε σωλήνα. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας MEM (Modified Eagle Medium). Τελικά προκύπτει συμπυκνωμένο διάλυμα 2ml από κάθε δείγμα νερού, το οποίο εν συνεχεία φυλάσσεται στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί στο επόμενο στάδιο, το οποίο είναι η εκχύλιση του βακτηριακού DNA.

3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ

Για την απομόνωση του βακτηριακού DNA από τα υπό εξέταση δείγματα νερού, ακολουθήθηκε πρωτόκολλο βασιζόμενο στη μοριακή μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN), το οποίο προτάθηκε το 1995 από τον Casas και τους συνεργάτες του. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται αρχικά στη συμπύκνωση των δειγμάτων του νερού και στη συνέχεια στην εκχύλιση του DNA από τα συμπυκνωμένα αυτά δείγματα. Αυτή η μέθοδος εκχύλισης περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- ✚ Από κάθε συμπυκνωμένο δείγμα νερού λαμβάνονται 100μl εμπλουτισμένα με 0,1% Triton x 100 (ή Tween 20) για κάθε 100μl δείγματος. Μετά από καλή ανάδευση (vortex), γίνεται βρασμός των δειγμάτων στους 95°C και ύστερα από 5min επαναλαμβάνεται vortex των δειγμάτων.
- ✚ Στη συνέχεια, σε erpendorf των 2ml τοποθετήθηκαν 100μl από το κάθε συμπυκνωμένο δείγμα νερού και 10μl γλυκογόνου (100mg/ml) διατηρημένο στους -20°C, τα οποία αναμείχθηκαν με 300μl Lysis Buffer αποτελούμενο από: 4M GuSCN, 0,5% N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol και 25mM sodium citrate (Merck, Germany). Ακολούθως, έγινε ισχυρή ανάδευση του μίγματος και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20min, έτσι ώστε να επιτευχθεί η λύση των κυτταρικών μεμβρανών και των βακτηριακών σωματιδίων για την απελευθέρωση των νουκλεϊκών οξέων (Εικόνα 20).
- ✚ Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε κάθε tube 400μl ισοπροπανόλης διατηρημένη στους -20°C και αφού πραγματοποιήθηκε καλό vortex, τα δείγματα παρέμειναν στον πάγο για επώαση για τουλάχιστον 20min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10min στις 14.000 rcf στους +4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- ✚ Το εναπομείναν ίζημα, επαναδιαλύθηκε με την προσθήκη 500μl κρύας αιθανόλης 70%, ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για τη διαλυτοποίηση του ιζήματος και επαναφυγοκέντρηση για 10min στις 14.000 rcf στους +4°C.
- ✚ Τέλος, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε πλήρως και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl διπλά απιονισμένου νερού (ddH₂O) (RNase, Dnase free, Sigma Aldrich Inc, St Louis USA) ελεύθερου ριβονουκλεασών. Τα erpendorf με το εκχυλισμένο DNA των δειγμάτων του νερού, αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.



Εικόνα 22. Μέθοδος απομόνωσης DNA από δείγματα νερού, από το αρχικό στάδιο του φιλτραρίσματος του μέχρι τη λύση των κυττάρων με την προσθήκη γλυκογόνου και την τελική εξαγωγή του γενώματος (<http://www.cambio.co.uk>)

4. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *gyrB*

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας σχεδιάστηκαν εκκινητικά μόρια – ολιγονουκλεοτίδια (primers) για την ενίσχυση του γονιδίου *gyrB*, το οποίο χρησιμοποιείται για ανίχνευση της *Pseudomonas aeruginosa*, καθώς και για όλα τα είδη *Pseudomonas* που συνδέονται με αυτό το στέλεχος.

Το γονίδιο *gyrB*, που κωδικοποιεί για την Β υπομονάδα της γυράσης του DNA, έχει χρησιμοποιηθεί ως μοριακός δείκτης για την φυλογενετική πολλών ειδών του ίδιου βακτηριακού γένους. Οι γονιδιακές αλληλουχίες του γονιδίου *gyrB* για την *Pseudomonas* παρέχουν μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα μεταξύ των διαφόρων ειδών της από ότι οι γονιδιακές αλληλουχίες του 16S rRNA (Peeters and Willems, 2011). Για το λόγο αυτό, προτιμάται για το σχεδιασμό νέων εκκινητών για την ανίχνευση της αεριογόνου ψευδομονάδας, λόγω του ότι μπορεί με μεγαλύτερη ακρίβεια να ανιχνεύει και να ταυτοποιεί βακτηριακά είδη του ίδιου γένους.

Δημιουργήθηκε ένα ζευγάρι εκκινητών, βασιζόμενο στο γονίδιο *gyrB*, έτσι ώστε να ενισχυθούν περιοχές του γονιδιώματος μεγέθους 178 βάσεων (bp). Το ζεύγος των εκκινητών που σχεδιάστηκε είναι το PA722F / PA899R και ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Αρχικά ανακτήθηκε το σύνολο των 611 διαθέσιμων αλληλουχιών του γονιδίου *gyrB* για το γένος του βακτηρίου *Pseudomonas* από τη βάση δεδομένων Genbank του Εθνικού Κέντρου Πληροφοριών Βιοτεχνολογίας (NCBI). Στη συνέχεια οι αλληλουχίες αυτές συγκεντρώθηκαν στον επεξεργαστή ευθυγράμμισης ακολουθίας BIOEDIT ver. 7.0 software (Hall, 1999) και ευθυγραμμίστηκαν με το λογισμικό ClustalX (Larkin et al., 2007). Από ομόλογες περιοχές, ένα ζεύγος εκκινητών forward/reverse καθορίστηκε μέσω του λογισμικού προγράμματος PRIMER EXPRESS (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Η εξειδίκευση των *gyrB* εκκινητών που σχεδιάστηκαν ελέγχθηκε μετά από σύγκριση με 748 μη – *Pseudomonas* βακτηριακά γονίδια *gyrB*.

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι αλληλουχίες των εκκινητικών μορίων που σχεδιάστηκαν και τα μεγέθη των προϊόντων που προκύπτουν.

Όνομα	Πολικότητα	Αλληλουχία 5'-3'	Μέγεθος προϊόντος (bp)
PA 722F PA 899R	Sense Antisense	GGCGTGGGTGTGGAAGTC TGGTGGCGATCTTGAACCTTCTT	178 bp

Πίνακας 2. Εκκινητικά μόρια (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *gyrB* για ανίχνευση της *Ps. aeruginosa* με PCR – μεθόδους.

5. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) βασίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA για την ενίσχυση αυτής της περιοχής του γενόματος, με τη χρήση ειδικών εκκινητικών μορίων (primers), που οριοθετούν την περιοχή αυτή.

Η μέθοδος της PCR έγινε με το ζεύγος εκκινητών PA722F / PA899R, χρησιμοποιώντας ως δείγμα DNA πρότυπο στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* που απομονώθηκε από κυτταροκαλλιέργεια στο εργαστήριο. Αυτό το ζεύγος των εκκινητικών μορίων που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *gyrB* της *Pseudomonas aeruginosa*, ενισχύει τμήμα της περιοχής του γονιδίου *gyrB* μεγέθους 178bp.

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε μείγμα τελικού όγκου 50μl/tube, το οποίο περιείχε: 3μl DNA από κάθε δείγμα, 1μl από το ζεύγος primers με συγκέντρωση 50pmol/μl, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Reaction Buffer I 10x), 6μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 0,25μl MgCl₂ 100mM, 0,5μl Taq πολυμεράση 2,5u/t (Maximo Taq DNA polymerase GeneOn) και αποσταγμένο - αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (ddH₂O) έως τελικού όγκου 50μl.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο θερμικό κυκλοποιητή Robocycler (Εικόνα 23). Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 5min, ακολούθησαν 40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 30sec, υβριδοποίησης των εκκινητών στους 60°C για 20sec και επιμήκυνσης των κλώνων από το ένζυμο στους 72 °C για 20sec. Τέλος η αντίδραση ολοκληρώθηκε με ένα στάδιο επώασης στους 72 °C για 5min.



Εικόνα 23. Θερμικός κυκλοποιητής Stratagene Robocycler Gradient 96 (<http://www.sci-support.com>)

Αυτή η μοριακή τεχνική χρησιμοποιήθηκε, επίσης, και για τον έλεγχο των σωστών σειριακών υποδεκαπλάσιων αραιώσεων του πλασμιδίου που κατασκευάστηκε μετά από κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR, καθώς και για

τη διαμόρφωση του κατάλληλου θερμοκρασιακού πρωτόκολλου για την αποφυγή πολλαπλασιασμού μη ειδικών αλληλουχιών – στόχων (παραπροϊόντα).

6. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων όλων των αντιδράσεων PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Pairsley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο συγκέντρωσης 1μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290nm. Από κάθε προϊόν της PCR, 10μl αναμίχθηκαν με 4μl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης, σε 40% w/v σουκρόζης, σε TBE) και μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα αγαρόζης. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας μοριακού βάρους, 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 120Volts, 50mA για 30min περίπου. Στη συνέχεια, η οπτική παρατήρηση των προϊόντων της PCR έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne).

7. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ REAL – TIME PCR

Ο βασικός στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* σε δείγματα νερών. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με το επιλεγμένο ζεύγος εκκινητών PA722F / PA899R. Για τον σκοπό αυτό κατασκευάστηκε πλασμίδιο στο εσωτερικό του οποίου εισήχθη το προϊόν της PCR, όπως αυτό προέκυψε από την αντίδραση της PCR για το στέλεχος της *Ps. aeruginosa*, με το προαναφερθέν ζεύγος εκκινητών. Στη συνέχεια, ακολούθησε η κατασκευή πρότυπων καμπυλών με την χρήση ποσοτικής μεθόδου Real – Time PCR για να προσδιοριστεί το ένα αντίγραφο του βακτηρίου χρησιμοποιώντας υποδεκαπλάσιες σειριακές αραιώσεις πλασμιδίων ($10^{-1} - 10^{-10}$).

7.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Προκειμένου να απομονώσουμε και να καθαρίσουμε τα προϊόντα της αντίδρασης PCR από τα πήκτωμα αγαρόζης, ηλεκτροφορήσαμε όλη την ποσότητα από το προϊόν. Στη συνέχεια, κόψαμε τις επιθυμητές ζώνες από το πήκτωμα με τη χρήση νυστεριού και τα τοποθετήσαμε σε αποστειρωμένα σωληνάρια των 2ml. Η απομάκρυνση της αγαρόζης και ο καθαρισμός των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του εμπορικού προϊόντος Nucleospin Gel and PCR Clean-up Kit, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή (Macherey-Nagel, Germany).

7.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ (LIGATION)

Οι αλληλουχίες προετοιμάστηκαν με την προσθήκη poly(A)άκρων, καθαρίστηκαν και ακολούθησε η αντίδραση της λιγάσης στην οποία χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGEM® - T Easy Vector System (Promega, USA). Κατά την αντίδραση αυτή, οι poly(A)ουρές στα 3' και 5' άκρα των αλληλουχιών συνδέονται με τα αντίστοιχα poly(T)άκρα του φορέα κλωνοποίησης με τη βοήθεια του ενζύμου T4 DNA Ligase. Το μείγμα της αντίδρασης ήταν τελικού όγκου 10μl για κάθε αλληλουχία και περιείχε: 1μl πλασμιδιακού φορέα pGEM® - T Easy Vector 50ng, 3μl προϊόντος PCR, 1μl ενζύμου T4 DNA Ligase (3units/μl) και 5μl ρυθμιστικού διαλύματος Rapid Ligation Buffer 2x. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 4°C για όλη τη νύχτα.

7.3 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Επόμενο βήμα ήταν ο μετασχηματισμός δεκτικών σε πλασμίδια βακτηριακών κυττάρων *E. coli* (JM109) με τους ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς. Σε 200μl από το απόθεμα των δεκτικών κυττάρων που διαθέτουμε, μεταφέραμε 5μl από το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης. Πραγματοποιήθηκε ήπια ανάδευση και τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν στον πάγο για 30min. Κατόπιν, μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο προθερμασμένο στους 4°C για 90sec ακριβώς και αμέσως μετά, τοποθετήθηκαν ξανά στον πάγο για 2min (heat shock). Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν οπές στα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων, από τις οποίες ήταν δυνατή η εισαγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Εν συνεχεία, μεταφέραμε όλη την ποσότητα των μετασχηματισμένων δεκτικών κυττάρων από τα σωληνάρια σε αντίστοιχα falcons που περιείχαν 800μl θρεπτικού υλικού LB Broth. Ακολούθησε επώαση στους 37°C σε 180 στροφές/min για 1h (επαναφορά κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων – «επούλωση»).

7.4 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΣΤΕΡΗΗ ΚΑΙ ΥΓΡΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Από κάθε falcon ελήφθησαν 200μl υγρής καλλιέργειας και επιστρώθηκαν σε αντίστοιχα τρυβλία petri που περιείχαν θρεπτικό μέσο LB Agar (30g/L, Scharlau, Spain) και το αντιβιοτικό αμικικιλίνη σε συγκέντρωση 100μg/ml. Σε κάθε τρυβλίο προστέθηκαν, επίσης, 12μl X-gal (50mg/ml, Promega, USA) και ακολούθησε επώαση για 16 ώρες στους 37°C. Ο φορέας κλωνοποίησης περιέχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη και έτσι όταν τα βακτήρια αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει την άχρωμη χημική ουσία X-gal, η διάσπαση της ουσίας αυτής από την β-γαλακτοσιδάση παράγει ένα αδιάλυτο προϊόν μπλε χρώματος που χρωματίζει τις αποικίες. Ωστόσο, όταν γίνεται ένθεση του προϊόντος, δεν παράγεται ενεργό ένζυμο και οι αποικίες είναι λευκές, διότι το αναγνωστικό πλαίσιο της β-γαλακτοσιδάσης διαρρηγνύεται. Με

αυτόν τον τρόπο, καθίσταται δυνατός ο οπτικός έλεγχος της επιτυχίας ένθεσης της επιθυμητής αλληλουχίας στα πλασμίδια κάθε αποικίας. Από κάθε τρυβλίο συλλέχθηκαν δυο λευκές αποικίες, δηλαδή δυο κλώνοι από κάθε αλληλουχία. Στη συνέχεια, κάθε αποικία μεταφέρθηκε σε 2 ml θρεπτικού μέσου LB Broth (20 g/L) το οποίο περιείχε αμικικιλίνη σε ποσότητα 1 μl ανά ml LB Broth και ακολούθησε επώαση για 16 ώρες στους 37°C σε 210 στροφές/λεπτό.

7.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Η εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικού προϊόντος NucleoSpin® Plasmid Extraction Kit (Macherey-Nagel, Germany).

7.6 ΠΕΨΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

Για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία ένθεσης της επιθυμητής αλληλουχίας στην θέση ένθεσης του πολυσυνδέτη του φορέα κλωνοποίησης, πραγματοποιήθηκε πέψη μικρής ποσότητας των φορέων με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*. Θέσεις κοπής για το συγκεκριμένο ένζυμο στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη. Έτσι, η αλληλουχία που αποκόπτεται από τον φορέα με το ένζυμο αφορά μόνο το ένθεμα. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 2μl από κάθε εκχυλισμένο πλασμιδιακό DNA, 2μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x H Buffer, 1μl ενζύμου Restriction Enzyme *EcoRI* (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) και 15μl ddH₂O (SIGMA, USA), ώστε ο συνολικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20μl. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 2h και μετά το πέρας της επώασης προστέθηκαν 3μl 10x Loading Buffer για να σταματήσει η αντίδραση. Στη συνέχεια, η ποσότητα αυτή ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, για να πραγματοποιηθεί οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

8. ΣΕΙΡΙΑΚΕΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΕΣ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ

Για να προσδιοριστεί το ένα αντίγραφο του βακτηρίου της *Ps. aeruginosa*, πρέπει να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη με τη χρήση της ποσοτικής μεθόδου Real – Time PCR. Για την κατασκευή της χρησιμοποιούνται υποδεκαπλάσιες σειριακές αραιώσεις πλασμιδίων (10^{-1} – 10^{-10}). Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται το κατασκευασμένο πλασμίδιο που εμπεριέχει το ενθετημένο πρότυπο στέλεχος της *Ps. aeruginosa*, που είχε αρχικά απομονωθεί από κυτταροκαλλιέργεια στο εργαστήριο. Επομένως, λαμβάνονται 10μl από το κατασκευασμένο πλασμίδιο και 90μl αποσταγμένο - αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών (ddH₂O) και τοποθετούνται σε erpendorf των 2ml και γίνεται πάρα πολύ καλή ανάδευση. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται έως ότου κατασκευαστεί και η 10^{-10} αραιώση.

9. REAL – TIME PCR

Η Real – Time PCR (qPCR – quantitative PCR) είναι μια παραλλαγή της απλής PCR, το πρωτόκολλο της οποίας βασίζεται στη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I και στην ανίχνευση της συσσώρευσης φθορισμού σε πραγματικό χρόνο (Lee et al., 2011). Ο φθορισμός που παράγεται σε κάθε κύκλο είναι ανάλογος του πληθυσμού των παραγόμενων αλληλουχιών σε κάθε θερμοδυναμικό κύκλο. Επιπλέον, το ζευγάρι των εκκινητικών μορίων (PA722F / PA899R) που χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη Real – Time PCR, σχεδιάστηκε έτσι ώστε να ανιχνεύεται και να ενισχύεται το γονίδιο *gyrB* της *Pseudomonas aeruginosa*. Έτσι, εξασφαλίζεται μια ακριβής μέθοδος εκτίμησης του βακτηριακού της φορτίου, με πολύ μεγάλη ευαισθησία αλλά και επαναληψιμότητα σε πραγματικό χρόνο.

Από την εκχύλιση του πλασμιδιακού φορέα απομονώθηκε ένας συγκεκριμένος όγκος πλασμιδίων και πραγματοποιήθηκαν υποδεκαπλάσιες σειριακές αραιώσεις με στόχο τη κατασκευή των πρότυπων καμπυλών (Standard curves) της Real – Time PCR για την *Pseudomonas aeruginosa*. Έτσι προσδιορίστηκε η μεγαλύτερη αραιώση για αυτόν τον τύπο του βακτηρίου, που έδωσε σήμα ενίσχυσης κατά τη Real Time PCR και ορίστηκε ως ένα αντίγραφο του γονιδίου/test.

Στη συνέχεια όλα τα υπό εξέταση δείγματα νερού καθώς και οι σειριακές αραιώσεις των πλασμιδίων, υποβλήθηκαν σε Real – Time PCR για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της *Pseudomonas aeruginosa* σε αυτά. Για την αντίδραση της Real – Time PCR χρησιμοποιήθηκε το KAPA SYBR[®] FAST qPCR kit, το οποίο περιέχει τη χρωστική αναφοράς ROX High/Low και το Master Mix (2X) Universal, αποτελούμενο από τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green, dNTPs, κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), MgCl₂ και DNA πολυμεράση της εταιρείας KAPABIOSYSTEMS, Boston, USA.

Η χρωστική αναφοράς ROX συμβάλλει στην αυτόματη κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων σε περίπτωση ανισομερούς προσθήκης του Master mix στα εκάστοτε δείγματα. Η φθορίζουσα χρωστική έχει τη δυνατότητα να προσδένεται στο δίκλωνο DNA και επομένως όσο περισσότερα δίκλιωνα αντίγραφα παράγονται, τόσο εντονότερο θα είναι και το σήμα του φθορισμού.

Η αντίδραση της Real – Time PCR έγινε σε τελικό όγκο 25μl/tube. Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 3μl από την εκάστοτε αραιώση κάθε δείγματος ή 3μl δείγμα, 10μl από το Master mix, 2μl του ζεύγους εκκινητών PA722F / PA899R (10pmol/μl), 0,4μl ROX High και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 25μl.

Η αντίδραση της ποσοτικής PCR έλαβε χώρα στο θερμικό κυκλοποιητή STRATAGENE MX3005P QPCR system (Εικόνα 24). Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής: αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 1 λεπτό και στην συνέχεια 40 κύκλοι για αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 3sec, για υβριδοποίηση των εκκινητών στους 60°C για 20sec και για επιμήκυνση των κλώνων στους 60°C για 10sec. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

ολοκληρώθηκε με το τελευταίο στάδιο της καμπύλης αποδιάταξης των προϊόντων από τους 55 °C έως τους 95°C. Το τελευταίο αυτό στάδιο μας δείχνει αν το προϊόν που πήραμε είναι ειδικό, συγκρίνοντας τη θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature, T_m) για όλα τα δείγματα.



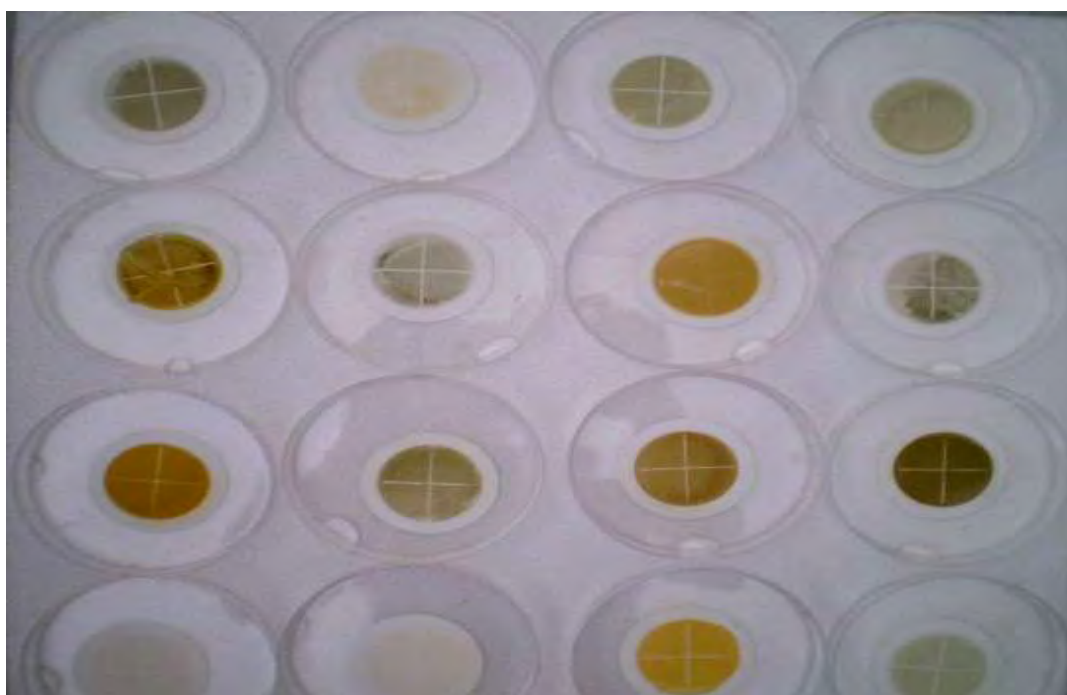
Εικόνα 24. Θερμικός κυκλοποιητής STRATAGENE MX3005P QPCR system (<http://web.uri.edu>)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ -ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΑΡΝΗΤΙΚΑ ΦΟΡΤΙΣΜΕΝΑ ΦΙΛΤΡΑ

Ο χρόνος που χρειάστηκε για να ολοκληρωθεί το φιλτράρισμα των 4lt του κάθε δείγματος ήταν διαφορετικός και κυμάνθηκε από 30min ως και λίγες ώρες, ανάλογα με την προέλευση και την καθαρότητα των δειγμάτων. Αυτό συνέβη διότι, αν και όλα τα υπό εξέταση δείγματα προέρχονταν από επεξεργασμένα νερά που χαρακτηρίζονται ως πόσιμα, εντούτοις, ο διαφορετικός τρόπος επεξεργασίας τους και η μεταφορά των δειγμάτων (π.χ. μέσω των δικτύων ύδρευσης για τα πόσιμα νερά), τα έκανε να φέρουν διαφορετικό αριθμό σωματιδίων τα οποία εμπόδιζαν την γρήγορη ροή του νερού από τα φίλτρα.

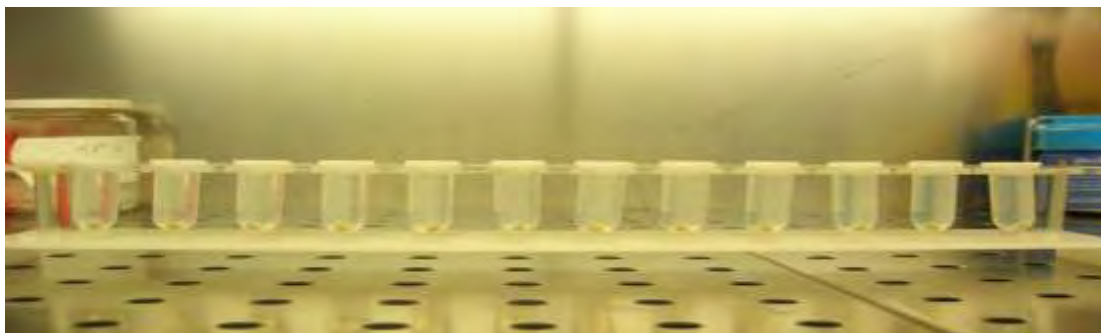
Αυτό αποτυπώνεται και στην μακροσκοπική οπτική παρατήρηση των φίλτρων στο τέλος της διαδικασίας του φιλτραρίσματος όπου ο χρωματισμός αυτών ήταν διαφορετικός για κάθε δείγμα (Εικόνα 25).



Εικόνα 25. Οπτική εικόνα των φίλτρων μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας του φιλτραρίσματος

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ ΜΕ PEG

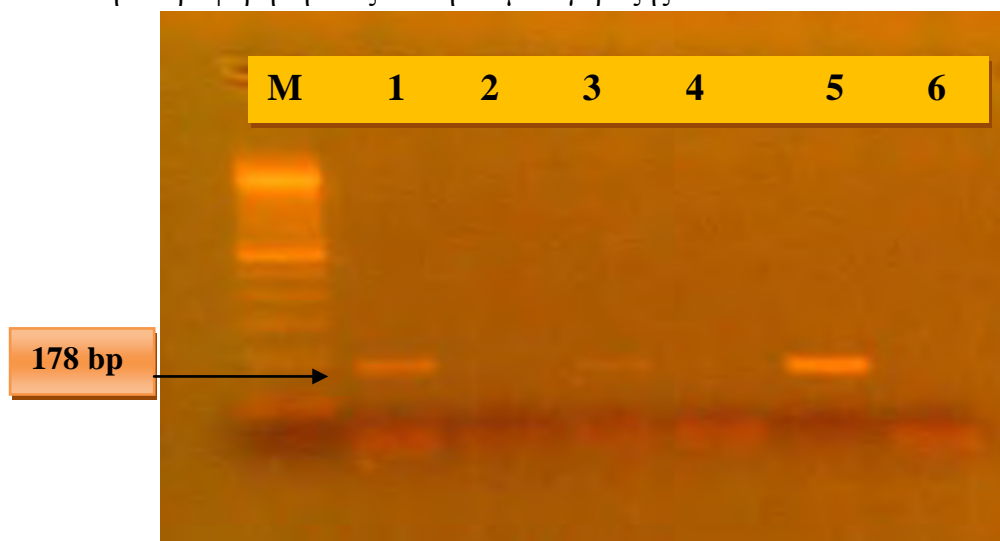
Μετά το φιλτράρισμα των δειγμάτων νερού και την έκλουση αυτών, ακολουθήθηκε η μέθοδος καθίζησης με PEG προκειμένου να συγκεντρωθούν τα βακτήρια. Το τελικό στάδιο αυτής της διαδικασίας ήταν η παραγωγή ενός ιζήματος που μεταξύ των άλλων περιέχονται και τα βακτήρια. Η ποσότητα του ιζήματος που προέκυψε από το κάθε δείγμα ήταν και πάλι διαφορετική μεταξύ των δειγμάτων νερού (Εικόνα 26).



Εικόνα 26. Συγκέντρωση ιζημάτων μετά την εφαρμογή της μεθόδου καθίζησης με PEG.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR ΜΕ ΖΕΥΓΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ PA722F / PA899R

Εφαρμόστηκε η μέθοδος της PCR σε πρότυπο στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa*, το οποίο απομονώθηκε ύστερα από καλλιέργεια που έγινε στο εργαστήριο, χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινήτων PA722F / PA899R, που ενισχύει τμήμα της περιοχής του γονιδίου *gyrB* της *Pseudomonas aeruginosa*, μεγέθους 178bp. Στην Εικόνα 27 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR μετά από ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης.

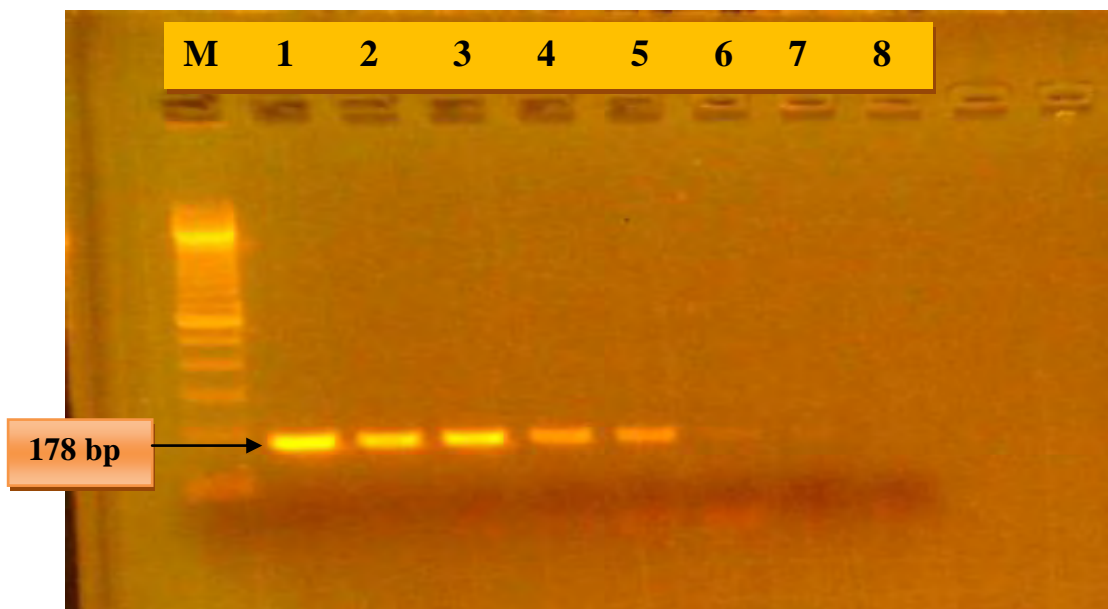


Εικόνα 27. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης πρότυπου στελέχους *Pseudomonas aeruginosa* με ζεύγος εκκινήτων PA722F / PA899R.

Η θέση «M» αντιστοιχεί στον μάρτυρα μοριακού βάρους 100 bp της Invitrogen. Ο μάρτυρας μοριακού βάρους δείχνει το μοριακό βάρος κάθε ζώνης, η οποία απέχει από τη γειτονική της 100 bp. Η θέση 5 αντιστοιχεί στο προϊόν της PCR που προέκυψε από το πρότυπο στέλεχος της *Pseudomonas aeruginosa*. Οι θέσεις 1 και 3 αντιστοιχούν στο προϊόν της PCR που προέκυψε από δείγματα νερού που περιέχουν την *Pseudomonas aeruginosa*. Στη θέση 6 έχει τοποθετηθεί ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας για τυχόν επιμόλυνση των δειγμάτων κατά τη διάρκεια εφαρμογής της μεθόδου. Η διάγνωση των θετικών δειγμάτων επιβεβαιώθηκε από το αποτέλεσμα της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης, όπως φαίνεται στην εικόνα 27, με εμφάνιση ζώνης στις 178 bp για τα προϊόντα που μας ενδιαφέρουν.

4. ΣΕΙΡΙΑΚΕΣ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

Όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα 8, προκειμένου να γίνει η ανίχνευση της *Pseudomonas aeruginosa* στα δείγματα νερού που εξετάζουμε, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της PCR. Στην εικόνα 28 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR που πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο της σωστής σειριακής αραιώσης των διαδοχικών αραιωμένων πλασμιδίων της τάξεως των 10^{-4} – 10^{-10} , που περιέχουν το υπό εξέταση βακτηριακό στελέχος της *Pseudomonas aeruginosa*. Το μείγμα που χρησιμοποιήθηκε περιελάμβανε το ζεύγος των εκκινητικών μορίων PA722F / PA899R για την ενίσχυση του γονιδίου *gyrB* της *Ps. aeruginosa*. Παρακάτω διακρίνουμε τα αναμενόμενα προϊόντα της PCR μετά από ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης.



Εικόνα 28. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των σειριακών αραιωμένων πλασμιδίων που προέκυψαν από τη μέθοδο της PCR με χρήση ζεύγους εκκινητών PA722F / PA899R.

Η θέση «M» αντιστοιχεί στον μάρτυρα μοριακού βάρους 100 bp της Invitrogen. Ο μάρτυρας μοριακού βάρους δείχνει το μοριακό βάρος κάθε ζώνης, η οποία απέχει από τη γειτονική της 100 bp. Οι θέσεις 1 – 7 αντιστοιχούν στα προϊόντα των δειγμάτων με σειριακές αραιώσεις πλασμιδίων 10^{-4} – 10^{-10} αντίστοιχα. Στη θέση 8 έχει τοποθετηθεί ddH₂O ως αρνητικός μάρτυρας για τυχόν επιμόλυνση των δειγμάτων κατά τη διάρκεια εφαρμογής της μεθόδου. Η διάγνωση των θετικών δειγμάτων επιβεβαιώθηκε από το αποτέλεσμα της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης, όπως φαίνεται στην εικόνα 28, με εμφάνιση ζώνης στις 178bp για όλα τα προϊόντα μεταξύ των αραιώσεων 10^{-4} και 10^{-10} .

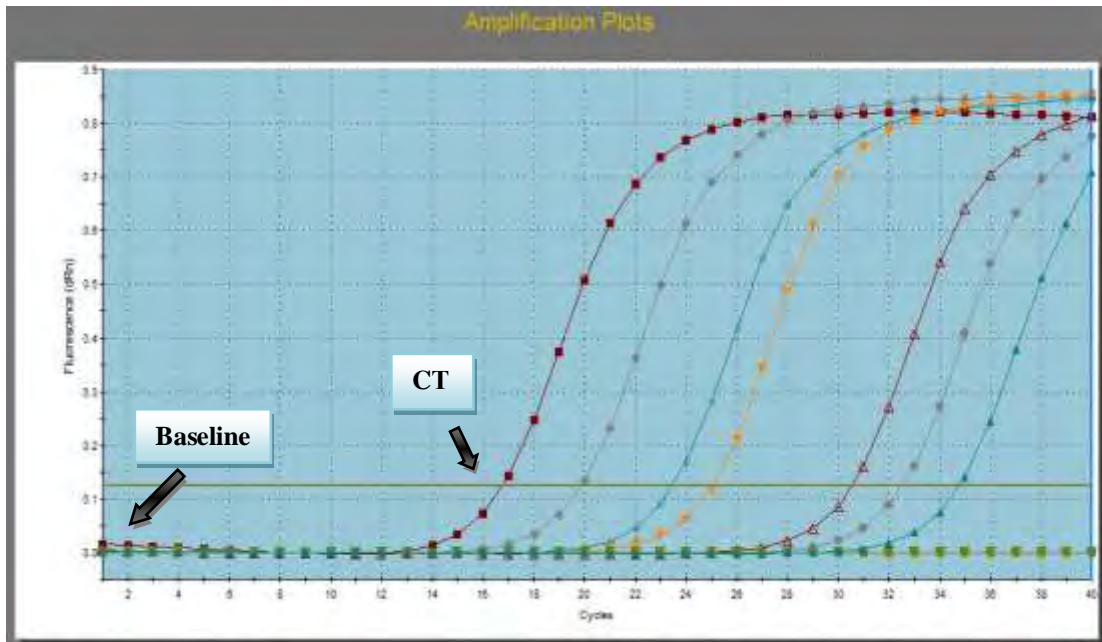
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ REAL – TIME PCR

5.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΤΗΣ REAL – TIME PCR

Με τη διαδικασία των διαδοχικών 10X αραιώσεων που περιγράφηκε παραπάνω προσδιορίστηκε η μεγαλύτερη αραιώση που έδωσε σήμα ενίσχυσης κατά την Real – Time PCR (qPCR) και ορίστηκε ως ένα αντίγραφο του γονιδίου/τεστ. Με βάση την πληροφορία αυτή, οι αραιώσεις των πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκαν με αυτή τη μέθοδο για την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών, έτσι ώστε να ανιχνευθεί η παρουσία του υπό εξέταση βακτηριακού στελέχους, καθώς και η ακριβή ποσότητα των αντιγράφων του στα δείγματα νερού που εξετάστηκαν.

Παρακάτω παρατίθεται η χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), όπου διακρίνονται η εκθετική, η γραμμική και η φάση κορεσμού. Στον οριζόντιο άξονα χ παριστάνεται ο αριθμός των κύκλων CT της αντίδρασης, ενώ στον κατακόρυφο η τιμή των επιπέδων φθορισμού (dRn). Το όριο φθορισμού που τίθεται για τον προσδιορισμό της τιμής CT, ορίζεται έτσι ώστε να βρίσκεται πάνω από το επίπεδο «θορύβου» (baseline) και στην αρχή της εκθετικής φάσης. Αυτός είναι και ο λόγος που η τιμή CT θεωρείται το πιο ακριβές σημείο για την ποσοτικοποίηση του βακτηρίου στα δείγματα νερού που μελετάμε, δεδομένου ότι η τιμή αυτή είναι ανάλογη προς την ποσότητα του δείγματος κατά την έναρξη της αντίδρασης (Εικόνα 29).

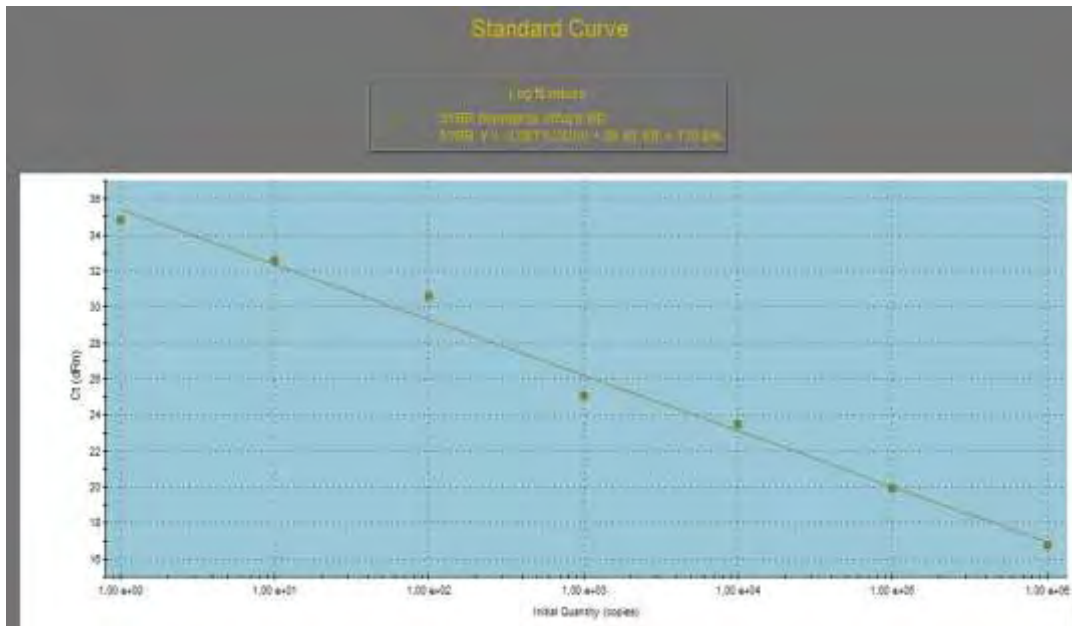
Αντίθετα από τη συμβατική μέθοδο της PCR, η Real – Time PCR επιτρέπει σε πραγματικό χρόνο την ποσοτικοποίηση του βακτηρίου, διότι αναλύει την ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης, όπου η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης της κάθε αντίδρασης είναι σταθερή.



Εικόνα 29. Καμπύλες ενίσχυσης του προϊόντος (amplification plots). Στην καμπύλη αυτή καταγράφονται οι τιμές φθορισμού της SYBR Green με την μέθοδο Real – Time PCR, οι οποίες απεικονίζουν την εκθετική αύξηση των προϊόντων σε κάθε υπό ανάλυση δείγμα.

Στην εικόνα 30 παρουσιάζεται η γραφική παράσταση (standard curve), όπως προέκυψε από την ενίσχυση των διαδοχικών 10X αραιώσεων των πλασμιδίων της *Pseudomonas aeruginosa*. Στον άξονα χ έχουν τοποθετηθεί τα αντίγραφα των γονιδίων (copies) του βακτηρίου που μελετάμε και στον άξονα ψ τοποθετήθηκε ο κύκλος CT (threshold cycle) (dRn), που δίνει σήμα φθορισμού στη Real – Time PCR. Από την γραφική παράσταση είδαμε ότι η τελευταία αραιώση $X10^{-10}$ είναι αυτή που δίνει το τελευταίο σήμα ενίσχυσης (CT = 36 κύκλο). Έτσι καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η αραιώση $X10^{-10}$ περιέχει 1 αντίγραφο γονιδίου *gyrB* /test της *Ps.aeruginosa*.

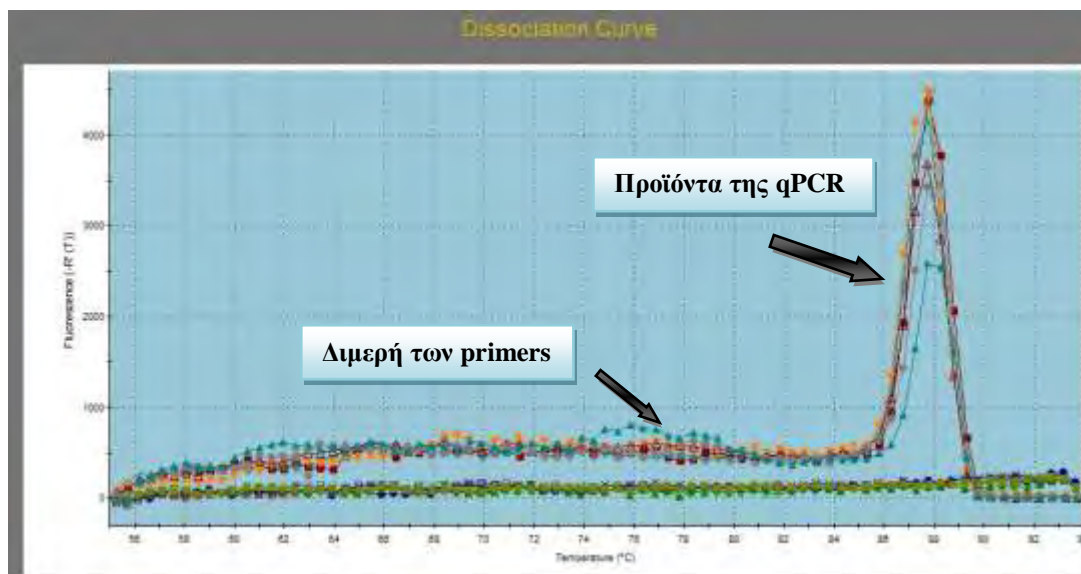
Ενδεικτικά, παρουσιάζεται παρακάτω η πρότυπη καμπύλη που κατασκευάστηκε για το γονίδιο *gyrB* της *Pseudomonas aeruginosa*.



Εικόνα 30. Πρότυπη καμπύλη (standard curve) του γονιδίου *gyrB* της *Pseudomonas aeruginosa* με δείγματα γνωστής συγκέντρωσης.

Στην εικόνα 31 παρουσιάζεται μια ενδεικτική καμπύλη αποδιάταξης που προέκυψε μέσω μιας Real – Time PCR κατά την παρούσα εργασία. Οι καμπύλες αποδιάταξης (dissociation curve) προκύπτουν από την παρακολούθηση της αλλαγής της έντασης του φθορισμού (dRn) που τοποθετείται στον άξονα ψ της γραφικής παράστασης, συναρτήσει της μεταβολής της θερμοκρασίας (°C). Η μορφή των καμπυλών αυτών εξαρτάται από το μέγεθος και την αλληλουχία του προϊόντος. Η φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I, που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση του παραγόμενου προϊόντος, προσδένεται σε οποιαδήποτε δίκλωνη αλληλουχία, ενισχύεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και τα προϊόντα που προκύπτουν κατά την Real – Time PCR μπορούν να διαχωριστούν ελέγχοντας τις καμπύλες αποδιάταξης.

Τέλος, στο κατωτέρω σχήμα της εικόνας 31, διαπιστώνουμε την ειδικότητα των προϊόντων της αντίδρασης. Όταν μία αντίδραση Real – Time PCR μας δίνει μόνο τα ειδικά προϊόντα που αναζητούμε, τότε όλα τα τελευταία αποδιατάσσονται, σύμφωνα με τις συνθήκες της αντίδρασης, σε μία προκαθορισμένη θερμοκρασία. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι χρησιμοποιούμενοι εκκινητές παρουσιάζουν μεγάλη ειδικότητα, δεν επιτρέπουν την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων και επιπλέον δε διμερίζονται. Κατά συνέπεια όλες οι καμπύλες αποδιάταξης τοποθετούνται γύρω από την ίδια θερμοκρασία, όπως φαίνεται και στο σχήμα, και



Εικόνα 31. Καμπύλες θερμικής αποδιάταξης των προϊόντων (dissociation curve), που δείχνουν τη θερμοκρασία στην οποία αποδιάτάχθηκε το κάθε δείγμα στην αντίδραση Real – Time PCR.

5.2 ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ REAL – TIME PCR

Στον πίνακα 2 και στον πίνακα 3 παρουσιάζονται αναλυτικά τα θετικά αποτελέσματα της αντίδρασης της Real – Time PCR τα δείγματα νερού που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες και για τα δείγματα πόσιμου νερού, αντίστοιχα. Οι πίνακες αυτοί δείχνουν ξεκάθαρα ποια από τα υπό ανάλυση δείγματα που είχαμε αρχικά και εξετάστηκαν με τη μέθοδο της Real – Time PCR, τελικά ενισχύθηκαν με το ζεύγος εκκινητών PA722F / PA899R στο γονίδιο *gyrB* της *Pseudomonas aeruginosa*, παρουσίασαν προϊόν, αλλά και ποιος ήταν ο αριθμός των αντιγράφων που δημιουργήθηκαν.

A/A	ΔΕΙΓΜΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (ΑΝΤΙΓΡΑΦΑ) ΤΗΣ PSEUDOMONAS AERUGINOSA
1	884	65.210 copies/test
2	885	1.601 copies/test
3	886	341.400 copies/test
4	887	182.900 copies/test
5	888	749 copies/test

Πίνακας 2. Καταγραφή της ποσότητας των αντιγράφων του βακτηρίου *Ps. aeruginosa* των δειγμάτων νερού που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες στη μέθοδο της Real – Time PCR

Α/Α	ΔΕΙΓΜΑ	ΤΟΠΟΣ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (ΑΝΤΙΓΡΑΦΑ) ΤΗΣ <i>PSEUDOMONAS</i> <i>AERUGINOSA</i>
1	NTR 1	ΤΥΡΝΑΒΟΣ	Ε.Τ.	17 copies/test
2	ΚΑΤ 10	ΚΑΤΕΡΙΝΗ	Δ.Υ.	10 copies/test
3	ΙΤΕΑ 12	ΙΤΕΑ	Δ.Υ.	29 copies/test
4	ΙΟΑΝ 15	ΙΩΑΝΝΙΝΑ	Δ.Υ.	13 copies/test
5	ΑΥΡΑ 17	ΕΜΦΙΑΛ. ΑΥΡΑ	ΕΜΦ.	8,23 copies/test
6	THEΣ 26	ΘΕΡΜΗ	Δ.Υ.	23.000 copies/test
7	R1	ΚΡΥΟΒΡΥΣΗ	Δ.Υ.	6,14 copies/ test

Πίνακας 3. Καταγραφή δειγμάτων πόσιμου νερού που ανιχνεύθηκαν θετικά για *Pseudomonas aeruginosa* μετά την χρήση της μεθόδου της Real – Time PCR, καθώς και η ποσότητα των αντιγράφων του βακτηρίου που βρέθηκε σε κάθε δείγμα 3μl νερού.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το πόσιμο νερό αποτελεί το υπ' αριθμόν ένα είδος διατροφής και είναι υψίστης σημασίας για την ικανοποίηση των κοινωνικών αναγκών του ανθρώπου. Το νερό το προοριζόμενο για ανθρώπινη κατανάλωση πρέπει να είναι από κάθε άποψη αβλαβές για την υγεία του ανθρώπου, οργανοληπτικά άμεμπτο και απολύτως καθαρό, απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς και οποιεσδήποτε ουσίες σε αριθμούς και συγκεντρώσεις που αποτελούν ενδεχόμενο κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία.

Η υδατογενής μετάδοση των μικροβίων είναι ένας πολύ αποτελεσματικός τρόπος για την ευρεία και ταυτόχρονη εξάπλωση ασθενειών σε ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού. Μεταξύ αυτών των μικροβίων σημαντική θέση καταλαμβάνουν τα παθογόνα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, και κυρίως η *Pseudomonas aeruginosa* λόγω της ιδιαίτερης σημασίας τους για τη δημόσια υγεία. Η *Pseudomonas aeruginosa* ή αλλιώς αεριογόνο / πνοκυανική ψευδομονάδα ανήκει στο γένος *Pseudomonas*, στην οικογένεια των Pseudomonadaceae, και είναι ένα ευκαιριακά παθογόνο Gram – αρνητικό, γ – πρωτεοβακτήριο, το οποίο δεν προκαλεί συνήθως ασθένειες σε υγιείς ανθρώπους. Έχει ελάχιστες διατροφικές απαιτήσεις και μπορεί να ανεχθεί μια μεγάλη ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών.

Αυτός ο μικροοργανισμός έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται και να ευδοκιμεί σε μία ποικιλία περιβαλλόντων, και κυρίως υδάτινων, όπως λίμνες και ποτάμια σε συγκεντρώσεις, στα συστήματα παροχής νερού, στο έδαφος και λιγότερο συχνά στο πόσιμο νερό. Η παρουσία της στο πόσιμο νερό σχετίζεται ίσως περισσότερο με την ικανότητά της να αναπτύσσει βιοφίλμ σε είδη υγιεινής, παρά από την παρουσία της στο σύστημα παροχής νερού ή στο επεξεργασμένο πόσιμο νερό (εμφιαλωμένο νερό, ανθρακούχο κ.ά.).

Οι περισσότερες ασθένειες που προκαλεί η *Ps. aeruginosa* στον άνθρωπο δεν προέρχονται από την κατανάλωση του πόσιμου νερού αλλά από την επαφή με αυτό. Έχουν καταγραφεί παγκοσμίως, λοιμώξεις από τη χρησιμοποίηση μολυσμένων μη επεξεργασμένων επιφανειακών και υπόγειων υδάτων καθώς επίσης και λοιμώξεις από τη κατανάλωση πόσιμου νερού και οστρακοειδών. Οι περισσότερες λοιμώξεις από ψευδομονάδα αποκτώνται είτε μέσα σε νοσοκομειακές εγκαταστάσεις, όπου ο αμυντικός μηχανισμός των ασθενών έχει κατασταλεί (π.χ. από κάποια ασθένεια ή αντιβιοτική θεραπεία) και επομένως είναι επιρρεπής σε μολύνσεις, είτε μέσω κατανάλωσης μολυσμένου νερού από *Ps. aeruginosa*.

Η παθογένεια των στελεχών της *Ps. aeruginosa* στους ιστούς οφείλεται στους λοιμογόνους της παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να αποικίσουν τα κύτταρα του ξενιστή της. Οι παράγοντες αυτοί είναι διάφορες τοξίνες και ένζυμα που παράγονται και εκκρίνονται από αυτά τα βακτηριακά στελέχη. Οι βλεφαρίδες και τα τριχίδια της *Ps. aeruginosa* διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στη μόλυνση των εγκαυμάτων και των πληγών και η απουσία τους από τα στελέχη αυτού του

βακτηρίου μειώνει τη λοιμογόνο δράση του. Ανάλογα με τις συνθήκες, όμως, προκύπτουν συχνά επιδερμικές λοιμώξεις όταν η *Ps. aeruginosa* διαπερνά τις άμυνες του ανθρώπινου ξενιστή και εισέρχεται στο σώμα μέσω του δέρματος στην περιοχή ενός ανοικτού τραύματος. Η επαφή του βακτηρίου αυτού με εξασθενημένο πληθυσμό προκαλεί αρκετές εξωνοσοκομειακές και ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις κάθε χρόνο, σε μεγαλύτερο ποσοστό περιπτώσεων εμφανίζονται οι λοιμώξεις του αναπνευστικού (π.χ. ινοκυστική νόσος), λοιμώξεις εγκαυμάτων και ουρολοιμώξεις.

Ο πιο διαδεδομένος τρόπος θεραπείας ασθενών που έχουν μολυνθεί με την αεριογόνο ψευδομονάδα είναι η χορήγηση αντιβιοτικών. Μέχρι πρόσφατα θεωρείτο ότι εφ' όσον η *Ps. aeruginosa* αποικίσει τον αναπνευστικό βλεννογόνο είναι αδύνατο να εκριζωθεί. Αυτό σήμερα θεωρείται ότι είναι εφικτό σε αρκετούς ασθενείς, με την προϋπόθεση της έγκαιρης ανίχνευσης του αποικισμού και της έντονης και κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής. Αντιβιοτικά με αντιψευδομοναδική δράση βρίσκουμε στις β-λακτάμες (π.χ. πενικιλίνες), στις αμινογλυκοσίδες, στις κινολόνες και στις πολυμυξίνες, ενώ για χρόνιας και σοβαρής λοίμωξης από *Ps. aeruginosa* απαιτείται περιοδική χορήγηση ενδοφλέβιας ή εισπνεόμενης αγωγής με συνδυασμό δύο αντιψευδομοναδικών αντιβιοτικών.

Παρόλα αυτά, η *Pseudomonas aeruginosa* εμφανίζει έμφυτη αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά και μπορεί να προσαρμοστεί όταν εκτίθεται σε αντιμικροβιακούς παράγοντες και να αναπτύξει νέες αντιστάσεις. Έτσι, επιτρέπεται στο βακτήριο να ευδοκιμήσει και να αναπτυχθεί περαιτέρω, ακόμη και κατά τη διάρκεια θεραπείας. Επί του παρόντος, έχει γίνει έρευνα για τη θεραπεία της εν λόγω λοίμωξης, η οποία οδήγησε στη γονιδιωματική αλληλουχία της *Ps. aeruginosa* και στη χρήση ενός συστήματος εκροής – αναστολέων. Οι κύριες αντλίες εκροής στην *Ps. aeruginosa* ανήκουν στην οικογένεια RND (Resistance - Nodulation - Division), οι οποίες χρησιμοποιούν κινητήρια δύναμη πρωτονίων ως πηγή ενέργειας και συμβάλλουν στη αντιμικροβιακή αντοχή του βακτηρίου.

Για την ανίχνευση και ταυτοποίηση της *Ps. aeruginosa* έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές διαφορετικές μέθοδοι, τόσο συμβατικές όσο και μοριακές. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος ανίχνευσης της αεριογόνου ψευδομονάδας είναι απομόνωση σε καλλιέργεια με αιματούχο άγαρ ή MacConkey άγαρ, όπου προκύπτουν και οι αναμενόμενες κυανοπράσινες αποικίες λόγω της πυοκυανίνης που περιέχει η *Ps. aeruginosa*. Άλλες κλασσικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι το Test API, όπου είναι μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων και η συνεστιακή μικροσκοπία CLSM. Όσον αφορά τις μοριακές μεθόδους ανίχνευσης, η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) με τις παραλλαγές (Real – Time PCR και Multiplex PCR), χρησιμοποιούνται πολύ λόγω της μεγάλης ευαισθησίας που έχουν, της ικανότητας να ανιχνεύουν όλα τα είδη της *Pseudomonas*, αλλά το κυριότερο είναι ότι πλεονεκτούν έναντι των κυτταροκαλλιιεργειών λόγω του πολύ μικρότερου εργαστηριακού χρόνου που απαιτούν (2 – 3hrs).

Όπως προαναφέρθηκε, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* στο πόσιμο νερό (δίκτυα νερού, εμφιαλωμένα νερά, καταψύκτες, κ.ά.). Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν συνολικά 29 δείγματα πόσιμου νερού, εκ των οποίων τα 22 προέρχονταν από το δίκτυο ύδρευσης, τα 4 ήταν εμφιαλωμένα νερά που κυκλοφορούσαν στο εμπόριο, τα 2 ήταν από εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων και το 1 προέρχονταν από εν λειτουργία μηχανήμα ψύκτη νερού.

Λόγω του μεγάλου όγκου των δειγμάτων του νερού (4lt) και της χαμηλής συγκέντρωσης της *Pseudomonas aeruginosa* σε αυτά, προηγήθηκαν μέθοδοι συγκέντρωσής τους πριν την απομόνωση αυτού του βακτηρίου. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διατριβή είναι η μέθοδος προσρόφησης – έκλουσης σε ηλεκτραρνητικά φίλτρα και η μέθοδος καθίζησης με PEG, έτσι ώστε να συγκεντρωθεί το βακτήριο σε μικρότερο όγκο. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε πρωτόκολλο βασιζόμενο στη μοριακή μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN), όπου έγινε συμπύκνωση των δειγμάτων νερού και εκχύλιση του DNA, για την απομόνωση του βακτηριακού DNA από τα υπό εξέταση δείγματα νερού.

Παράλληλα, εφαρμόστηκε η μέθοδος της PCR σε πρότυπο στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa*, το οποίο απομονώθηκε ύστερα από καλλιέργεια που έγινε στο εργαστήριο. Το προϊόν της PCR, ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, απομονώθηκε και καθαρίστηκε, έτσι ώστε να κλωνοποιηθεί και τελικά να πάρουμε πλασμίδιο με ενθετημένο το αρχικό πρότυπο στέλεχος της *Pseudomonas aeruginosa*. Το πλασμίδιο αυτό υποβλήθηκε σε υποδεκαπλάσιες σειριακές αραιώσεις, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την πρότυπη καμπύλη της Real – Time PCR.

Ακολούθως, εφαρμόστηκε σε κάθε δείγμα η τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης σε Πραγματικό Χρόνο (Real – Time PCR), η οποία μπορεί γρήγορα και με μεγάλη ευαισθησία να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει το γενετικό υλικό του υπό εξέταση βακτηρίου. Η μέθοδος αυτή, η οποία αποτελεί ένα καλό εργαλείο για την ανίχνευση λοιμώξεων που προκαλούνται από τα γνωστά είδη του γένους *Pseudomonas*, χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για να ανιχνεύσει το γονίδιο *gyrB* της *Pseudomonas aeruginosa* με τη χρήση του εξειδικευμένου ζεύγους εκκινητικών μορίων PA722F / PA899R σε 29 δείγματα πόσιμων νερών.

Από τα 29 δείγματα πόσιμου νερού, τα 7 βρέθηκαν θετικά με την Real – Time PCR και επιβεβαιώθηκαν με τα 5 δείγματα νερού που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες:

- **NTR 1:** 17 copies/test,
- **KAT 10:** 10 copies/test,
- **ITEA 12:** 29 copies/test,
- **IOAN 15:** 13 copies/test,
- **AVRA 17:** 8,23 copies/test,
- **THES 26:** 23.000 copies/test,
- **R1:** 6,14 copies/ test.

Τα δείγματα αυτά είχαν συγκεντρωθεί από διάφορες περιοχές της Ελλάδος, χωρίς να έχει προαναφερθεί στην εκάστοτε περιοχή κάποιο κρούσμα μόλυνσης από *Pseudomonas aeruginosa* στο πόσιμο νερό. Στα υπόλοιπα 22 δείγματα πόσιμου νερού που εξετάστηκαν με την ίδια μέθοδο και τις τεχνικές που περιγράφονται στην παρούσα μελέτη, δεν ανιχνεύτηκε *Pseudomonas aeruginosa*, είτε γιατί δεν υπήρχε αρχικά κάποια επιμόλυνση στα συγκεκριμένα δείγματα είτε γιατί το βακτηριακό τους φορτίο ήταν πολύ μικρό.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εργασίας, είναι υπαρκτός ο κίνδυνος μόλυνσης του πληθυσμού από αεριογόνο ψευδομονάδα μέσω των συστημάτων οικιακής χρήσης ζεστού ή κρύου νερού, μέσω του δικτύου ύδρευσης και μέσω κατανάλωσης εμφιαλωμένων νερών, αλλά ο κίνδυνος αυτός είναι πολύ μικρός. Η συγκέντρωση του βακτηρίου αυτού μπορεί να αποτελέσει δείκτη της καλής κατάστασης ενός δικτύου διανομής νερού, καθώς και της καλής ποιότητας του πόσιμου νερού. Οι ποσότητες των βακτηριακών αντιγράφων των δειγμάτων πόσιμου νερού που ελέγχθηκαν ήταν αρκετά μικρές, άρα δεν αποτελούν τα συγκεκριμένα δείγματα μεγάλο έως καθόλου κίνδυνο για τη δημόσια υγεία.

Επιπλέον, τα βακτηριακά αντίγραφα της *Pseudomonas aeruginosa* που βρέθηκαν σε κάθε δείγμα νερού δεν γνωρίζουμε εάν είναι ζώντα βακτήρια, λόγω του ότι η μέθοδος της Real – Time PCR δεν μας πληροφορεί για αυτό. Επομένως, δεν γνωρίζουμε αν όντως υπάρχει κάποια επιμόλυνση στο νερό από την *Pseudomonas aeruginosa*. Αν πράγματι υπάρχουν ζώντα βακτήρια σε κάποια από τα 7 θετικά δείγματα νερού, αυτό θα είναι το δείγμα εμφιαλωμένου νερού (AVRA17), λόγω του ότι τα εμφιαλωμένα νερά δεν υφίστανται χλωρίωση, όπως τα υπόλοιπα πόσιμα, μια διαδικασία που καταστρέφει πολλούς παθογόνους μικροοργανισμούς, όπως η *Pseudomonas aeruginosa*.

Πράγματι, τα αποτελέσματα της εργασίας συμπίπτουν με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών στο ίδιο θέμα, όπου τονίζουν ότι οι κίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία που συνδέονται με την έκθεση σε *Ps. aeruginosa* μέσω της κατάποσης του πόσιμου νερού εκτιμούνται χαμηλοί. Για παράδειγμα, μετά από μια έρευνα σε 29 διαφορετικές περιοχές της Πορτογαλίας, προσπάθησαν να απομονώσουν διαφορετικών ειδών παθογόνα βακτήρια από οικιακά δίκτυα υδρεύσεως. Η *Ps. aeruginosa* βρέθηκε μόνο σε 12 από τις 29 περιοχές, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα βακτήρια που ανιχνεύθηκαν σε όλες (Vaz – Moreira et al., 2012).

Σύμφωνα με την Νομοθετική Οδηγία 98/83/EC για το πόσιμο νερό (EU, 1998) της Ευρωπαϊκής Ένωσης, μικροοργανισμοί – δείκτες, όπως η *Ps. aeruginosa*, θα πρέπει να παρακολουθούνται σε τακτική βάση στο πόσιμο νερό. Ο έλεγχος αυτός είναι απαραίτητος για την αποφυγή καταστάσεων που μπορούν να επιφέρουν βακτηριακή ανάπτυξη, όπως στασιμότητα και σκληρότητα του νερού, μη επαρκή υλικά σύνδεσης, διάβρωση σωλήνων νερού κτλ., και να οδηγήσουν στο τέλος σε ανεπιθύμητο σχηματισμό βιοφίλμ (WHO, 2004b, 2006).

Το πρωτόκολλο της Real – Time PCR, που δημιουργήθηκε και ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία, αποτελεί θεμελιώδη τεχνική για την γρήγορη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του βακτηριακού φορτίου της *Ps. aeruginosa* στα πόσιμα νερά. Η Real – Time PCR, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας

που διαθέτει, αποτελεί την πρώτη ένδειξη για την πιθανή επιμόλυνση του υπό εξέταση δείγματος από *Pseudomonas aeruginosa*. Εν συνεχεία, τα θετικά δείγματα μπορούν να υποβληθούν σε καλλιέργεια και να προσδιοριστεί η τιμή σε CFU/ml, έτσι ώστε να συγκριθούν τα αποτελέσματα με τα επιτρεπτά όρια πόσιμου νερού.

Συμπερασματικά, πρέπει να ελέγχεται συστηματικά η μικροβιακή ποιότητα του νερού των δημόσιων συστημάτων παροχής νερού, αλλά και των βιομηχανιών επεξεργασίας νερού, έτσι ώστε να περιοριστούν οι λοιμώξεις που προκαλούνται από την *Pseudomonas aeruginosa*, ιδιαίτερα από τα πολυανθεκτικά στελέχη της, τα οποία μπορεί να προκαλέσουν επιδημίες. Κρίνεται σκόπιμο επομένως, η απαγόρευση που υπάρχει από τη νομοθεσία στην χρήση αυτών των συστημάτων παροχής νερού από τον πληθυσμό, όταν υπερβαίνονται τα επιτρεπτά όρια περιεκτικότητας της *Pseudomonas aeruginosa* στο δίκτυο ύδρευσης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ❖ **Αντωνιάδης Α., Αντωνιάδης Γ.Ρ., Λεγάκης Ν., Τσελέντης Ι. (1999).** Ιατρική Μικροβιολογία. Εκδόσεις Πασχαλίδη.
- ❖ **Δημητρακόπουλος Γ. (1982).** Ιατρική Βακτηριολογία, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη, Αθήνα.
- ❖ **Κατελάρη Α., Αλεξάνδρου Ε., Ντουντουνάκης Σ. (2010).** Λοιμώξεις του αναπνευστικού σε ασθενείς με κυστική ίνωση, Γ. Δημόπουλος.
- ❖ **Allen Martin J., Geldreich Edwin E. (1975).** Bacteriological Criteria for Ground-Water Quality. *Groundwater*, 13(1): 45 – 52.
- ❖ **Anuj, S.N., Whiley, D.M., Kidd, T.J., Bell, S.C., Wainwright C.E., Nissen, M.D., Sloots, T.P. (2009).** Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by a duplex real-time polymerase chain reaction assay targeting the *ecfX* and the *gyrB* genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 63: 127 – 131.
- ❖ **Avrain Laetitia, Mertens Pascal, Van Bambeke Françoise (2013).** RND efflux pumps in *P. aeruginosa*: an underestimated resistance mechanism. *CLI, Antibiotic susceptibility*, p. 26-28.
- ❖ **Barker L.F. (1954).** The clinical symptoms, bacteriologic findings and postmortem appearances in cases of infection of human beings with the bacillus pyocyaneus. *J. Hyg. (London)*, 52: 403.
- ❖ **Bert, F., Maubec, E., Bruneau, B., Berry, P., Lambert-Zechovsky N. (1998).** Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit. *J. Hosp. Infect.*, 39: 53 – 62.
- ❖ **Blondel Hill E., Henry D.A., Speert D.P. (2007).** *Pseudomonas* In: Manual of Clinical Microbiology, Editions: Murray P.R., Baron E.J., Tenover J.C., Tenover F.C., ASM Press, Washington D.C., 9: 734 – 748.
- ❖ **Bodey G.P., Bolivar R., Fainstein V., Jadeja L. (1983).** Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.*, 5: 279 – 313.
- ❖ **Bodey P.G., Jadeja L., Elting L. (1985).** *Pseudomonas* bacteremia: Retrospective analysis of 410 episodes. *Archives of Inter. Medic.*, 145: 1621 – 9.

- ❖ **Brewer C.S., Wunderink G.R., Jones B.C., Leeper V.K. (1996).** Ventilator – associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest.*, 109: 1019 – 1029.

- ❖ **Cavalca L., Di Gennaro P., Colombo M., Andreoni V., Bernasconi S., Ronco I. and Bestetti G. (2000).** Distribution of catabolic pathways in some hydrocarbon-degrading bacteria from a subsurface polluted soil. *Res. Microbiol.*, 151: 877 – 887.

- ❖ **Center for Disease Control and Prevention (CDC) (1999).** National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1990-May 1999. *Am. J. Infect. Control.*, 27: 520 – 532.

- ❖ **Cherian T., Lalitha M.K., Manoharan A., Thomas K., Yolken R.H., Steinhoff M.C. (1998).** PCR-enzyme immunoassay for detection of *S. pneumoniae* DNA in cerebrospinal fluid samples from patients with culture-negative meningitis. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 3605 – 3608.

- ❖ **Cohen Taylor Sitarik, Prince Alice (2012).** Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nature Medicine*, 18: 509 – 519.

- ❖ **Cramer N., Klockgether J., Wrasman K., Schmidt M., Davenport C., Tümmler B. (2011).** Microevolution of the major common *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14 in cystic fibrosis lungs. *Environ. Microbiol.*, 13: 1590 – 1604.

- ❖ **Cross A.S., Allen J., Burke J., Duce G., Haris A., John J., Johnson D., Lew M., MacMillan B., Meers P., Skalova R., Wenzel R., Tenney J. (1983).** Nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. Review of recent trends. *Rev. Inf. Dis.*, 5: 5.

- ❖ **De Vos D., Lim A.Jr, Pirnay J.P., Struelens M., Vandenvelde C., Duinslaeger L. (1997).** Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, *oprI* and *oprL*. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 1295 – 1299.

- ❖ **Deschaght P., De Baere T., Van Simaey L., Van Daele S., De Baets F., De Vos D. (2009).** Comparison of the sensitivity of culture, PCR and quantitative real-time PCR for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol.*, 9: 244.

- ❖ **Diecema J.D., Pfaller A.M., Jones N.R., Doerm V.G., Winokur L.P., Gales C.A., Sader S.H., Kugler K., Beach M. (1997).** Survey of blood-stream infections due to Gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clin. Infect. Dis.*, 29: 595 – 607.

- ❖ **Emde K.M.E., Smith D.W., Facey R. (1992).** Initial investigation of microbially influenced corrosion (MIC) in a low-temperature water distribution-system. *Water Res.*, 26: 169 – 175.

- ❖ **EU, (1998).** European Union. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 relating to the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities*, 330: 32 – 54.

- ❖ **Eyzeby J.P. (1997).** List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *INT J. Syst. Bacteriol.*, 47(2): 590 – 2.

- ❖ **Feizabadi M.M., Majnooni A., Nomanpour B., Fatolahzadeh B., Raji N., Delfani S. (2010).** Direct detection of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with healthcare associated pneumonia by real time PCR. *Infect. Genet. Evol.*, 10: 1247 – 1251.

- ❖ **Ferroni A., Nguyen L., Pron B., Quesne G., Brusset M.C., Berche P. (1998).** Outbreak of nosocomial urinary tract infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in a paediatric surgical unit associated with tap-water contamination. *J. Hosp. Infect.*, 39: 301 – 307.

- ❖ **Fito-Boncompte Laurene, Chapalain Annelise, Bouffartigues Emeline, Chaker Hichem, Lesouhaitier Olivier, Gicquel Gwendoline, Bazire Alexis, Madi Amar, Connil Nathalie, Veron Wilfried, Taupin Laure, Toussaint Bertrand, Cornelis Pierre, Wei Qing, Shioya Koki, Deziel Eric, Feuilloy Marc G. J., Orange Nicole, Dufour Alain, Chevalier Sylvie (2011).** Full Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Requires OprF. *Infect. Immun.*, 79(3): 1176

- ❖ **Flemming H.C., Percival S.I., Walker J.T. (2002).** Contamination potential of biofilms in water distribution systems. *Water Sci. Technol. Water Suppl.*, 2: 271 – 280.

- ❖ **Flemming H.C., Jost Wingender (2011).** Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214: 417– 423

- ❖ **Frahm E., Heiber I., Hoffman S., Koob C., Meier H., Ludwig W., Amann R., Schleifer K.H., Obst U. (1998).** Application of 23S rDNA-targeted oligonucleotide probes specific for enterococci to water hygiene control. *Systematic and Applied Microbiology*, 21: 450–453.
- ❖ **Frahm E., Obst U. (2003).** Application of the flourogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *Journal of Microbiological Methods*, 52: 123–131.
- ❖ **Govan J.R.W., Fyfe J.A.M. (1975).** Mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*: The influence of culture medium on the stability of mucus production. *J. Med. Microbiol.*, 8: 513 – 22.
- ❖ **Grobe S., Wingender J., Flemming H.C. (2001).** Capability of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 204: 139 – 142.
- ❖ **Gustafson T.L., Band J.D., Hutcheson R.H., Schaffner W. (1983).** *Pseudomonas folliculitis* an outbreak and review. *Rev. Infect. Dis.* 5: 1 – 8.
- ❖ **Hall T.A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95 – 98.
- ❖ **Hansen Michael, Kragelund Lene, Nybroe Ole, Sorensen Jan. (1997).** Early colonization of barley roots by *Pseudomonas fluorescens* studied by immunofluorescence technique and confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiology Ecology*, 23(4): 353 – 360.
- ❖ **Hirsch E.B., Tam V.H. (2010).** Impact of multidrug- resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev. Pharmacoecon. Outcomes Res.* 10(4): 441 – 451.
- ❖ **Hunter P.R. (1993).** The microbiology of bottled natural mineral waters. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 345 – 352.
- ❖ **Karadzic I., Masui A., Zivkovic L.I., Fujiwara N. (2006).** Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid. *J. Biosc. Bioeng.* 102: 82 – 89.

- ❖ **Khan A.A., Cerniglia C.E. (1994).** Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3739 – 3745.
- ❖ **Khan I.U., Yadav, J.S. (2004).** Real-time PCR assays for genus-specific detection and quantification of culturable and non-culturable mycobacteria and pseudomonads in metalworking fluids. *Mol. Cell Probes* 18: 67–73.
- ❖ **Kimata N., Nishino T., Suzuki S., Kogure K. (2004).** *Pseudomonas aeruginosa* isolated from marine environments in Tokyo Bay. *Microb. Ecol.* 47: 41 – 47.
- ❖ **Khabbaz R.F., McKinley T.W., Goodman R.A., Hightower A.W., High-Smith A.K., Tait K.A., Band J.D. (1983).** *Pseudomonas aeruginosa* serotype O: 9 new cause of whirlpool associated dermatitis. *Am. J. Med.* 74: 73 – 77.
- ❖ **Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H. (2007).** Clustal W and Clustal x version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947 – 2948.
- ❖ **Lavenir R., Jocktane D., Laurent F., Nazaret S., Cournoyer B. (2007).** Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target. *J. Microbiol. Methods* 70: 20 – 29.
- ❖ **Leclerc H., Schwartzbrod L., Dei-Cas E. (2002).** Microbial agents associated with waterborne diseases. *Critical Reviews in Microbiology* 28(4): 371 – 409.
- ❖ **Lederberg Joshua (2000).** *Pseudomonas*. *Encyclopedia of Microbiology*, 3(2): 876 – 891.
- ❖ **Lee C.S., Wetzel K., Buckley T., Wozniak D., Lee J. (2011).** Rapid and sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* in chlorinated water and aerosols targeting *gyrB* gene using real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* 111: 893 – 903.
- ❖ **Legnani, P., Rapuano, S., Turin, D., Valenti, C. (1999).** Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study. *International Journal of Food Microbiology* 53 (2–3): 153 – 158.
- ❖ **Mathee K., Narasimhan G., Valdes C., Qiu X., Matewish J.M., Koehrsen M., Rokas A., Yandava C.N., Engels R., Zeng E., Olavarietta R., Doud M., Smith R.S., Montgomery P., White J.R., Godfrey P.A., Kodira C., Birren B., Galagan J.E., Lory, S. (2008).** Dynamics of *Pseudomonas*

- aeruginosa genome evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105: 3100 – 3105.
- ❖ **Mena K.D., Gerba C.P. (2009).** Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 201: 71 – 115.
 - ❖ **Mesaros N., Van Bambeke F (2005).** L'efflux actif des antibiotiques et la resistance bacterienne: etat de la question et implications. La lettre de l'infectiologue, 4:117 – 126.
 - ❖ **Mulet M., Lalucat J., Garcia – Valdes E.M. (2010).** DNA base sequence analysis of the *Pseudomonas* species. Environ. Microbiol. 12: 1513 – 1530.
 - ❖ **Naze F., Jouen E., Randriamahazo R.T., Simac C., Laurent P., Bleriot A. (2010).** *Pseudomonas aeruginosa* outbreak linked to mineral water bottles in a neonatal intensive care unit: fast typing by use of high-resolution melting analysis of a variable-number tandem-repeat locus. J. Clin. Microbiol. 48: 3146 – 3152.
 - ❖ **Palleroni N., Norberto J. (2010).** The *Pseudomonas* Story. Environ. Microbiol. 12(6): 1377 – 1383.
 - ❖ **Pandit L., Kumar S., Karunasagar I. (2005).** Diagnosis of partially treated culture-negative meningitis using 16s rRNA universal primers and restriction endonuclease digestion. J. Med. Microbiol. 54(6): 539 – 542.
 - ❖ **Peix A., Ramirex – Bahena M.H., Velazquez E. (2009).** Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. Infect. Genet. Evolut., 9: 1132 – 1147.
 - ❖ **Pellett S., Bigley D.V., Grimes D.J. (1983).** Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a riverine ecosystem. Appl. Environ. Microbiol. 45: 328 – 332.
 - ❖ **Pier G.B., Thomas M.D. (1982).** Lipopolysaccharide and High molecular weight polysaccharide serotypes of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Inf. Dis. 145: 217 – 223.
 - ❖ **Qin X., Emerson J., Stapp J., Stapp L., Abe P., Burns J.L. (2003).** Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol., 41: 4312 – 4317.
 - ❖ **Rello J, Rue M, Jubert P, Muses G, Sonora R, Valle J, Niederman Sm. (1997).** Survival in patients with Nosocomial pneumonia: impact of the

severity of illness and the etiologic agent. *Critical Care Medicine.*, 25: 1862 – 1867.

- ❖ **Relman D.A., Schmidt T.M., MacDermott R.P., Falkow S. (1992).** Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med* 327: 293 – 301.
- ❖ **Rodríguez Diana Catalina, Pino Nancy, Peñuela Gustavo (2012).** Microbiological quality indicators in waters of dairy farms: Detection of pathogens by PCR in real time. *Science of the Total Environment*, p. 427 – 428, 314 – 318.
- ❖ **Römling U., Greipel J., Tümmler B. (1995).** Gradient of genomic diversity in the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *Mol. Microbiol.*, 17: 323 – 332.
- ❖ **Schmidt K.D., Tümmler B., Römling U. (1996).** Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats. *J. Bacteriol.*, 178: 85 – 93.
- ❖ **Schwartz T., Hoffman S., Obst U. (1998).** Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered drinking water systems. *Water Research*, 32(9): 2787 – 2797.
- ❖ **Schwartz T., Hoffmann S., Obst U. (2003).** Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and UV disinfection in a public drinking water distribution system. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 591–601.
- ❖ **Schwartz T., Volkmann H., Kirchen S., Kohnen W. Schon-Holz K., Jansen B., Obst U. (2006).** Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 57: 158 – 167.
- ❖ **Siegman-Igra Y., Ravona R., Primerman H., Giladi M. (1998).** *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: an analysis of 123 episodes, with particular emphasis on the effect of antibiotic therapy. *International Journal of Infectious Diseases*, 2: 211 – 215.
- ❖ **Silby Mark W., Winstanley Craig, Godfrey Scott A.C., Levy Stuart B., Jackson Robert W. (2011).** *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*. 35(4): 652 – 680.
- ❖ **da Silva Filho L.V., Tateno A.F., Velloso Lde F., Levi J.E., Fernandes S., Bento C.N. (2004).** Identification of *Pseudomonas aeruginosa*, Burkholderia

- cepacia complex, and *Stenotrophomonas maltophilia* in respiratory samples from cystic fibrosis patients using multiplex PCR. *Pediatr. Pulmonol.*, 37: 537 – 547.
- ❖ **Spencer D.H., Kas A., Smith E.E., Raymond C.K., Sims E.H., Hastings M., Burns J.L., Kaul R., Olson M.V. (2003).** Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriol.*, 185: 1316 – 1325.
 - ❖ **Stoodley B.J., Thom D.T. (1970).** Observations on the intestinal carriage of *P. aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.*, 3: 367.
 - ❖ **Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrenner P., Hickey M.J., Brinkman F.S., Hufnagle W.O., Kowalik D.J., Lagrou M., Garber R. L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L.L., Coulter S.N., Folger K.R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G.K., Wu Z., Paulsen I.T., Reizer J., Saier M.H., Hancock R.E., Lory S., Olson M.V. (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406: 959 – 964.
 - ❖ **Subrayan V., Peyman M., Lek Yap S., Mohamed Ali, N.A., Devi, S. (2010).** Assessment of polymerase chain reaction in the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in contact lens-induced severe infectious keratitis. *Eye Contact Lens*, 36: 201 – 203.
 - ❖ **Thomas E.T., Jones L.F., Simao E., Sole-Vermin C., Farmer J.J. (1975).** III. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in a general hospital: a four-year study. *J. Clin. Microbiol.*, 2: 397.
 - ❖ **Trautmann M., Michalsky T., Wiedeck H., Radosavljevic V., Ruhnke M. (2001).** Tap water colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in a surgical intensive care unit (ICU) and relation to *Pseudomonas* infections of ICU patients. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 22: 49 – 52.
 - ❖ **Vaz – Moreira Ivone, Nunes Olga C., Manaia Celia M. (2012).** Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. *Science of the Total Environ.*, 426: 366 – 374.
 - ❖ **Villarreal Jessica Varela, Schwartz Thomas, Obst Ursula, (2010).** Culture-independent techniques applied to food industry water surveillance — A case study. *International Journal of Food Microbiology* 141: 147 – 155.
 - ❖ **Vincent L.J., Bihari L.D., Suter M.P., Bruining A., White J., Nicolas – Chanoin M., Wolff M., Spencer C.R., Hemmer M. (1995).** The prevalence

of Nosocomial infection in intensive care units in Europe: results of the European Prevalence of infection in intensive care units (EPIC) Study. *JAMA*, 74: 639 – 644.

- ❖ **Wihlmann L., Wagner G., Cramer N., Siebert B., Gudowius P., Morales G., Ko T., Delden C., Weinel C., Slickers P., Tu B. (2007).** Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 8101 – 8106.
- ❖ **Wingender J., (2011).** Hygienically relevant microorganisms in biofilms of man-made water systems. In: Flemming H.-C., Wingender J., Szewzyk U. (Eds.), *Biofilm Perspectives*. Springer International, Heidelberg, New York, (Chapter 9).
- ❖ **Wolfgang M.C., Kulasekara B.R., Liang X., Boyd D., Wu K., Yang Q. (2003).** Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci., U S A*, 100: 8484 – 8489.
- ❖ **WHO, (2004a).** In: Ainsworth, R. (Ed.), World Health Organization. *Safe piped water: managing microbial water quality in piped distribution systems*. IWA Publishing, London, UK. ISBN: 1843390396.
- ❖ **WHO, (2004b).** In: LeChevallier, M.W., Au, K.K. (Eds.), World Health Organization. *Water treatment and pathogen control: process efficiency in achieving safe drinking water*. IWA Publishing, London, UK. ISBN: 1 84339069 8.
- ❖ **WHO, (2006).** World Health Organization. *Health aspects of plumbing*. World Health Organization and World Plumbing Council, Geneva, Switzerland. ISBN: 978 92 4 156318 5.