

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**« ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ »**

ΠΕΤΡΟΣ ΡΙΤΚΟΣ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ
PSEUDOMONAS AERUGINOSA ΣΕ ΕΜΦΙΑΛΩΜΕΝΑ ΚΑΙ
ΠΟΣΙΜΑ ΝΕΡΑ**



ΛΑΡΙΣΑ 2013

Ανίχνευση και μοριακός χαρακτηρισμός της *Pseudomonas aeruginosa* σε εμφιαλωμένα και πόσιμα νερά

Detection and molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled and drinking water

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την ανάθεση αυτού του θέματος και την πολύτιμη βοήθεια του στη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης την κα Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα Διδάκτορα, μέλος Ε.Ε.ΔΙΠ. για το ενδιαφέρον και την άριστη συνεργασία μέχρι την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Ακόμη, θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους καθηγητές κ.Μόσιαλο Δημήτριο και κ.Καρπούζα Δημήτριο για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή κατά την αξιολόγηση της εργασίας μου.

Ακόμη ένα ευχαριστώ οφείλω στους φίλους μου και στους δικούς μου ανθρώπους για την συμπαράσταση τους και την βοήθεια τους στην ερευνητική εργασία.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου για την προσφορά τους κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ψευδομονάδες είναι βακτήρια που απομονώνονται από τα επιφανειακά νερά λιμνών και ποταμών, εμφιαλωμένα νερά, αλλά και από τα νερά της υδρεύσεως και τα όργανα του ανθρώπου. Δεν αποικίζουν το σώμα του ανθρώπου αλλά προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις κυρίως του αναπνευστικού συστήματος με αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα. Από το σύνολο των ψευδομονάδων, το συχνότερο είδος είναι η *Pseudomonas aeruginosa*.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση και ο μοριακός χαρακτηρισμός της *Pseudomonas aeruginosa* σε εμφιαλωμένα και πόσιμα νερά.

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης, γνωστή ως αντίδραση PCR, αποτελεί ένα καλό εργαλείο για την ανίχνευση λοιμώξεων που προκαλούνται από τα γνωστά είδη *Pseudomonas*. Διάφορες δοκιμές PCR έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση του βακτηρίου, χρησιμοποιώντας ειδικές DNA αλληλουχίες για την *Pseudomonas aeruginosa*.

Στην παρούσα έρευνα συλλέχθηκαν συνολικά 29 δείγματα εκ των οποίων τα 19 προέρχονταν από το δίκτυο ύδρευσης, τα 4 ήταν εμφιαλωμένα νερά που κυκλοφορούσαν στο εμπόριο, τα 2 ήταν από εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων, τα 3 ήταν από πόσιμο νερό και το 1 προέρχονταν από εν λειτουργία μηχανήμα ψύκτη νερού.

Σε κάθε δείγμα εφαρμόστηκε PCR για *Pseudomonas aeruginosa*. Τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:

Από τα 29 δείγματα τα 8 βρέθηκαν θετικά με την PCR. Από αυτά τα δείγματα, τα 5 είχαν συγκεντρωθεί από δίκτυο ύδρευσης, 1 από εργοστάσιο επεξεργασίας τροφίμων, 1 από εμφιαλωμένο νερό του εμπορίου και 1 από πόσιμο νερό. Στα υπόλοιπα 21 δείγματα πόσιμου νερού που εξετάστηκαν με τις μεθόδους και τις τεχνικές που περιγράφονται στην παρούσα μελέτη δεν ανιχνεύτηκε *P. aeruginosa*.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εργασίας μας, είναι υπαρκτός ο κίνδυνος μόλυνσης του πληθυσμού από ψευδομονάδα μέσω των συστημάτων οικιακής χρήσης ζεστού ή κρύου νερού.

Κρίνεται σκόπιμο επομένως, η απαγόρευση που υπάρχει από τη νομοθεσία στην χρήση αυτών των συστημάτων από τον πληθυσμό, όταν υπερβαίνονται τα όρια περιεκτικότητας με *Pseudomonas aeruginosa* στο δίκτυο ύδρευσης, να συνεχίσει να εφαρμόζεται πιστά και με ακρίβεια.

ABSTRACT

Pseudomonas are bacteria which are collected from lake's and river's surface water, bottled water, from supplied water and human organs. They do not colonize the human body but mainly cause serious diseases of the respiratory system with high morbidity and mortality. Of all *Pseudomonas* species, the most common is *Pseudomonas aeruginosa*.

A total of 29 samples were collected of which 19 were from the network of water supplies, 4 were bottled waters marketed in, 2 were from food processing plants, 3 were from tap water and 1 from water cooler machine operation. To each sample PCR was applied for the detection of *Pseudomonas aeruginosa*. The results were:

Of the 29 samples, 8 were found positive for *Pseudomonas aeruginosa*. Of these samples 5 were from the network of water supplies, 1 were from food processing plant, 1 were from bottled water marketed in and 1 were from tap water. In the remaining 21 samples of drinking water that were tested with the methods and techniques described in the present study *Pseudomonas aeruginosa* was not detected.

According to the results of our work, there is a real risk of *Pseudomonas* infection from household systems of hot or cold water.

The population must be protected by the prohibition of the use of water supply, in the case where the levels of the detected *Pseudomonas aeruginosa* exceed the permissible limits.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1. ΝΕΡΟ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ.....	9
1.1 ΝΕΡΟ - ΕΜΦΙΑΛΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ.....	9
1.2 ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ.....	12
1.2.1 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ – ΔΕΙΚΤΕΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΝΕΡΟΥ.....	14
1.2.2 ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΠΟΣΙΜΟΥ ΝΕΡΟΥ.....	16

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2. ΨΕΥΔΟΜΟΝΑΔΕΣ.....	18
2.1 ΡΟΛΟΣ ΣΤΗ ΦΥΣΗ.....	18
2.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ.....	18
2.3 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	21
2.3.1 ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ.....	21
2.3.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ – ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	23
2.3.3 ΑΠΟΙΚΙΕΣ.....	24
2.3.4 ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ.....	25
2.3.4.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ.....	25
2.4 ΨΕΥΔΟΜΟΝΑΔΑ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ.....	27
2.4.1 ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΕΣ ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ ΥΔΑΤΟΓΕΝΟΥΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ.....	27
2.4.2 ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΝΕΡΑ ΑΝΑΨΥΧΗΣ.....	32
2.5 ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΨΕΥΔΟΜΟΝΑΔΩΝ.....	35
2.6 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΨΕΥΔΟΜΟΝΑΔΩΝ.....	36
2.6.1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ- ΑΡΙ 20ΝΕ.....	36
2.7 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΨΕΥΔΟΜΟΝΑΔΩΝ.....	37
2.8 ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	38
2.9 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	39
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	42

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
3.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ.....	43
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	44
3.2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ – ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΑΠΟ ΗΛΕΚΤΡΑΡΝΗΤΙΚΑ.....	45

ΦΙΛΤΡΑ.....	
3.2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ ΜΕ PEG.....	46
3.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA.....	46
3.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	47
3.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR.....	48
3.6 ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	48
3.7 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ.....	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	51
4.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΝΕΡΟΥ ΓΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑ <i>PSEUDOMONAS</i> <i>AERUGINOSA</i>	51
4.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΗΣ PCR.....	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	60

1. ΝΕΡΟ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ

1.1 ΝΕΡΟ-ΕΜΦΙΑΛΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ

Το νερό είναι από τους σπουδαιότερους παράγοντες για την ανάπτυξη και διατήρηση της ζωής στον πλανήτη μας. Είναι ανανεώσιμος φυσικός πόρος και η βιώσιμη διαχείριση του συμβάλλει στην αειφορία του Περιβάλλοντος και την Προαγωγή της Υγείας. Αποτελεί το 60% περίπου της μάζας του σώματος και είναι βασικός παράγοντας της κυκλοφορίας και της ηλεκτρολυτικής ισορροπίας του οργανισμού μας. Ποσοστό 0,5% περίπου από την ολική ποσότητα του νερού στη φύση (υπογείου και επιφανειακού) προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση. 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 ρύπανση και η συνεχής υποβάθμιση του περιβάλλοντος τις τελευταίες δεκαετίες έχει προκαλέσει έντονη ανησυχία στο μέσο καταναλωτή, ο οποίος έχει προσανατολιστεί πλέον σε πιο υγιεινές διατροφικές συνήθειες, μη διστάζοντας να ξοδέψει αρκετά χρήματα προκειμένου να είναι σίγουρος για την ποιότητα των προϊόντων που φτάνουν στο καθημερινό τραπέζι. Στο γενικό αυτό πλαίσιο παρατηρείται μία συνεχόμενη αύξηση της κατανάλωσης εμφιαλωμένου νερού παγκοσμίως, καθώς οι καταναλωτές πιστεύουν ότι είναι ασφαλέστερο από το νερό της βρύσης, με αποτέλεσμα ο συγκεκριμένος τομέας να αποτελεί σήμερα τον ταχύτερα αναπτυσσόμενο τομέα της βιομηχανίας τροφίμων και ποτών.

Εμφιαλωμένο νερό ονομάζεται το νερό εκείνο, το οποίο προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση και βρίσκεται σφραγισμένο σε φιάλες ή άλλα δοχεία χωρίς πρόσθετα συστατικά, εκτός από ορισμένους κατάλληλους και ασφαλείς αντιμικροβιακούς παράγοντες που μπορεί προαιρετικά να περιέχει (Semerjian L.A., 2011). Επίσης στο εμφιαλωμένο νερό μπορεί, προαιρετικά, να προστεθεί φθόριο, πάντα εντός των καθιερωμένων προτύπων ποιότητας σύμφωνα με την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA 2008). Οι εγκεκριμένες πηγές νερού για εμφιάλωση θα πρέπει να έχουν επιθεωρηθεί και ελεγχθεί σχετικά με την ποιότητα τους. Η όλη κατεργασία αυτού του νερού εξαρτάται από την ποιότητα του νερού από τις πηγές, το είδος του εμφιαλωμένου νερού και την τοποθεσία (Warburton D.W. and Austin J.W., 1997). Υπάρχουν τρεις κατηγορίες εμφιαλωμένου νερού,

αναγνωρισμένες από την Ευρωπαϊκή Ένωση: το επιτραπέζιο, το φυσικό μεταλλικό νερό και το νερό πηγής.

Είναι ευρέως διαδεδομένο ότι η ποιότητα και η ασφάλεια του πόσιμου νερού αποτελεί ένα πολύ σημαντικό θέμα της Δημόσιας Υγείας (Hrudey S.E. and Hrudley E.J., 2007; Reynolds et al., 2007), επειδή η μόλυνση του που παρατηρείται συχνά, θεωρείται υπεύθυνη για την μετάδοση μολυσματικών ασθενειών που σχετίζονται με την θνησιμότητα παγκοσμίως (Marshall et al., 2006; Jones et al., 2007; O'Reilly et al., 2007; Peace T. and Mazumder A., 2007).

Παράλληλα όμως με τη αύξηση της ζήτησης για εμφιαλωμένο νερό, παρατηρείται δραματική αύξηση και στις ανησυχίες που αφορούν την ποιότητά του. Όπως ένα οποιοδήποτε άλλο προϊόν διατροφής, το εμφιαλωμένο νερό χρειάζεται να επεξεργαστεί, να πακεταριστεί, να μεταφερθεί και να αποθηκευτεί σε ασφαλές από υγιεινής άποψης μέρος καθώς και να αποκτήσει ως προϊόν ετικέτα επισήμανσης (Lambert V., 1993). Όπως συμβαίνει με τα περισσότερα είδη διατροφής, το εμφιαλωμένο νερό δεν είναι γενικά απολυμασμένο και ενδέχεται να περιέχει βακτήρια (Warburton D.W. and Austin J.W., 1997). Η διεθνής βιβλιογραφία αποκαλύπτει ότι τα επίπεδα ορισμένων συστατικών που εντοπίστηκαν σε διάφορα εμφιαλωμένα νερά υπερβαίνουν κατά πολύ τα διεθνώς αναγνωρισμένα κριτήρια καταλληλότητας του νερού που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση. Έρευνες που διεξήχθησαν κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του '80 απέδειξαν ότι πιθανά προβλήματα όντως υπάρχουν στο μικροβιακό περιεχόμενο του εμφιαλωμένου νερού. Κατά μέσο όρο, 40% των εμφιαλωμένων νερών στην Καναδική αγορά π.χ μεταξύ του 1981 και του 1989 περιείχαν αποικίες αερόβιων βακτηριακών φορτίων που ξεπερνούσαν τα επιτρεπτά όρια εκείνης της εποχής (Warburton et al., 1986, Warburton et al., 1992), καθιστώντας απαραίτητη μια πιο εκτεταμένη επιτήρηση της βιομηχανίας εμφιαλωμένου νερού στον Καναδά.

Αυτά τα αποτελέσματα ώθησαν τον οργανισμό υγείας του Καναδά και άλλους φορείς να προτρέψουν τους παρασκευαστές του πόσιμου νερού να συμπεριλάβουν μέτρα απολύμανσης του νερού πριν τη εμφιάλωση, όπως η ανθράκωση (απολύμανση με φίλτρο ενεργού άνθρακα) ή ο οζονισμός (απολύμανση με όζον) (Warburton et al., 1992). Η ανθράκωση (ή η απολύμανση με φίλτρο ενεργού άνθρακα) είναι γνωστό ότι μειώνει το pH του νερού και έχει βακτηριοκτόνο δράση κατά των βακτηρίων (Warburton D.W. and Austin J.W., 1997). Επίσης η απολύμανση με όζον καταστρέφει όποιο βακτήριο υπάρχει σε καινούρια ή ανακυκλώσιμα μπουκάλια εμφιάλωσης. Εισαγωγή τέτοιων μέτρων απολύμανσης θα βελτιώσει την όλη ποιότητα του εμφιαλωμένου νερού και θα βοηθήσει στην διασφάλιση της Δημόσιας Υγείας. Προαγωγή της ποιότητας θα επιτευχθεί επίσης μέσω της βελτίωσης των συνθηκών παρασκευής και αποθήκευσης του εμφιαλωμένου νερού.

Τα περισσότερα εμφιαλωμένα νερά στην Βόρεια Αμερική απολυμαίνονται πια με όζον (Warburton D.W. and Austin J.W., 1997). Πολλοί παρασκευαστές χρησιμοποιούν αποκλειστικά τον οζονισμό, ή σε συνδυασμό με άλλες διεργασίες (όπως ακτινοβολία UV, ανθράκωση και υπερδιήθηση) με σκοπό να εξασφαλίσουν την ασφάλεια των προϊόντων τους (Warburton D.W. and Austin J.W., 1997). Μολονότι μια μέθοδος όπως ο οζονισμός έχει δείξει ότι μπορεί να αποστειρώσει προϊόντα (Block J.C., 1982; Schneider W. and Rump H.H., 1983), αποτελέσματα σύγχρονων μελετών φανερώνουν ότι νέες προδιαγραφές και οδηγίες θα πρέπει να εφαρμοστούν ώστε να βοηθήσουν τους επιθεωρητές Δημόσιας Υγείας στο έργο των ελέγχων τους, αλλά και τις εταιρείες εμφιαλωμένου νερού ώστε να προμηθεύουν την αγορά με προϊόντα που συμμορφώνονται στους εκάστοτε νόμους και κανόνες.

Η παρουσία οργανικών ουσιών, τοξικών στοιχείων, νιτρικών και νιτρωδών στο πόσιμο και κατ' επέκταση και στο εμφιαλωμένο νερό, μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο, διάφορες δυσλειτουργίες και χρόνιες παθήσεις (Kuo et al., 1997; Parslow et al., 1997). Εξαιτίας της αυξανόμενης χρήσης του εμφιαλωμένου νερού, έχουν ορισθεί ορισμένες προδιαγραφές με σκοπό να προστατέψουν την Δημόσια Υγεία από τυχόν λοιμώξεις.

Το βασικό ερώτημα που απασχολεί πλέον την παγκόσμια κοινότητα, είναι εάν το εμφιαλωμένο νερό είναι όντως τόσο ασφαλές και ανώτερο ποιοτικά από το νερό της βρύσης όσο παρουσιάζεται από τις εταιρίες που το εμπορεύονται, ή στην πραγματικότητα, αποτελεί κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία.

Επίσης, την τελευταία δεκαετία, παρατηρείται παγκοσμίως μια ιδιαίτερη αύξηση στην κατανάλωση πόσιμου νερού που προέρχεται από διάφορες πηγές, αντικαθιστώντας το νερό της βρύσης. Μια από αυτές τις εναλλακτικές πηγές, είναι οι ψύκτες, που συναντώνται συνήθως σε κτίρια γραφείων και σε εμπορικά καταστήματα. Οι ψύκτες συχνά παρουσιάζονται ως συστήματα εύκολα στη χρήση, στην συντήρηση του νερού και ικανά να βελτιώσουν ορισμένα χαρακτηριστικά του. Ωστόσο, ανησυχίες σχετικά με την ποιότητα του νερού αυτού έχουν προκύψει, εξαιτίας της πιθανότητας ορισμένες ασθένειες που εμφανίστηκαν να σχετίζονται με χρήση του νερού αυτού, ιδιαίτερα σε ευαίσθητα άτομα (Reynolds et al., 2007).

Πράγματι, τα ευρήματα μιας έρευνας έδειξαν ότι μεγάλος αριθμός δειγμάτων μη ανθρακούχου και ανθρακούχου νερού που συλλέχτηκαν από ψύκτες αποκάλυψαν βακτηριακό φορτίο μεγαλύτερο από τα επιτρεπόμενα όρια (Liguori et al., 2010). Τα ευρήματα αυτής της έρευνας ήρθαν σε συμφωνία με αποτελέσματα ερευνών που διεξήχθησαν πρόσφατα (Baumgartner A. and Grand M., 2006; Zanetti et al., 2009). Πιο συγκεκριμένα, βακτήρια όπως η *Escherichia coli* και *Enterococcus spp.* απουσίαζαν σε δείγματα νερού από ψύκτες ενώ η *P. aeruginosa* ανιχνεύθηκε στο 24,1% των δειγμάτων (Baumgartner A. and

Grand M., 2006). Γενικά η *P. aeruginosa* ανιχνεύθηκε πιο συχνά σε ανθρακούχα και μη δείγματα νερών από ψύκτες απ'ότι σε δείγματα από νερό της βρύσης γεγονός που επιβεβαιώνεται και σε άλλες μελέτες. (Baumgartner A. and Grand M., 2006; Lévesque et al., 1994).

Για το λόγο αυτό, συνίσταται η ανά τακτά χρονικά διαστήματα απολύμανση αυτών των ψύκτων νερού έτσι ώστε να διατηρηθεί το επίπεδο της μικροβιολογικής μόλυνσης υπο έλεγχο. Την εγκυρότητα αυτής της μεθόδου απολύμανσης έρχονται να ενισχύσουν αποτελέσματα μιας έρευνας που έδειξαν ότι η περιοδική εφαρμογή σε νερά τέτοιων ψύκτων με υπεροξείδιο του υδρογόνου (3%), οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης *P. aeruginosa* στα νερά (Zanetti et al., 2009).

Παράλληλα, έχουν αναπτυχθεί διεθνή προγράμματα παρακολούθησης της ποιότητας του πόσιμου νερού, με στόχο να προτρέψουν ή και να μειώσουν το ρίσκο τέτοιων λοιμώξεων να προκληθούν σε ανθρώπους. Στην Ιταλία, το νερό που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση, συμπεριλαμβανομένου και του νερού από ψύκτες, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της Ευρωπαϊκής Κοινοτικής Οδηγίας, υποχρεούται να είναι απαλλαγμένο από κάθε παθογόνο μικροοργανισμό καθώς και από τυχόν χημικές μολύνσεις, που θα θέσει σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία (Council Directive 98/93/EC, Decreto Legislativo, 2001).

1.2 ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ

Η πρόσβαση σε ασφαλές πόσιμο νερό, είναι μια θεμελιώδες ανησυχία για την προστασία της ανθρώπινης υγείας. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) και τις οδηγίες του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου, η συγκέντρωση μικροοργανισμών, παρασίτων ή ουσιών που θέτουν σε ρίσκο τη Δημόσια Υγεία πρέπει να αποτραπεί (Sobsey M.D. and Bartram S., 2003; WHO, 2008). Ο στόχος είναι να προστατέψουμε τη Δημόσια Υγεία από τις αρνητικές επιπτώσεις που μπορεί να φέρει η μικροβιολογική μόλυνση του νερού που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση. Όρια μικροβιακών και χημικών παραμέτρων δημιουργήθηκαν για να καταφέρουμε να παρακολουθήσουμε και να συγκρίνουμε την ποιότητα του πόσιμου νερού σε όλες τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Council Directive 98/93/EC).

Η πρόνοια για ένα ασφαλές νερό από μικροβιακή άποψη, είναι μια από τις κύριες απαιτήσεις της υποδομής παροχής πόσιμου νερού. Για αυτό το λόγο, η παρακολούθησή του από την πηγή έως την βρύση είναι ένα σημαντικό βήμα προς την ασφάλεια της υγιεινής. Ως αποτέλεσμα των οδηγιών που υποδείχθηκαν παραπάνω, οι αρμόδιες αρχές ανά την Ευρώπη

υποχρεούνται να ελέγχουν το νερό που προορίζεται για δημόσια χρήση, ώστε οι καταναλωτές να προμηθεύονται με ασφαλές και απαλλαγμένο από ουσίες νερό.

Μερικά είδη μικροοργανισμών που ενδέχεται να εντοπιστούν και να αναπτυχθούν σε δίκτυα διανομής νερού, όπως οι λεγιονέλλες ή και οι ψευδομονάδες, που μπορούν να προκαλέσουν κίνδυνο για την υγεία των ανθρώπων (Exner M. and Hartemann P., 2009).

Το πόσιμο νερό που προέρχεται από δημόσιες πηγές, δεν είναι αποστειρωμένο, αλλά περιέχει αριθμό αυτόχθονων και τις περισσότερες φορές αβλαβών βακτηρίων (Szewzyk et al., 2000; WHO, 2004a). Τα συστήματα διανομής του πόσιμου νερού αποτελούν ένα τεράστιο ετερογενές περιβάλλον (Leclerc H., 2003), όπου εντοπίζεται ιδιαίτερη ποικιλία και πυκνότητα βακτηριακού πληθυσμού. Τα παθογόνα αυτά βακτήρια έχουν την δυνατότητα με τον τρόπο αυτό να εισέλθουν και να διανέμονται στις παραγωγικές γραμμές της βιομηχανίας τροφίμων (Allen et al., 2004; USEPA, 1992), προκαλώντας λοιμώξεις ιδιαίτερα σε ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς. Άξιο αναφοράς αποτελεί το γεγονός ότι τα παθογόνα βακτήρια ίσως χάνουν την βιωσιμότητα και την παθογένεια τους όταν απομακρύνονται από το φυσικό περιβάλλον τους ή όταν εισέρχονται στην βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη κατάσταση τους (VBNC) (Oliver J.D., 2000, Oliver J.D., 2005).

Τα περισσότερα παθογόνα βακτήρια δεν εκτιμάται να παραμείνουν μολυσματικά στο νερό για μεγάλο χρονικό διάστημα και μερικά θα εξαφανιστούν με τον χρόνο, μιας και δεν είναι ικανά να πολλαπλασιαστούν υπό αυτές τις συνθήκες. Μερικά είδη ωστόσο, όπως οι ψευδομονάδες, μπορούν να πολλαπλασιαστούν στο πόσιμο νερό (Legnani et al., 1999; Grobe et al., 2001; Leclerc et al., 2002). Αν τα βακτήρια συναντήσουν βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης (π.χ. αφθονία θρεπτικών, υγρασία, θερμοκρασία), ο πολλαπλασιασμός τους στην τροφική αλυσίδα και συνεπώς η μεταφορά τους στους ανθρώπους γίνεται μια σοβαρή απειλή.

Το πόσιμο νερό χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων με ποικίλους τρόπους. Μπορεί να έρθει με άμεσο τρόπο σε επαφή με το προσωπικό ή με έμμεσο τρόπο σε επαφή με τα ίδια τα προϊόντα κατά τη διάρκεια πλυσίματος ή καθαριότητας (Casani S. and Knochel S., 2002). Διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την μικροβιακή ποιότητα του πόσιμου νερού όπως π.χ ρήγματα σωληνώσεων, υλικά σωληνώσεων, στάσιμα νερά.

Σύμφωνα πάντα με την Κοινοτική Οδηγία για τα πόσιμα νερά 98/93/EC (EU, 1998), το νερό που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση θα πρέπει να πληροί τις αυστηρότερες προδιαγραφές.

Σε ένα πρόγραμμα επιτήρησης των εμφιαλωμένων νερών που διεξήχθη μεταξύ του 1981 και 1989 από τον Οργανισμό Υγείας του Καναδά, τα μη συμμορφωθέντα με τις προδιαγραφές νερά βρέθηκαν να είναι υψηλότερα από τα επιτρεπτά όρια σε ποσοστό άνω του 30% των δειγμάτων. Δείγματα που συλλέχθηκαν το 1989-1990 επιβεβαίωσαν αυτά τα

αποτελέσματα (Warburton et al., 1992). Για τα εισαγόμενα προϊόντα, 30% από τα μη ανθρακούχα εμφιαλωμένα νερά (συμπεριλαμβανομένου και του μεταλλικού νερού) και 4,2% από τα ανθρακούχα εμφιαλωμένα νερά, είχαν βακτηριακά φορτία υψηλότερα από τα επιτρεπτά όρια. Για τα εγχώρια προϊόντα, 27,3% των μη ανθρακούχων μεταλλικών νερών και 39,5% των άλλων μη ανθρακούχων, είχαν και αυτά ξεπεράσει τα όρια. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε ταύτιση με αποτελέσματα εργασιών στην Αμερική (Ruskin et al., 1991; Hunter P.R., 1993).

Μια έρευνα στον Καναδά, (Πίνακας 1) και συγκεκριμένα από το 1992 μέχρι το 1997, έδειξε μια οριακή βελτίωση και μείωση των βακτηριακών φορτίων, των κολοβακτηριδίων και των παθογόνων στα εμφιαλωμένα νερά. Σε αριθμό 3460 δειγμάτων, το 23,3% υπερέβη το 10^2 ΜΣΑ/ml (Μονάδες Σχηματιζόμενων Αποικιών) και το 5,5% το 10^4 ΜΣΑ/ml αντίστοιχα. Από αυτά, το 1,2% ήταν μολυσμένα με *P. aeruginosa*, το 0,6% με *A. Hydrophila* και στο 3,7% υπήρξε υπέρβαση των ορίων για κολοβακτηρίδια. Με αυτό αποτυπώνεται η ανάγκη για ένα βελτιωμένο σύστημα παρακολούθησης της βιομηχανίας εμφιάλωσης νερών. Η *A. hydrophila*, η *P. aeruginosa* και τα κολοβακτηρίδια αποτελούν δείκτες καλών ή μη πρακτικών εμφιάλωσης νερού (GMPs; Warburton D.W. and Austin J.W., 1997). Τόσο η *P. aeruginosa* όσο και η *A. hydrophila*, είναι παθογόνα που έχουν εμπλακεί σε διατροφικές λοιμώξεις (Warburton et al., 1992, Warburton et al., 1993, Warburton et al., 1994).

Πίνακας 1. Συχνότητα διανομής της *P. aeruginosa* σε δείγματα εμφιαλωμένου νερού από το 1992 μέχρι το 1997

Δείγμα	Αριθμός δειγμάτων που περιέχουν συγκεκριμένα CFU*/ml της <i>P. aeruginosa</i>					Σύνολο
	< 1.0	1.0-10	10-10 ²	10 ² -10 ³	>10 ³	
Νερό απο πηγή	468 (100%)	0	0	0	0	468 (100%)
Μεταλλικό νερό; Μη-ανθρακούχο	764 [96,9%]	13 [1,7%]	0	5 [0,6%]	6 [0,8%]	788 [100%]
Μεταλλικό νερό; ανθρακούχο	150 [100%]	0	0	0	0	150 [100%]
Άλλα εμφιαλωμένα νερά	1405 [99,4%]	7 [0,5%]	2 [0,1%]	0	0	1414 [100%]
Σύνολο	2787 [98,8%]	20 [0,7%]	2 [0,1%]	5 [0,2%]	6 [0,2%]	2820 [100%]

*CFU: Μονάδες Σχηματιζόμενων Αποικιών

1.2.1 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ - ΔΕΙΚΤΕΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΤΟΥ ΝΕΡΟΥ

Οι διάφορες μικροβιολογικές αναλύσεις του νερού έχουν ως στόχο την απομόνωση και τον προσδιορισμό των παθογόνων μικροοργανισμών που βρίσκονται σε αυτό. Επειδή όμως η αναγνώριση του κάθε μικροοργανισμού παρουσιάζει τεχνικές δυσκολίες και επειδή ο αριθμός των παθογόνων μικροοργανισμών σε σχέση με άλλους μικροοργανισμούς είναι πολύ

μικρός, για τον προσδιορισμό της πιθανότητας που έχει το νερό να μεταδώσει ασθένειες χρησιμοποιούνται οργανισμοί που ονομάζονται μικροβιακοί δείκτες. Αυτοί οι δείκτες οργανισμοί είναι μικροοργανισμοί, η ύπαρξη των οποίων στο νερό επιβεβαιώνει μόλυνση στο νερό. Ενδέχεται αυτοί οι δείκτες να συνοδεύονται από παθογόνους μικροοργανισμούς, οι ίδιοι όμως δεν είναι απαραίτητα παθογόνοι.

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Κοινοτική Οδηγία 98/93/EC (EU, 1998) για τα πόσιμα νερά, μικροοργανισμοί δείκτες θα πρέπει συνήθως να παρακολουθούνται στα πόσιμα νερά, με στόχο να ελέγχουν την μικροβιακή ποιότητα του νερού στα δημόσια συστήματα διανομής νερού. Η Γερμανική (TrinkwV 2001) και η Ισπανική κατευθυντήρια γραμμή για το πόσιμο νερό (Real Decreto 140/2003, 2003), ορίζουν ότι καμία *E. coli*, *enterococci*, και κολοβακτηρίδια δε θα πρέπει να είναι παρόντα σε 100 ml πόσιμο νερό.

Ο ιδανικός οργανισμός-δείκτης πρέπει να έχει τα παρακάτω χαρακτηριστικά : 1) οι μέθοδοι ανίχνευσης του να είναι εφαρμόσιμες σε όλα τα νερά, 2) να συνυπάρχει με άλλα παθογόνα είδη, 3) να έχει υψηλή συγκέντρωση σε σχέση με τα παθογόνα είδη, 4) η συγκέντρωσή του να είναι ανάλογη με το βαθμό ρύπανσης, 5) να έχει χρόνο ζωής παραπλήσιο με τα παθογόνα είδη, 6) να μην υπάρχει σε καθαρά νερά, 7) να είναι εύκολα ανιχνεύσιμος, 8) να έχει σταθερά βιοχημικά χαρακτηριστικά για ανίχνευση, 9) να είναι αβλαβής.

Τα κριτήρια αυτά δεν ικανοποιούνται από καμιά ομάδα ή είδος μικροοργανισμών. Πιο κοντά στην ικανοποίηση των προαναφερθέντων προϋποθέσεων βρίσκονται τα κολοβακτηρίδια. Αυτά περιλαμβάνουν όλα τα αερόβια και προαιρετικά αναερόβια, αρνητικά κατά Gram, μη σχηματίζοντα σπόρια βακτήρια, τα οποία έχουν την δυνατότητα να προκαλούν ζύμωση της λακτόζης με ταυτόχρονη παραγωγή οξέος και αερίου μέσα σε 48 ώρες στους 35 °C.

Υπάρχουν όμως και μειονεκτήματα με την χρήση των κολοβακτηριδίων ως δεικτών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αναπτύσσονται στο νερό και μπορούν να ενσωματωθούν στην μικροβιακή χλωρίδα του. Η ανίχνευση τους τότε δίνει “ψευδή θετικά” τεστ. Ψευδή θετικά τεστ μπορεί να δώσουν και τα βακτήρια του γένους *Aeromonas*, τα οποία μιμούνται τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των κολοβακτηριδίων. Έχει βρεθεί ότι πολλοί παθογόνοι οργανισμοί έχουν χρόνο ζωής μεγαλύτερο από τον χρόνο των κολοβακτηριδίων (Μήτρακας Μ., 2000).

1.2.2 ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΠΟΣΙΜΟΥ ΝΕΡΟΥ

Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι δείκτες είναι τα ολικά κολοβακτηριοειδή, η *E.coli*, οι Εντερόκοκκοι, το *Cl. perfringens*, οι κοινοί μεσόφιλοι μικροοργανισμοί και η *P. aeruginosa*.

Ολικά κολοβακτηριοειδή: Ανήκουν στην οικογένεια των Εντεροβακτηριακών. Τυπικά γένη συναντώμενα στα δίκτυα νερού είναι τα *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Klebsiella*. Δεν θεωρούνται σαν ειδικοί δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης του νερού, δεδομένου ότι πολλά είδη είναι περιβαλλοντικής προέλευσης (έδαφος, φύλλα κ.λ.π.) Παρέχουν ενδείξεις για άλλης προέλευσης μικροβιακής μόλυνσης του νερού, συμπληρώνοντας έτσι τα στοιχεία που παρέχονται από άλλες παραμέτρους. Αποτελούν ενδεικτική παράμετρο.

***E.coli*:** Ανήκει στα κολοβακτηριοειδή, συνεπώς είναι μέλος της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών και θεωρείται ο βασικός δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης, τόσο του πρωτογενούς, όσο και του κατεργασμένου νερού. Η *E.coli* αποτελεί μόνιμο ξενιστή του εντέρου των ανθρώπων και των θερμόαιμων ζώων, όπου μπορεί να υπάρχει σε μεγάλους αριθμούς (μέχρι και 10^9 /gr κοπράνων) και μπορεί να αντιπροσωπεύει το 95% των Εντεροβακτηριακών που ανευρίσκονται στα κόπρανα. Τα χαρακτηριστικά επιβίωσης και η ευαισθησία της στα απολυμαντικά είναι όμοια με εκείνα πολλών παθογόνων μικροβίων, ιδιαίτερα δε με την Σαλμονέλλα και την Σιγκέλλα. Λόγω των ιδιοτήτων αυτών, η *E.coli* είναι ο καλύτερος βιολογικός δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης του νερού. Η απομόνωση της από δείγματα νερού, αποδεικνύει πέρα από κάθε αμφιβολία την πρόσμειξη του νερού με περιττωματικές ουσίες, υποδηλώνοντας ότι και οποιοσδήποτε άλλος μικροοργανισμός που τυχόν βρίσκεται στο έντερο των ανθρώπων και των ζώων μπορεί να εισχωρήσει στο νερό και κατ' επέκταση και παθογόνοι μικροοργανισμοί, επισημαίνοντας τους δυνητικούς κινδύνους μετάδοσης λοιμωδών νοσημάτων.

Εντερόκοκκοι: Ανήκουν στην οικογένεια των Στρεπτοκόκκων, στην ομάδα των D κατά Lancefield. Αποτελούνται από διάφορα είδη που υπάρχουν στα κόπρανα ανθρώπων και θερμόαιμων ζώων. Στα κόπρανα ανθρώπων οι εντερόκοκκοι σπανίως υπερβαίνουν τους 10^6 /gr, ενώ στα κόπρανα των ζώων υπάρχουν σε μεγαλύτερο αριθμό από την *E.coli*. Σπανίως πολλαπλασιάζονται στο νερό και παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στα περιβαλλοντικά stress και στην χλωρίωση από την *E.coli*. Η παρουσία τους αποτελεί απόδειξη μόλυνσης του ύδατος με περιττωματικές ουσίες και δη παλαιότερης μόλυνσης. Ο κύριος λόγος αναζήτησης τους είναι η εκτίμηση της σημασίας της παρουσίας Ολικών

Κολοβακτηριοειδών επί απουσίας *E.coli* καθώς και η παροχή συμπληρωματικών πληροφοριών για την εκτίμηση της έκτασης πιθανής κοπρανώδους μόλυνσης.

***Cl. perfringens* (βλαστικές μορφές και σπόροι).** Αποτελεί είδος του γένους των θειοαναγωγικών κλωστηριδίων. Παράγει σπόρους ανθεκτικούς στο περιβάλλον που επιζούν στο νερό και στο περιβάλλον για πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από την *E.coli*. Στα κόπρανα ανευρίσκεται σε πολύ μικρότερους αριθμούς από ότι η *E.coli* και ο εντερόκοκκος. Ως εκ τούτου είναι λιγότερο ευαίσθητος δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης. Αναζητείται όταν το νερό προέρχεται ή επηρεάζεται από επιφανειακά νερά. Χρησιμοποιείται σαν δείκτης ελέγχου της αποτελεσματικότητας της επεξεργασίας του νερού. Σε περίπτωση μη τήρησης της παραμετρικής αυτής τιμής θα πρέπει να εξετάζεται η παροχή νερού για να εξασφαλισθεί ότι δεν υπάρχει ενδεχόμενος κίνδυνος για την ανθρώπινη υγεία λόγω παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών όπως π.χ. Κρυπτοσπορίδιο.

Pseudomonas aeruginosa: Βρίσκεται στα κόπρανα των ανθρώπων, αλλά σε μικρότερη ποσότητα από ότι τα κολοβακτηριοειδή. Είναι ευκαιριακά παθογόνος μικροοργανισμός και δεν συνιστάται η αναζήτηση του σε επίπεδο ρουτίνας. Έχει σημασία όμως για τα εμφιαλωμένα νερά και για νερά ειδικών περιπτώσεων (νοσοκομειακά, παραγωγή φαρμάκων, κολυμβητικές δεξαμενές, spa κ.λ.π.).

Ολικός αριθμός κοινών αερόβιων μικροβίων στους 37 °C και 22 °C . Η παράμετρος αυτή, δεν παρέχει ακριβή στοιχεία για τη μικροβιολογική ποιότητα του νερού, δίνει όμως σημαντικές πληροφορίες ως προς τη σταθερότητα της ποιότητας του, καθώς και της αποτελεσματικότητας της χλωρίωσης και της σωστής λειτουργίας του υδραγωγείου. Αυξομειώσεις του ολικού αριθμού της τάξεως 1-2 λογαρίθμων αποτελούν ένδειξη επιμόλυνσης η οποία χρήζει περαιτέρω διερεύνησης (προβλήματα στη μονάδα επεξεργασίας του νερού, ανάπτυξη βιολογικού υμενίου στο δίκτυο, επιμόλυνση της πηγής υδροληψίας κ.λ.π).

2. ΨΕΥΔΟΜΟΝΑΔΕΣ

Το γένος των ψευδομονάδων αποτελεί την πλέον ποικιλόμορφη και οικολογικά σημαντική ομάδα βακτηρίων στον πλανήτη (Spiers et al., 2000). Μορφολογικά, οι ψευδομονάδες περιγράφονται ως Gram αρνητικά βακτηρίδια, που δεν παράγουν σπόρια, κινούνται με μια ή περισσότερες πολικές βλεφαρίδες και έχουν σώμα ευθύ ή ελαφρά κεκαμμένο (Αρσένη Α., 1996). Τα χαρακτηριστικά αυτά όμως είναι κοινά γνωρίσματα πολλών βακτηρίων και δεν αποτελούν ιδιαίτερα κριτήρια στην απομόνωση και ταυτοποίηση των ψευδομονάδων.

2.1 ΡΟΛΟΣ ΣΤΗ ΦΥΣΗ

Οι ψευδομονάδες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη βιόσφαιρα, στη διατήρηση της φυσικής ισορροπίας και κατ' επέκταση στην ανθρώπινη οικονομία. Αίτιο της σημαντικότητάς τους είναι ο ρόλος-κλειδί που κρατούν στον κύκλο του άνθρακα. Έχουν την ικανότητα να παράγουν ένζυμα που υπεισέρχονται στον καταβολισμό οργανικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους. Ουσίες όπως αρωματικοί και αλειφατικοί υδρογονάνθρακες, ακόμα και συνθετικά χημικά γεωργικών και βιομηχανικών δραστηριοτήτων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα οξειδωτικής διάσπασης από τις ψευδομονάδες.

Τα είδη της ψευδομονάδας βρίσκονται παρόντα στη φύση και σε αφθονία στο νερό, στο έδαφος και στα φυτά. Πολλά είδη είναι μεταβολικώς ευέλικτα και ένας μεγάλος αριθμός οργανικών ενώσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα και ενέργειας (Romling et al., 1994). Αυτή η ευελιξία τα επιτρέπει να είναι παρόντα στην φυσική αυτόχθονη μικροχλωρίδα σε διάφορα περιβάλλοντα, με αυξημένη την ικανότητα για βιοαποικοδόμηση πιθανών ρύπων του περιβάλλοντος (Rossello-Mera et al., 1994).

2.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Το γένος των ψευδομονάδων περιγράφηκε από τον Migula το 1894. Το τυπικό είδος *P. aeruginosa* απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον άνθρωπο στο «κυανούν πύον» κατά το 1882 από τον Gessard και χαρακτηρίστηκε ως παθογόνο βακτήριο από τον Charrin το 1890. Αργότερα ο Migula (1895) κατέταξε τον *Bacillus pyocyaneus* του Gessard στο γένος των ψευδομονάδων υπό το όνομα *Pseudomonas pyocyanea*. Σήμερα αποκαλείται *Pseudomonas aeruginosa* προς τιμήν του Schroeter, ο οποίος πρώτος περιέγραψε το μικρόβιο υπό το όνομα *Bacterium aeruginosum* (1872).

Έως σήμερα, περισσότερα από 160 είδη ψευδομονάδων έχουν διαχωριστεί και ταυτοποιηθεί αλλά λίγα (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes* και *P. pseudoalcaligenes*) ενδιαφέρουν την Κλινική Μικροβιολογία ως αποικιστές του ανθρωπίνου σώματος, ως συμπαράγοντες νόσων ή ως καθαρά παθογόνοι παράγοντες. Τα διάφορα στελέχη *P. 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 G.B. and Thomas M.D., 1982).

Οι μοριακές αναλύσεις έχουν αναθεωρήσει την ταξινόμησή τους και πολλά είδη έχουν καταταχιστεί σε νέα γένη όπως *Burkholderia*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Methylobacterium*, *Shewanella*, *Sphingobacterium* και *Stenotrophomonas*. Όλα τα παραπάνω γένη υπάγονται στην οικογένεια *Pseudomonadaceae* και κατατάσσονται σε 5 ομάδες με βάση την ομολογία του rRNA τους. Κάθε ομάδα περιλαμβάνει υποομάδες σύμφωνα με την ομολογία του rRNA των μελών της (Πίνακας 2).

Το γένος *Pseudomonas* αποτελεί την rRNA ομάδα I και περιλαμβάνει 3 επιμέρους ομάδες: Την ομάδα *fluorescent*, τα μέλη της οποίας χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να παράγουν τη χρωστική πυοβερντίνη, η οποία φθορίζει κάτω από υπεριώδες φως με μήκος κύματος 400nm. Από τα τρία είδη της ομάδας μόνο η *P. aeruginosa* παράγει τη χαρακτηριστική κυανή, υδατοδιαλυτή χρωστική πυοκυανίνη. Την ομάδα *stutzeri*, η οποία χαρακτηρίζεται από την ικανότητά των μελών της να αναπτύσσονται αναερόβια σε υλικά που περιέχουν νιτρικά άλατα, παράγοντας οξείδιο του αζώτου. Τέλος, την ομάδα *alcaligenes*, η οποία περιλαμβάνει είδη που δεν μπορούν να διασπάσουν τη γλυκόζη σε υλικό οξειδωσης – ζύμωσης της γλυκόζης (Oxidative - Fermentative glucose medium).

rRNA Group I	rRNA Group III
Fluorescent Group	Acidovorans Group
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Comamonas acidovorans</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Comamonas terrigena</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Comamonas testosterone</i>
Stutzeri Group	Facilis-delafieldii Group
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Acidovorax delafieldii</i>
<i>Pseudomonas mendocina</i>	<i>Acidovorax facilis</i>
CDC Group Vd-3	<i>Acidovorax temperans</i>
Alcaligenes Group	
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	
<i>Pseudomonas species group I</i>	rRNA Group IV
rRNA Group II	Diminuta Group
Pseudomallei Group	<i>Brevundimonas diminuta</i>
<i>Burkholderia mallei</i>	<i>Brevundimonas vesicularis</i>
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	rRNA Group V
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Burkholderia gladioli</i>	Unknown Nucleic Acid Homology
<i>Burkholderia pickettii</i>	<i>Chryseomonas luteola</i>
	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>
	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
	<i>Shewanella putrefaciens</i>
	<i>Pseudomonas-like group 2</i>
	CDC group WO-I

Πίνακας 2. Ταξινόμηση των ψευδομονάδων σε πέντε ομάδες με βάση την ομολογία του ριβοσωμικού RNA (Palleroni et al., 1973).

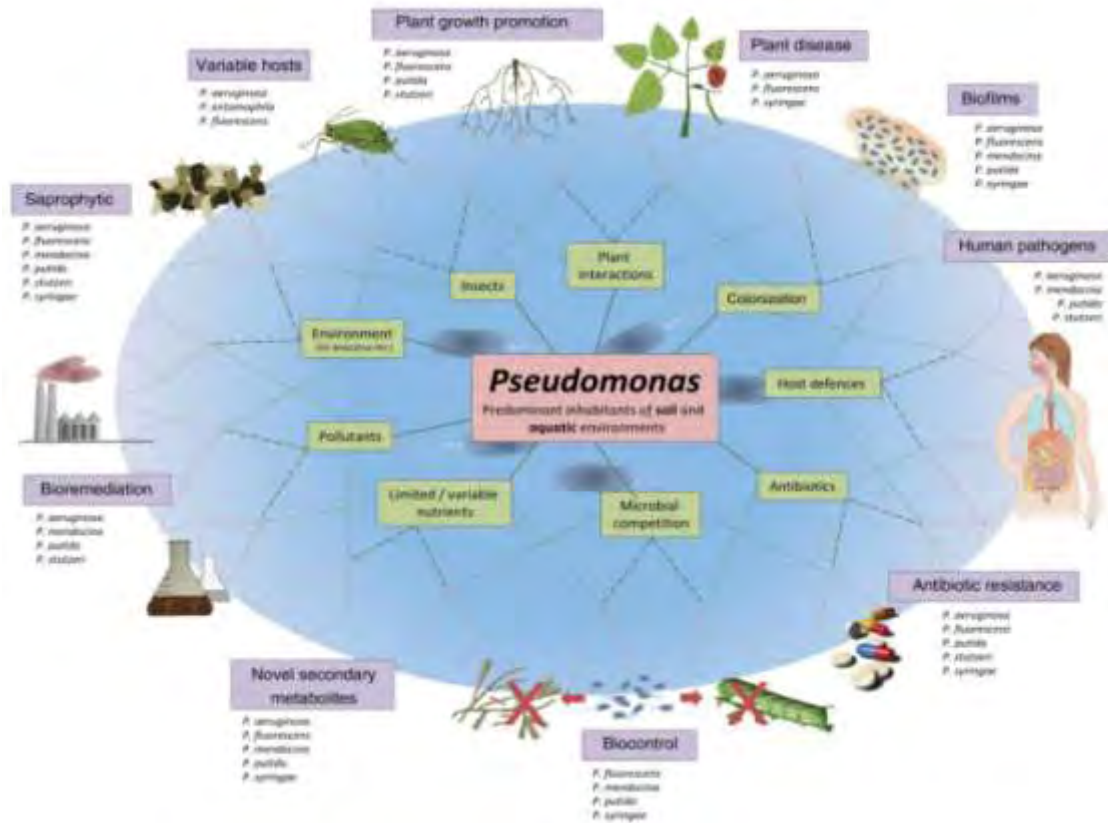
2.3 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

2.3.1 ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ

Ψευδομονάδες έχουν απομονωθεί από αρκετά, διαφορετικού τύπου περιβάλλοντα (Εικόνα 1) : χώμα (Amy et al., 1992, Sørensen et al., 1992, Haase et al., 1995a.), νερό (Elomari et al., 1995, Morais et al., 1997), φυτά (Li et al., 1993, Smith et al., 1994, Clerc et al., 1998), λύματα (Geuenich H.H and Muller H.E., 1984, Sallal et al., 1989) και από τον πεπτικό σωλήνα ανθρώπων και κατοικίδιων ζώων (Rhame F.S., 1980).

Η *Pseudomonas aeruginosa* μπορεί να ευδοκιμήσει σε διάφορα περιβαλλοντικά διαμερίσματα, όπως εμφιαλωμένο νερό και νερό βρύσης (Pellett et al., 1983; Hunter P.R., 1993; Romling et al., 1994; Ganguli A. and Tripathi A.K., 1999; Aoi et al., 2000), λύματα (Filali et al., 2000), ποτάμια, θάλασσες (Pellet et al., 1983; Kimata et al., 2004); έδαφος (Cavalca et al., 2000); επαγγελματικούς χώρους όπως υγρά επεξεργασίας μετάλλων (Karadzic et al., 2006); κλινικές (Wolfgang et al., 2003); νοσοκομειακά και αστικά λύματα (Schwartz et al., 2006); και βιομηχανικά απόβλητα (Karadzic et al., 2006). Η *P. aeruginosa* έχει βρεθεί σε μη επεξεργασμένο-εμφιαλωμένο μεταλλικό νερό (Hunter P.R., 1993; Naze et al., 2010), σε νερό βρύσης (Trautmann et al., 2001) και σε συστήματα διανομής νερού (Emde et al., 1992). Η ευκολία με την οποία αποικίζει διάφορα νοσοκομειακά ενδαιτήματα επιτρέπει να την συναντούμε σε βρύσες, αποχετεύσεις, και σωλήνες νερού νοσοκομείων. Παράλληλα μπορούν να αποικίσουν τόσο τα φυτά (Green et al., 1974; Morales et al., 1996) όσο και τα ζώα (Marlier et al., 2000; Martin Barrassa et al., 2000; Lashev L. and Lasarova S., 2001).

Η παγκόσμια κατανομή των ψευδομονάδων υποδεικνύει αξιοσημείωτη προσαρμοστικότητα όσον αφορά στη φυσιολογία και τη γενετική αυτών των μικροοργανισμών σε αρκετά μεγάλο βαθμό (Spiers et al., 2000). Η προσαρμοστικότητα των ψευδομονάδων οφείλεται στις λιγοστές τους διατροφικές απαιτήσεις, το μεγάλο αριθμό οργανικών ενώσεων που μπορούν να χρησιμοποιήσουν ως πηγή ενέργειας και την ποικιλότητα στο μεταβολισμό τους που εκτείνεται από αυτοτροφία έως λιθοτροφία (Todar K., 2004a). Ως επακόλουθο οι ψευδομονάδες επικρατούν στο χώμα και στο νερό υπό αερόβιες, μεσόφιλες και ουδέτερες συνθήκες. Συνήθως ευρίσκεται στα κόπρανα, το έδαφος, το νερό και τα απόβλητα αλλά δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης διότι δεν ανευρίσκεται αποκλειστικά στα κόπρανα και τα απόβλητα. Μπορεί να πολλαπλασιαστεί σε πλούσια σε οργανικές ύλες υδάτινα συστήματα και στην επιφάνεια οργανικών υλών που διαβρέχονται από νερό.



Εικόνα 1. Εύρος βακτηρίων *Pseudomonas spp.* (Silby et al., 2011)

Σημαντικά παθογόνα που σχετίζονται με μόλυνση οικιακών υδραυλικών εγκαταστάσεων είναι η *Pseudomonas aeruginosa* και η *Legionella pneumophila* (Eboigbodin et al., 2008; Keevil C.W., 2002). Τα βακτήρια της *P. aeruginosa* εμφανίζονται σποραδικά σε συστήματα διανομής πόσιμου νερού, για παράδειγμα σαν αποτέλεσμα μόλυνσης κατά τη διάρκεια κατασκευαστικών εργασιών (Clark et al., 1982; Hambsch et al., 2004), αλλά πιο συχνά εμφανίζονται στις οικιακές υδραυλικές εγκαταστάσεις σε σύγκριση με το δίκτυο ύδρευσης (Wingender et al., 2009). Σε πόσιμο νερό η *P. aeruginosa* παρατηρείται να είναι ενίοτε παρούσα (Emtiazzi et al., 2004; Kilb et al., 2003; Lee D.G. and Kim S.J., 2003).

Σε συστήματα κρύου νερού, είδη ψευδομονάδων αποτελούν τους πιο συχνά εμφανιζόμενους παράγοντες μικροβιακής μόλυνσης, ενώ αντίθετα σε ζεστά νερά είδη ψευδομονάδων ανιχνεύονται σπάνια (S. Volker et al., 2010). Άλλες μελέτες αντίθετα, έδειξαν ότι συστήματα με ζεστά νερά μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη βακτηρίων, όπως η *E. coli*, η *P. aeruginosa*, είδη *Aeromonas sp* και *Legionella spp.* (Legnani et al., 1999; Leclerc et al., 2002). Οι ψευδομονάδες έχουν την ικανότητα να αντέχουν και σε ακραίες συνθήκες,

λόγου χάριν μπορούν να αναπτυχθούν ακόμα και σε θερμοκρασία 42°C (Drenkard E. and Ausubel F.M., 2002; Hardalo C. and Edberg S.C., 1997; Schwartz et al., 2003).

Συνήθως, τα υπόγεια νερά υποτίθεται πως έχουν από βιολογικής απόψεως καλύτερη ποιότητα υδάτων σε σχέση με τα επιφανειακά νερά, αλλά απεδείχθη πως κάποιες ασθένειες έχουν κάλλιστα μεταφερθεί από μολυσμένα υπόγεια ύδατα (Craun G., 1985; Scandura J.E. and Sobsey M.D., 1997; Ritter et al., 2002).

2.3.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ-ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η *P. aeruginosa* (Εικόνα 2) (*Pseudomonas*: ψευδής μονάς, *aeruginosa*: πρασινάδα χαλκού), είναι ένα Gram αρνητικό, μη σπορογόνο, μη ελυτροφόρο βακτηρίδιο μήκους 1.5-5 μm και διαμέτρου 0.5-1 μm. Τα κύτταρά της διατάσσονται μεμονωμένα, σε ζεύγη ή σε μικρές αλυσίδες. Είναι κινητό βακτήριο και αυστηρά αερόβιο δηλ. χρησιμοποιεί το O₂ ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να χρησιμοποιήσει τα νιτρικά ως εναλλακτικό δέκτη ηλεκτρονίων και με τον τρόπο αυτό να αναπτύσσεται αναερόβια. Το 90% περίπου των στελεχών φέρουν μια πολική βλεφαρίδα. 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 αυτή η ιδιότητα χρησιμοποιείται για το χαρακτηρισμό του είδους.

Καταστρέφεται στην θερμοκρασία των 55°C σε μια ώρα. Αντέχει και ζεί στο νερό για πολλούς μήνες. Διατηρείται και πολλαπλασιάζεται στις μικρές υγρές συλλογές και στις υγρές επιφάνειες, στα διάφορα θεραπευτικά υγρά, ακόμα και στα διαλύματα των περισσότερων αντισηπτικών ουσιών. Διατηρείται στη θερμοκρασία του κοινού ψυγείου. Είναι ευαίσθητη στις ενώσεις αργύρου, αλλά όλα τα στελέχη της είναι ανθεκτικά στο ιώδιο και αντέχουν στη φυσική βακτηριοκτόνο δράση του ορού (Αρσένη Α., 1994).

Όλα τα στελέχη παράγουν καταλάση και οξειδάση. Δε ζυμώνει τη γλυκόζη, ενώ τη διασπά οξειδωτικά, χωρίς παραγωγή αερίου, επειδή περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις κυττοχρωματικής οξειδάσης, δε διασπά τη λακτόζη ή τη μαλτόζη, ενώ δεν παράγει H₂S. 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. Επιζεί στο χλωριωμένο νερό, στα απολυμαντικά, σε φάρμακα και αποστειρωμένα διαλύματα όπως το απεσταγμένο νερό, οφθαλμικά διαλύματα κ.α. Πολύ καλύτερα αναπτύσσεται σε υγρό και θερμό περιβάλλον και έτσι το νοσοκομειακό περιβάλλον παρέχει απεριόριστες εστίες αναπτύξεως του μικροοργανισμού.



Εικόνα 2. *Pseudomonas aeruginosa*

2.3.3 ΑΠΟΙΚΙΕΣ

Όταν η *P. aeruginosa* 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 1-5 mm. Στο αιματούχο άγαρ πολλά στελέχη προκαλούν β-αιμόλυση. Στο McConkey άγαρ παρατηρούνται άχρωμες αποικίες διότι το βακτηρίδιο δε διασπά τη λακτόζη. Τα τρυβλία με στελέχη *P. aeruginosa* που παράγουν πυοκυανίνη (Εικόνα 3) αποκτούν πράσινο σκούρο σχετικά χρώμα και μια ευχάριστη μυρωδιά φρούτου ή τσαγιού βουνού. Ένας άλλος τύπος αποικιών εμφανίζεται κυρίως σε στελέχη που απομονώνονται από τα πτύελα ασθενών με ινοκυστική νόσο του παγκρέατος. Οι αποικίες είναι σχετικά μεγάλες και πολύ βλενωδείς και είναι δύσκολη η παραλαβή μεμονωμένων αποικιών. Μετά από συνεχείς ανακαλλιέργειες παρατηρείται ελάττωση της ικανότητας παραγωγής βλέννης ή και απώλεια αυτής, με αποτέλεσμα την παραγωγή μακροσκοπικά μη βλενωδών αποικιών των καλούμενων revertant (Govan J.R.W. and Fyfe J.A.M., 1975).



Εικόνα 3. Καλλιέργεια *P. aeruginosa* σε τρυβλίο McConkey. Παραγωγή πυοκυανίνης

2.3.4 ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

2.3.4.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Η συγκέντρωση του βακτηρίου αποτελεί δείκτη της καλής κατάστασης ενός δικτύου διανομής καθώς και της καλής ποιότητας του εμφιαλωμένου νερού. Το συχνότερο είδος ψευδομονάδας που προκαλεί νόσο στον άνθρωπο είναι η *Pseudomonas aeruginosa*. 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.

Το νερό που προορίζεται για πόσιμο, δρά σαν φορέας μετάδοσης λοιμώδων νοσημάτων. Οι σημαντικότερες ασθένειες είναι οι εντερολοιμώξεις, ο τυφοειδής πυρετός, η δυσεντερία, η χολέρα, η ηπατίτιδα και οι παρασιτιάσεις (Μήτρακας Μ., 2000). Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ο κύριος παράγοντας που οδηγεί σε εξωτερική ωτίτιδα (Reid T.M. and Porter I.A., 1981), σε θυλακίτιδα (Chandrasekar et al., 1984) και αποτελεί κοινή αιτία ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων και αναπνευστικής δυσχέρειας (Cobben et al., 1996). Είναι υπεύθυνο βακτήριο για διάφορες σοβαρές λοιμώξεις συμπεριλαμβανομένων της σηψαιμίας, πνευμονίας, ενδοκαρδίτιδας, ωτίτιδας και κερατίτιδας (Todar K., 2004b). Άλλες ασθένειες που προκαλεί είναι βακτηριαμία (Todar K., 2004b), λοιμώξεις του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (Todar K., 2004b), οφθαλμών (Bukanov et al., 1994), οστών και συνδέσμων, γαστρεντερικού σωλήνα, ουροποιητικού συστήματος, του δέρματος και των μαλακών ιστών (Todar K., 2004b).

Η ικανότητα αυτής της ψευδομονάδας να αποικίζει διάφορους περιβαλλοντικούς χώρους και να έρχεται σε επαφή με πληθυσμό με εξασθενημένο ανοσοποιητικό έχει ως

συνέπεια να είναι η αιτία διαφόρων εξωνοσοκομειακών λοιμώξεων κάθε χρόνο (Lavenir et al., 2007). Σημαντική αιτία της επικράτησης των ψευδομονάδων ως δυνητικά παθογόνα είναι η προσαρμοστικότητα τους ως προς τις διατροφικές τους συνήθειες. Οι ψευδομονάδες μπορούν να επιβιώνουν επί μακρόν σε πολύ διαφορετικά περιβάλλοντα λόγω του πλούσιου ενζυμικού τους συστήματος που τους επιτρέπει να συνθέτουν τις απαραίτητες ενώσεις για τη διατροφή και το μεταβολισμό τους από τις απλούστερες ενώσεις που βρίσκουν στο περιβάλλον (Αρσένη Α., 1996).

Οι λοιμώξεις από την *Pseudomonas aeruginosa* αποτελούν τον πρωτεύον και σημαντικότερο λόγο νοσηρότητας και θνησιμότητας σε ανθρώπους με την γενετική ασθένεια της κυστικής ίνωσης (West et al., 2002). Η έγκαιρη ανίχνευση της *P. aeruginosa* σε ασθενείς με κυστική ίνωση είναι υψίστης σημασίας, λόγω του ότι επιθετική αντιμικροβιακή θεραπεία ίσως εξαλείφει την *P. aeruginosa* στα πρώιμα στάδια της και καθυστερεί τον χρόνο αποικισμό από αυτήν (Frederiksen et al., 1997, Griese et al., 2002, Littlewood et al., 1985, Ratjen et al., 2001, Wiesemann et al., 1998, Valerius et al., 1991). Οι ασθενείς αυτοί συχνά αναπτύσσουν χρόνια πνευμονία μετά από έκθεση στο βακτήριο (Granstrom et al., 1984; Armstrong et al., 1995; Quittner et al., 2009).

Κατανάλωση πόσιμου νερού και εισπνοή αερολυμάτων εμπλέκονται ως πηγές λοιμώξεων και δικαιολογούν την αυξημένη εμφάνιση της *P. aeruginosa*. Οι ασθενείς που μολύνθηκαν με αυτή την ψευδομονάδα παρουσίασαν τους ίδιους γονότυπους που ανιχνεύθηκαν σε νερό βρύσης (Bert et al., 1998; Trautmann et al., 2001). Το πρόβλημα λύθηκε ύστερα από την αλλαγή των υδραυλικών εγκαταστάσεων (Ferroni et al., 1998). Στην περίπτωση της έκθεσης από αέρα, σημειώθηκε ενδονοσοκομειακή αποίκιση της *P. aeruginosa*, ενώ λοιμώξεις παρατηρήθηκαν σε αναπνευστικά υποστηριζόμενους ασθενείς με μηχανικό τρόπο (Doring et al., 1991; Berhelot et al., 2001; Valles et al., 2004).

Η συγκέντρωση χημικών και μικροοργανισμών στο πόσιμο νερό μπορεί αισθητά να αυξηθεί, εάν το νερό παραμένει στάσιμο για μεγάλο χρονικό διάστημα (ASHRAE Standard, 2000; Nawrocki et al., 2010). Μοναδική λύση, για να μειωθεί ο κίνδυνος ασθενειών για τους καταναλωτές, αποτελεί ο εκσυγχρονισμός του συστήματος σωληνώσεων.

Θα πρέπει να γίνει αντιληπτό ότι η *P. aeruginosa* είναι ένα θανατηφόρο παθογόνο βακτηρίδιο που προκαλεί λοιμώξεις με ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας σε νοσοκομειακούς ασθενείς, όπως για παράδειγμα 34% σε βακτηραιμία, 50% σε βακτηραιμία ουδετεροπενικών ασθενών, 45% σε βακτηριαμική νοσοκομειακή πνευμονία και 69% σε πνευμονία ασθενών με μηχανική υποστήριξη της αναπνοής (Siegman-Igra et al., 1998, Bodey et al., 1985, Brewer et al., 1996, Rello et al., 1997). Η *P. aeruginosa* είναι μία από τις τρεις επικρατέστερες δυνητικές αιτίες πρόκλησης μολυσματικών ασθενειών σε ανθρώπους (Stover

et al., 2000), ενώ προκαλεί ασθένειες και σε φυτά, γεγονός που υποδεικνύει τη δυσκολία διάκρισης μεταξύ φυτοπαθογόνων και κλινικών ψευδομονάδων (Todar K., 2004a).

Σύμφωνα με το CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA), η ολική επίπτωση των φλεγμονών από *P. aeruginosa* σε νοσοκομεία των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής είναι κατά μέσο όρο περίπου 0,4%, και το βακτήριο είναι το τέταρτο πιο συχνά ευρισκόμενο νοσοκομειακό παθογόνο και υπεύθυνο για το 14% του συνόλου των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων (CDC). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ένας από τους πιθανούς λόγους που οι ψευδομονάδες άρχισαν να επικρατούν, από τον περασμένο αιώνα, ως μία από τις κυριότερες δυνητικές αιτίες ασθενειών, είναι η ανθεκτικότητά τους σε αντιβιοτικά και απολυμαντικά (Stover et al., 2000).

Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η απλή και ταχεία μέθοδος ανίχνευσης της *P. aeruginosa* είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική προστασία της Δημόσιας Υγείας. Αυτό έχει ιδιαίτερη βάση ειδικά στα νοσοκομεία και στις κλινικές όπου υπάρχει μεγάλος κίνδυνος ανάπτυξης και εξάπλωσης της μόλυνσης σε “ευαίσθητα” άτομα. Μια πιο πρακτική και γρήγορη σε αποτελέσματα μέθοδος θα οδηγήσει στην έγκαιρη διάγνωση, μειώνοντας τον κίνδυνο λοιμώξεων και έκθεσης των ανθρώπων σε ψευδομονάδες.

2.4 ΨΕΥΔΟΜΟΝΑΔΑ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

2.4.1 ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑΚΕΣ ΕΠΙΔΗΜΙΕΣ ΥΔΑΤΟΓΕΝΟΥΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

Μικροοργανισμοί που έχουν ενοχοποιηθεί για νοσοκομειακές επιδημίες και έχουν απομονωθεί από το υδάτινο περιβάλλον του νοσοκομείου είναι:

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Stenotrophomonas maltophilia*
- *Aeromonas hydrophila*
- *Enterobacter cloacae*
- *Flavobacterium meningosepticum*
- *Serratia marcescens*
- Άλλα είδη *Pseudomonas*
- *Legionella*

Σύμφωνα με το Medline[®], καταγράφηκαν 43 επιδημίες νοσοκομειακών λοιμώξεων υδατογενούς προέλευσης κατά την περίοδο 1966-2001. Ακολουθεί πίνακας (Πίνακας 3) με τον μικροοργανισμό που ενοχοποιήθηκε για την επιδημία, τα όργανα που μολύνθηκαν, τη μέθοδο ταυτοποίησης που χρησιμοποιήθηκε και την αντοχή σε αντιβιοτικά που επέδειξε (Anaissie et al., 2002).

ΒΑΚΤΗΡΙΟ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ	ΠΛΗΓΕΝΤΑ ΟΡΓΑΝΑ	ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ	ΑΝΤΟΧΗ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ
<i>P.aeruginosa</i>	Trautman et al. 2001	Αίμα, πνεύμονες, τραχεία, ούρα, περιτόναιο	AP-PCR	Δεν αναφέρεται
<i>P.aeruginosa</i>	Bert et al. 1998	Πνεύμονες, παραρρινικοί κόλποι, ούρα	DNA macrorestriction analysis	Ανθεκτικό
<i>P.aeruginosa</i>	Buttery et al. 1998	Αίμα, κεντρικός φλεβικός καθετήρας, δέρμα, ούρα	PFGE	Ανθεκτικό
<i>P.aeruginosa</i>	Ferroni et al. 1998	Ούρα	PFGE	Δεν αναφέρεται
<i>P.aeruginosa</i>	Ezpeleta et al. 1998	Αίμα	ERIC-PCR, RAPD	Δεν αναφέρεται
<i>P.aeruginosa</i>	Burucou et al. 1995	Δεν αναφέρεται	DNA fingerprinting	Ευαίσθητο
<i>P.aeruginosa</i>	Richard et al. 1994	Αίμα, πνεύμονες, τραύματα	DNA typing, serotyping	Ανθεκτικό
<i>P.aeruginosa</i>	Kolmos et al. 1993	Αίμα	Phage typing, serotyping	Δεν αναφέρεται
<i>P.aeruginosa</i>	Grundmann et al. 1993	Αίμα, τραχεία, εγκεφαλονωτιαίο υγρό.	Genotyping serotyping	Δεν αναφέρεται
<i>P.aeruginosa</i>	Worlitzsch et al. 1989	Ούρα	ExpoA DNA probe	Δεν αναφέρεται

<i>S.maltophilia</i>	Weber et al.1999	Περιτόναιο, αναπνευστικός σωλήνας, δέρμα	PFGE	Ανθεκτικό
<i>S.maltophilia</i>	Verweij et al. 1998	Τραχεία	PFGE	Ανθεκτικό
<i>S.maltophilia</i>	Chachaty et al. 1998	Αίμα, κόπρανα	PFGE	Ανθεκτικό
<i>S.maltophilia</i>	Talon et al.1994	Αίμα, κόπρανα, λαιμός, σύρα	PFGE	Ανθεκτικό
<i>Serratia marcescens</i>	Calyn et al.1998	Μάτι, κόπρανα	PFGE	Δεν αναφέρεται
<i>Acinetobacter baumanni</i>	Pina et al. 1998	Δέρμα, τραύματα	PFGE, biotyping	Δεν αναφέρεται
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Picard and Goulet et al. 1987	Αίμα	Electrophoric esterase typing	Δεν αναφέρεται

Πίνακας 3. Βακτήρια υπεύθυνα για την πρόκληση νοσοκομειακών επιδημιών υδατογενούς προέλευσης κατά την περίοδο 1966-2001 (Anaissie et al., 2002).

Στον Πίνακα 4 αναφέρονται βακτήρια παθογόνα για τους ανθρώπους που μεταδίδονται δια της στοματικής οδού από το νερό μαζί με κάποιες σημαντικές ιδιότητές τους.

ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ	ΣΗΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ	ΕΠΙΜΟΝΗ ΣΤΙΣ ΠΑΡΟΧΕΣ ΝΕΡΟΥ ¹	ΑΝΘΕΚΤΙΚ- ΟΤΗΤΑ ΣΤΗΝ ΧΛΩΡΙΩΣΗ	ΣΧΕΤΙΚΗ ΜΟΛΥΣΜ- ΑΤΙΚΗ ΔΟΣΗ ³	ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΑΡΑΣΙΤΙΣΜΟΥ ΣΕ ΖΩΑ
<i>Campylobacter jejuni, C.coli</i>	ΥΨΗΛΗ	ΜΕΤΡΙΑ	ΧΑΜΗΛΗ	ΜΕΤΡΙΑ	ΝΑΙ
Παθογόνος <i>Escherichia coli</i>	ΥΨΗΛΗ	ΜΕΤΡΙΑ	ΧΑΜΗΛΗ	ΥΨΗΛΗ	ΝΑΙ
<i>Salmonella typhi</i>	ΥΨΗΛΗ	ΜΕΤΡΙΑ	ΧΑΜΗΛΗ	ΥΨΗΛΗ	ΟΧΙ

Άλλες σαλμονέλλες	ΥΨΗΛΗ	ΜΕΓΑΛΗ	ΧΑΜΗΛΗ	ΥΨΗΛΗ	ΝΑΙ
<i>Shigella spp.</i>	ΥΨΗΛΗ	ΜΙΚΡΗ	ΧΑΜΗΛΗ	ΜΕΤΡΙΑ	ΟΧΙ
<i>Vibrio cholerae</i>	ΥΨΗΛΗ	ΜΙΚΡΗ	ΧΑΜΗΛΗ	ΥΨΗΛΗ	ΟΧΙ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ⁴	ΜΕΤΡΙΑ	ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΕΙ	ΝΑ	ΜΕΤΡΙΑ ² ΥΨΗΛΗ(;)	ΟΧΙ
<i>Aeromonas spp.</i>	ΜΕΤΡΙΑ	ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΕΙ	ΝΑ	ΧΑΜΗΛΗ ΥΨΗΛΗ(;)	ΟΧΙ
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ΥΨΗΛΗ	ΜΕΓΑΛΗ	ΧΑΜΗΛΗ	ΥΨΗΛΗ(;)	ΟΧΙ

Πίνακας 4. Παθογόνα βακτήρια στα πόσιμα νερά υπεύθυνα για υδατογενείς λοιμώξεις. (Lightfoot N.F., 2003).

(;) άγνωστο ή αβέβαιο

¹ Περίοδος ανίχνευσης του βακτηρίου σε μολυσματικό επίπεδο στο νερό στους 20°C. Μικρή: μέχρι μία εβδομάδα, μέτρια: μία εβδομάδα έως ένας μήνας, μεγάλη: πάνω από ένα μήνα.

² Ανθεκτικότητα μέτρια: το βακτήριο μπορεί να μην εξαφανισθεί.

³ Δόση που χρειάζεται για να προκληθεί μόλυνση στο 50% υγιών ενήλικων εθελοντών.

⁴ Κύρια οδός μόλυνσης είναι η επαφή με το δέρμα, αλλά μπορεί να προκαλέσει μόλυνση και μέσω της στοματικής οδού στους ανοσοκατεσταλμένους και τους καρκινοπαθείς.

Σε μία μελέτη εκτίμησης κινδύνου (risk assessment), ο Rusin και οι συνεργάτες του υπολόγισαν την πιθανότητα πρόκλησης λοίμωξης από δυνητικά παθογόνα βακτήρια που βρίσκονται στο πόσιμο νερό (1997). Η *Pseudomonas aeruginosa*, το *Acinetobacter* και η *Stenotrophomonas maltophilia* βρέθηκαν να είναι οι κύριες αιτίες ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων με υψηλή θνησιμότητα. Η μολυσματική δόση ενός δυνητικά παθογόνου βακτηρίου είναι μικρότερη στους ανοσοκατεσταλμένους ή όσους υπόκεινται σε χορήγηση αντιβιοτικού (πολλοί εκ των οποίων είναι ανοσοκατεσταλμένοι και λαμβάνουν αντιβιοτικά για προληπτικούς ή θεραπευτικούς σκοπούς). Στην εργασία αυτή αναφέρεται ότι ο κίνδυνος λοίμωξης από κατάποση ήταν 9×10^{-2} και αφορούσε ασθενείς στους οποίους χορηγούντο

αντιβιοτικά και εκτέθηκαν σε υψηλά επίπεδα *P. aeruginosa*. Οι δια στόματος μολυσματικές δόσεις που καθορίστηκαν σε υγιή ζώα και ανθρώπους αναγράφονται στον Πίνακα 5.

Βακτήριο	Μολυσματική δόση (cfu)	Συχνότητα απομόνωσης από το πόσιμο νερό (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10^8 - 10^9	<1-24
<i>Aeromonas hydrophila</i>	$>10^{10}$	1-27
<i>Mycobacterium avium complex</i>	10^4 - 10^7	<1-50
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	10^6 - 10^9	<1-2
<i>Moraxella spp.</i>	;	10-80
<i>Legionella pneumophila</i>	10^5	3-33
<i>Acinetobacter spp.</i>	10^6 - 10^8	5-38

(;) άγνωστο ή αβέβαιο

Πίνακας 5. Μολυσματικές δόσεις και συχνότητα απομόνωσης βακτηρίων από το πόσιμο νερό (Rusin et al., 1997).

Όπως φαίνεται και από τους ανωτέρω πίνακες, αρκετά είδη ψευδομονάδων μπορούν να προκαλέσουν λοιμώξεις σε διάφορα όργανα του ανθρώπινου σώματος. Βέβαια τέτοιου είδους λοιμώξεις απαντώνται συχνότερα σε ανθρώπους με ανεπαρκή ανοσοποιητική ικανότητα. Μία από τις κύριες πηγές μόλυνσης με ψευδομονάδα είναι το υδάτινο περιβάλλον δεδομένου ότι αποτελεί το ευνοϊκό περιβάλλον επιβίωσης και ανάπτυξης του μικροβίου.

Έχουν αναφερθεί αρκετές επιδημίες από ψευδομονάδες όπου το υδάτινο περιβάλλον ενοχοποιήθηκε ως πηγή μόλυνσης (Trautmann et al., 2001, Ferroni et al., 1998, Bert et al., 1998, Farmer et al., 1982, Hsueh et al., 1998, Anaissie et al., 2002, Maschmeyer G. and Braveny I., 2000).

2.4.2 ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΝΕΡΑ ΑΝΑΨΥΧΗΣ

Η *P. aeruginosa* συχνά εμφανίζεται σε νερά αναψυχής (κολυμβητικές δεξαμενές, υδρομασάζ) λόγω της αντοχής της στις υψηλές θερμοκρασίες και στα απολυμαντικά και της ικανότητάς της να αναπτύσσεται ταχέως σε νερά που περιέχουν θρεπτικά συστατικά (Price D. and Ahearn D.G., 1988).

Στις υδρομαλάξεις το κυριότερο θέμα όσον αφορά στη Δημόσια Υγεία από την παρουσία της *P. aeruginosa* είναι η θυλακίτιδα, όπου μόλυνση των θυλάκων της επιδερμίδας με *P. aeruginosa* προκαλεί φλυκταινώδες εξάνθημα (Ratnam et al., 1986). Το εξάνθημα συνήθως εμφανίζεται 48 ώρες μετά την έκθεση και αυτοθεραπεύεται μέσα σε 5 ημέρες. Έχει προταθεί ότι η μολυσματική δόση για υγιή άτομα είναι μεγαλύτερη από 1000 μικροοργανισμούς ανά ml (Price D. and Ahearn D.G., 1988).

Περίπου 127 άτομα ασθένησαν σε 7 επιδημίες δερματίτιδας που συσχετίστηκαν με κολυμβητικές δεξαμενές, δεξαμενές υδρομάλαξης (spas) κλπ. Οι επιδημίες έλαβαν χώρα στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής κατά τα έτη 1997-1998. Στις τρεις (42.9%) η *P. aeruginosa* αποδείχτηκε ως το αίτιο της επιδημίας ενώ στις άλλες τέσσερις θεωρήθηκε ύποπτη ως ο αιτιολογικός παράγοντας με βάση τα κλινικά συμπτώματα (Barwick et al., 2000).

Συνολικά αναφέρθηκαν 435 περιπτώσεις σε 21 επιδημίες δερματίτιδας που έλαβαν χώρα στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (Πίνακας 6) κατά τα έτη 2001-2002. Οι 20 συσχετίστηκαν με κολύμβηση σε κολυμβητικές δεξαμενές και χρήση υδρομαλάξεων. *P. aeruginosa* απομονώθηκε και επιβεβαιώθηκε από το νερό και τα φίλτρα των δεξαμενών σε 8 επιδημίες, σε τρεις από τις οποίες απομονώθηκαν και κλινικά στελέχη της *P. aeruginosa*. Για τις υπόλοιπες 12 μη-επιβεβαιωμένες επιδημίες η *P. aeruginosa* ενοχοποιήθηκε λόγω κλινικών συμπτωμάτων (Yoder et al., 2004).

Μία συστηματική μελέτη διάρκειας ενός χρόνου στην Ολλανδία έδειξε συσχέτιση της παρουσίας *P. aeruginosa* στο νερό δημόσιας κολυμβητικής δεξαμενής με 300 περιπτώσεις ωτίτιδας στους κολυμβητές (Havelaar et al., 1983). Μία στεγασμένη κολυμβητική δεξαμενή με συστήματα υδατοψεκασμού ενοχοποιήθηκε για δύο διαδοχικές επιδημίες πνευμονίας σε ναυαγосώστες (Rose et al., 1998). Ανεπαρκής χλωρίωση επέτρεψε τον αποικισμό του κυκλώματος των υδατοσταγονιδίων και των αντλιών με gram-αρνητικά βακτήρια, και μεταξύ αυτών *P. aeruginosa*. Τα εισπνεόμενα σταγονίδια του βακτηρίου και των παραγόμενων ενδοτοξινών του οδήγησαν στις επιδημίες, οι οποίες τέθηκαν υπό έλεγχο μετά την αντικατάσταση των εγκαταστάσεων και την εφαρμογή συστημάτων οζονισμού και χλωρίωσης.

Πολιτεία	Έτος	Μήνας	Αιτιολογικός Παράγοντας	Αριθμός περιστατικών (n=435)	Πηγή
Alaska	2002	Φλεβάρης	<i>P. aeruginosa</i> ^{*+}	110	Δεξαμενή/Υδρομάλαξη
Alaska	2002	Φλεβάρης	<i>P. aeruginosa</i> [§]	3	Δεξαμενή/Υδρομάλαξη
Colorado	2002	Μάης	<i>P. aeruginosa</i> ⁺	12	Δεξαμενή/Υδρομάλαξη
Florida	2001	Μάρτης	<i>P. aeruginosa</i> [§]	34	Δεξαμενή
Florida	2001	Μάρτης	<i>P. aeruginosa</i> ⁺	53	Υδρομάλαξη
Florida	2001	Απρίλης	<i>P. aeruginosa</i> [§]	7	Υδρομάλαξη
Iowa	2002	Μάρτης	<i>P. aeruginosa</i> [§]	24	Δεξαμενή/Υδρομάλαξη
Maine	2001	Φλεβάρης	<i>P. aeruginosa</i> [§]	21	Υδρομάλαξη
Maryland	2001	Νοέμβρης	<i>P. aeruginosa</i> [§]	8	Υδρομάλαξη
Maryland	2002	Φλεβάρης	<i>P. aeruginosa</i> [§]	3	Υδρομάλαξη
Minnesota	2001	Μάης	<i>P. aeruginosa</i> ^{*+}	6	Υδρομάλαξη
Nebraska	2001	Μάρτης	<i>P. aeruginosa</i> [§]	9	Δεξαμενή/Υδρομάλαξη
Ohio	2002	Φλεβάρης	<i>P. aeruginosa</i> ⁺	18	Υδρομάλαξη
Ohio	2002	Μάρτης	<i>P. aeruginosa</i> ^{*+}	31	Δεξαμενή/Υδρομάλαξη
Oregon	2002	Ιούλης	<i>A. schistosomes</i> [§]	19	Λίμνη
Pennsylvania	2001	Μάης	<i>P. aeruginosa</i> ⁺	2	Υδρομάλαξη

Pennsylvania	2001	Μάης	<i>P. aeruginosa</i> [§]	42	Υδρομάλαξη
Pennsylvania	2001	Μάης	<i>Bacillus spp.</i> ⁺	20	Υδρομάλαξη
Pennsylvania	2001	Ιούνης	<i>Staphylococcus spp.</i> [§]	3	Υδρομάλαξη
Washington	2001	Αύγουστος	<i>P. aeruginosa</i> ⁺	3	Υδρομάλαξη
Wisconsin	2001	Νοέμβρης	<i>P. aeruginosa</i> [§]	7	Υδρομάλαξη

* : Εργαστηριακά επιβεβαιωμένο περιστατικό

+ : Μικροοργανισμός που απομονώθηκε από το νερό

§ : Υποθετική αιτία βασιζόμενη στα κλινικά συμπτώματα

Πίνακας 6. Υδατογενείς λοιμώξεις δερματίτιδας (n=21) σχετιζόμενες με νερά αναψυχής-Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, 2001-2002. (Yoder et al., 2004).

Η πραγματική επίπτωση των ασθενειών που σχετίζονται με την παρουσία της *P. aeruginosa* σε πισίνες και υδρομαλάξεις είναι δύσκολο να προσδιορισθεί δεδομένου ότι τα συμπτώματα είναι ήπια και οι περισσότεροι ασθενείς δεν αναζητούν ιατρική βοήθεια.

Παρόλα αυτά, επιδημίες φαίνεται να συμβαίνουν ευρύτατα με μεγαλύτερη συχνότητα στα εύκρατα κλίματα κατά τους χειμερινούς μήνες, πιθανώς λόγω αυξημένης χρήσης των νερών αναψυχής κατά τη διάρκεια του χειμώνα (Ratnam et al., 1986).

Η υψηλή επίπτωση και ο υψηλός συντελεστής θνησιμότητας στις ομάδες υψηλού κινδύνου επιβεβαιώνει ότι η *P. aeruginosa* και άλλα είδη ψευδομονάδων δυνητικά παθογόνων αποτελούν κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία. Η ανάγκη για εύρεση και εφαρμογή μεθόδων ανίχνευσης, αναγνώρισης και ταυτοποίησης με ακρίβεια και αξιοπιστία των διαφόρων ειδών ψευδομονάδων καθίσταται επιτακτική, ιδιαίτερα εφόσον αρκετές ψευδομοναδικές λοιμώξεις προέρχονται από περιβαλλοντικά στελέχη, τα οποία είναι δύσκολο να ταυτοποιηθούν με τις υπάρχουσες κλασικές τεχνικές.

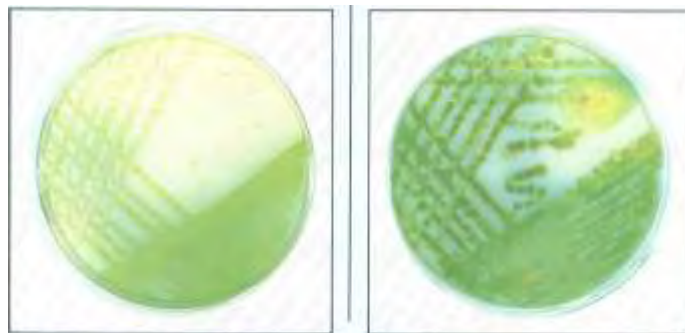
2.5 ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΨΕΥΔΟΜΟΝΑΔΩΝ

Η ταυτοποίηση έχει σαν στόχο την κατάταξη ενός οργανισμού σε συγκεκριμένο γένος και είδος με τη χρήση δοκιμών που στηρίζονται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά, σε μεταβολικές ιδιότητες καθώς και στην ανίχνευση χαρακτηριστικών αλληλουχιών βάσεων στο γενετικό υλικό (DNA) των οργανισμών.

Η ταυτοποίηση των ψευδομονάδων βασίζεται στις ακόλουθες ιδιότητές τους: α) παραγωγή χαρακτηριστικής φθορίζουσας χρωστικής (για την *P. aeruginosa* είναι η πυοκυανίνη) ακόμα και παρουσία αντιβιοτικών και παραγωγή φθορίζουσας χρωστικής σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου και β) παραγωγή αμμωνίας από ακεταμίδιο.

Υλικά εμπλουτισμού που είναι κατάλληλα για την *P. aeruginosa* είναι ο ζωμός ακεταμιδίου (acetamide broth) που περιέχει ανόργανα άλατα και ακεταμίδιο, στον οποίο ελέγχεται η ικανότητα της *P. aeruginosa* να χρησιμοποιήσει το ακεταμίδιο προς παραγωγή αμμωνίας και ο ζωμός πράσινο του Μαλαχίτου που αναστέλλει την ανάπτυξη των υπολοίπων μικροβίων.

Εκλεκτικό υλικό απομόνωσης είναι το *pseudomonas agar base*, που περιέχει τα άλατα $MgCl_2$ και K_2SO_4 τα οποία προάγουν την παραγωγή της χρωστικής, και ανάλογα με το θρεπτικό συμπλήρωμα που περιέχει καθίσταται εκλεκτικό για το είδος *P. aeruginosa* ή γενικά για το γένος των ψευδομονάδων (*Pseudomonas spp.*). Το C-N εκλεκτικό συμπλήρωμα περιέχει βρωμιούχο κετυλ-τριμεθυλ-αμμώνιο (cetrimide) και ναλιδιξικό νάτριο, τα οποία προάγουν την παραγωγή της χρωστικής από την *P. aeruginosa* ενώ ταυτόχρονα αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων εντεροβακτηριακών μικροβίων όπως *Klebsiella*, *Proteus* και *Providencia*. Στο CFC εκλεκτικό συμπλήρωμα έχει μειωθεί η συγκέντρωση του cetrimide, οπότε επιτρέπεται η ανάπτυξη και άλλων ψευδομονάδων (π.χ. *B. cepacia*) ενώ έχουν προστεθεί τα αντιβιοτικά φουσιδικό οξύ και κεφαλοσπορίνη για την αναστολή της ανάπτυξης άλλων μικροβίων.



Εικόνα 4. Αποικίες *P. aeruginosa* σε εκλεκτικό μέσο (αριστερά) και μη εκλεκτικό μέσο (δεξιά)

Η ανάπτυξη πράσινων φθορίζουσων αποικιών είναι επιβεβαιωτική για την παρουσία *P. aeruginosa* (Εικόνα 4), η παραγωγή άλλων φθορίζουσων αποικιών απαιτεί περαιτέρω έλεγχο παραγωγής αμμωνίας από ακεταμίδιο προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη *P. aeruginosa* ενώ η ανάπτυξη άλλων μη-φθορίζουσων καφέ-κόκκινων αποικιών απαιτεί επιβεβαίωση για την παραγωγή οξειδάσης, την ικανότητα καταβολισμού του ακεταμιδίου και την παραγωγή φθορίζουσας χρωστικής (εικόνα 5) σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου (Ευρωπαϊκό Πρότυπο prEN 12780:2001).



Εικόνα 5. Χαρακτηριστικός φθορισμός της *P. aeruginosa* υπό υπεριώδη ακτινοβολία

2.6 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΨΕΥΔΟΜΟΝΑΔΩΝ

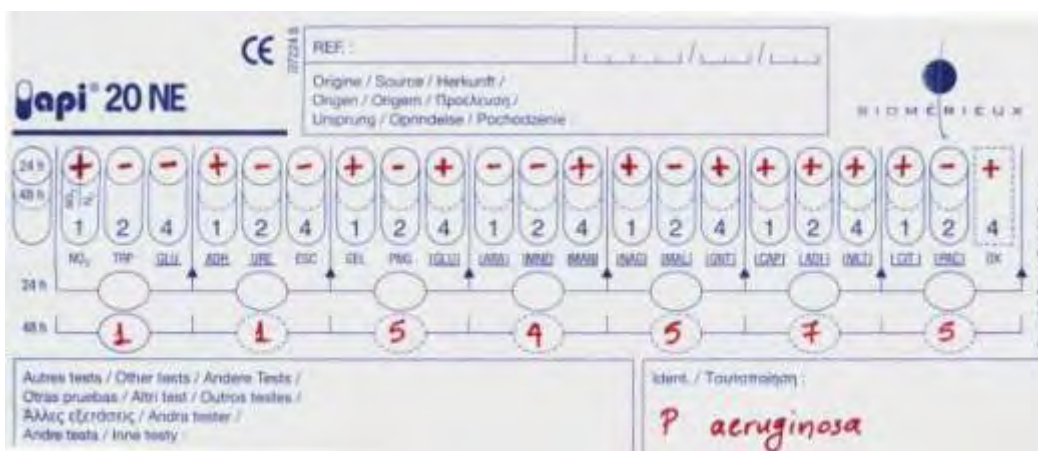
2.6.1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ – API 20NE

Το API20NE (bioMérieux) αποτελεί ένα εμπορικά διαθέσιμο σύστημα γρήγορης ταυτοποίησης μη-εντεροβακτηριακών gram αρνητικών βακτηρίων (Εικόνα 6). Το σύστημα αυτό ελέγχει είκοσι βιοχημικές ιδιότητες του υπό εξέταση βακτηρίου. Συγκεκριμένα εξετάζει οκτώ βιοχημικές διεργασίες και ανάπτυξη παρουσία 12 σακχάρων.

Αποτελείται από είκοσι μικροκυψελίδες που περιέχουν αφυδατωμένα υποστρώματα. Εάν το βακτήριο περιέχει σε ενεργή μορφή τα ένζυμα που καταλύουν τις αντίστοιχες βιοχημικές διεργασίες τότε η θετική αντίδραση εμφανίζεται ως αλλαγή χρώματος είτε άμεσα είτε μετά την προσθήκη αντιδραστηρίων. Η αφομοίωση των σακχάρων ελέγχεται με την ανάπτυξη ή όχι του βακτηρίου στα συγκεκριμένα υποστρώματα. Ο συνδυασμός των θετικών και αρνητικών αντιδράσεων παράγει ένα νούμερο, σύμφωνα με το οποίο πραγματοποιείται η ταυτοποίηση εφόσον αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο γένος ή είδος βακτηρίου.

Με το API NE20 ταυτοποιούνται οι 6 συχνότερες ψευδομονάδες, που προσβάλλουν τον άνθρωπο, ήτοι η *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. maltophilia*, *P. caracica* και *P. putrefaciens*.

Πρωταρχικό ρόλο στην ταυτοποίηση παίζει η βιοχημική ταυτοποίηση του παθογόνου στην οποία εκμεταλλευόμαστε τις μεταβολικές ιδιότητες του βακτηρίου (διάσπαση υποστρωμάτων, παραγωγή ενζύμων, αξιοποίηση πηγών C και N κ.α). Οι βιοχημικές δοκιμές ποικίλουν ανάλογα με το προς ταυτοποίηση παθογόνο (Schaad N.W., 2001). Στην περίπτωση των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*, η διαγνωστική ομάδα των δοκιμών L.O.P.A.T. (L: παραγωγή Levan, O: παραγωγή οξειδάσης, P: πηκτινόλυση κονδύλων πατάτας, A: διάσπαση αργινίνης, T: υπερευαισθησία καπνού) είναι μια από αυτές που χρησιμοποιείται ευρέως για τη διαφοροποίηση και ομαδοποίηση σε επίπεδο είδους των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* (Conzalez et al., 2003).



Εικόνα 6. Ταυτοποίηση *P. aeruginosa* μέσω του βιοχημικού συστήματος API20NE

2.7 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΨΕΥΔΟΜΟΝΑΔΩΝ

Τεχνικές οι οποίες βασίζονται στο DNA: οι τεχνικές αυτές αποτελούν τη βάση για το σύγχρονο χαρακτηρισμό και ταυτοποίηση των μικροβιακών κοινοτήτων (Olczak-Woltman et al., 2007). Οι μέθοδοι οι οποίες βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), πλεονεκτούν έναντι των παραδοσιακών μεθόδων διάγνωσης, καθώς οι οργανισμοί δεν χρειάζεται να καλλιεργηθούν και τα πρωτόκολλα εμφανίζουν μεγάλη ευαισθησία, αξιοπιστία και ακρίβεια, ενώ δίνουν και ταχύτητα αποτελέσματα.

Η ταξινόμηση κατά γένη και είδη, παραδοσιακά βασίζονταν σε μεθόδους DNA-DNA υβριδισμού ενώ η μοντέρνα φυλογενετική ανάλυση βασίζεται όλο και περισσότερο σε μοριακές τεχνικές αποτύπωσης (fingerprinting) όπως αυτές που στηρίζονται στην ανάλυση αλληλουχιών επιλεγμένων γονιδίων (MLST), στην ανάλυση 16S ριβοσωμικών αλληλουχιών, στην BOX και ERIC ανάλυση, στα RFLPs και στα RAPDs.

Οι παραδοσιακές μέθοδοι ταυτοποίησης που βασίζονται σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά περιορίζονται από τον αριθμό των χαρακτηριστικών που μπορούν να εξετάσουν και από τις ποικίλες αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων τους. Επίσης αυτές οι μέθοδοι είναι χρονοβόρες και σχετικά δύσκολες στην εξαγωγή συμπερασμάτων.

Έτσι υπάρχουν μελέτες από ένα μεγάλο αριθμό αναλύσεων της γενετικής ποικιλομορφίας βακτηριακών πληθυσμών και του προσδιορισμού των σχέσεών τους, οι οποίες βασίζονται στην PCR. Πιο συγκεκριμένα έχουν βρεθεί περισσότερα από 40 πρωτόκολλα που αφορούν βακτήρια του γένους *Pseudomonas*.

2.8 ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Η ανίχνευση βακτηρίων σε πόσιμο νερό συνήθως επιτυγχάνονταν με μεθόδους βασισμένες στην καλλιεργητικότητα των οργανισμών. Ωστόσο τα βακτήρια έχουν την δυνατότητα να εισέρχονται σε μια βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη κατάσταση (viable but not culturable, VBNC), ως αντίδραση σε μια μορφή στρές που προκαλείται από κάποιον περιβαλλοντικό παράγοντα π.χ περιορισμένα θρεπτικά υλικά, αλλαγή της ιδανικής θερμοκρασίας ανάπτυξης, αυξημένη οσμωτική συγκέντρωση και έκθεση σε λευκό φως (Oliver J.D., 2005). Τα βακτήρια φεύγουν από αυτή την κατάσταση μόλις ο παράγοντας που την προκάλεσε παύει να υφίσταται (Oliver J.D., 2005). Σε αυτή την κατάσταση τα βακτήρια αδυνατούν να αναπτυχθούν σε καθιερωμένα βακτηριακά μέσα, αλλά είναι ζωντανά και δείχνουν σημάδια χαμηλής μεταβολικής δραστηριότητας. Ο Oliver (2005) δημοσίευσε μια λίστα με περισσότερα από 60 βακτηριακά είδη που ήταν ικανά να εισέλθουν σε μια τέτοια κατάσταση, συμπεριλαμβανομένων της *P. aeruginosa*, της *Leg. pneumophila* και άλλων κολοβακτηριδίων. Η μετάβαση από αυτή την κατάσταση σε μορφή ικανή να καλλιεργηθεί ίσως συμβαίνει κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες όπως σε στάσιμα νερά, σε αλλαγές θερμοκρασίας του νερού, παρουσία απολυμαντών ή τοξικών μεταλλικών ιόντων σαν του χαλκού, αλληλεπιδράσεις με πρωτόζωα και έκπλυση θρεπτικών συστατικών από υλικά, που οδηγούν σε ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης (Moritz et al., 2010). Να σημειωθεί ότι αποτελέσματα έρευνας έδειξαν ότι η *P. aeruginosa* δεν μπορεί να ανιχνευθεί σε υλικά κατασκευασμένα από χαλκό (Elguindi et al., 2009). Επίσης έχει αναφερθεί ότι αν και κάποια αποτελέσματα ήταν θετικά για παθογόνα βακτήρια με μη καλλιεργητικές μεθόδους, δεν είναι δυνατή η διάκριση των νεκρών και ζωντανών κυττάρων με αυτές τις μεθόδους (Villarreal et al., 2010). Οι μοριακές μέθοδοι μπορούν να ανιχνεύσουν το βακτήριο βασιζόμενες στο DNA, αλλά δεν μπορούν να διακρίνουν τα ζωντανά από τα νεκρά και τα (VBNC) μη καλλιεργήσιμα βακτήρια (Oliver J.D., 2000). Δηλαδή μόνο οι καλλιεργητικές μέθοδοι μπορούν να μας πούν

αν το βακτήριο είναι ζωντανό ή όχι.

Είναι κοινά αποδεκτό ότι οι καλλιεργητικές μέθοδοι δεν αντικατοπτρίζουν τις διαφορετικές καταστάσεις από πλευράς φυσιολογίας του βακτηρίου που επηρεάζουν την καλλιεργησιμότητα του (Oliver J.D., 2000). Κατά συνέπεια, καλλιεργητικές μέθοδοι εφαρμόζονται ως εναλλακτική προσέγγιση στην παρακολούθηση των σημαντικών παθογόνων στο πόσιμο νερό (Villarreal et al., 2010). Για αυτό το λόγο, η ανίχνευση των βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων και των μη-καλλιεργήσιμων (VBNC) βακτηρίων στο νερό που σχετίζεται με την βιομηχανία τροφίμων, είναι απαραίτητη για να διασφαλίσει την ασφάλεια της τροφής από μικροβιολογική άποψη.

2.9 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Σήμερα, στα περισσότερα εργαστήρια για την ανίχνευση της *P. aeruginosa* χρησιμοποιούνται καλλιεργητικές μέθοδοι. Αν και σύμφωνα με μια εργασία οι καλλιεργητικές μέθοδοι είναι μια αξιόπιστη τεχνική (Deschaght et al., 2009) οι επιστήμονες συνέχιζαν να ψάχνουν μια πιο γρήγορη και αυξημένης ευαισθησίας μέθοδο ανίχνευσης (Tramper-Stranders et al., 2005). Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας χρησιμοποιήθηκε όλο και περισσότερο η τεχνική της PCR.

Τεχνικές μοριακής βιολογίας χρησιμοποιούνταν εδώ και αρκετά χρόνια για την εξέταση του νερού για διάφορους σκοπούς (Frahm et al., 1998; Frahm E. and Obst U., 2003; Grobe et al., 2001; Schwartz et al., 1998, 2003).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR, χρησιμοποιείται πλέον ευρέως για την ανίχνευση του DNA της *P. aeruginosa*, εξαιτίας της αξιοπιστίας και της ευαισθησίας που εμφανίζει η μέθοδος, αν και δεν παρέχει πληροφορίες για την βιωσιμότητα της ανιχνεύσιμης *P. aeruginosa* (Khan I.U. and Yadav J.S., 2004; Anuj et al., 2009; Deschaght et al., 2009; Feizabadi et al., 2010; Subrayan et al., 2010). Για την γενετική αναγνώριση και ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Pseudomonas* μέσω της μεθόδου PCR, χρησιμοποιούνται ειδικές DNA αλληλουχίες για την *P. aeruginosa*, όπως το γονίδιο 16S rRNA (Relman et al., 1992), το *toxA* (Khan A.A. and Gerniglia C.E., 1994), το *oprI*, *oprL* (De Vos et al., 1997), το *algD* (da Silva Filho et al., 2004) και το *gyrB* (Qin et al., 2003). Το 16S rRNA γονίδιο είναι ευρέως χρησιμοποιούμενο, αλλά δεν είναι ικανό να αναπτύξει εκκινητικά μόρια ιδιαίτερης εξειδίκευσης, εξαιτίας των πολλών ομοιοτήτων που παρουσιάζουν οι γονιδιακές αλληλουχίες του (Moore et al., 1996; Yamamoto et al., 2000). Παρακάτω παρουσιάζεται η ευαισθησία διαφόρων εκκινητικών μορίων (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Σύνολο δοκιμασμένων ζεύγων εκκινητικών μορίων όσο αφορά την ειδικότητα τους για την ανίχνευση μέσω PCR της *P. aeruginosa*.

Συγγραφέας	Δείγματα	Είδη	Γονίδιο στόχος	Αριθμός θετικών δειγμάτων	
				<i>P. aeruginosa</i>	Non <i>P. aeruginosa</i>
Lavenir et al.	74	16	gyrB	59/59	0/15
			toxA	55/59	0/15
			16S-23S	59/59	0/15
			rDNA ITS		
			16S rDNA	59/59	1/15
			oprI	59/59	3/15
			oprL	59/59	2/15
			fliC	59/59	13/15
			ecfX	59/59	0/15
			De Vos et al.	220	36
Jaffe et al.	58	14	oprL	40/40	0/18
Anuj et al.	91	10	ecfX+gyrB	63/63	0/28
			ecfX	63/63	0/28
			gyrB	63/63	0/28
			oprL	63/63	4/28
			ETA	62/63	0/28
			16S rDNA	63/63	2/28
Qin et al.	200	5	gyrB	113/113	0/87
			algD GDP mannose	101/113	0/87
			oprI	112/113	1/87
			ETA	108/113	0/87
			gyrB	104/104	0/120
da Silva Filho et al.	202	11	algD GDP mannose	176/176	0/26
da Silva Filho et al.	54	18	algD GDP mannose	7/7	0/47

ND: δεν καθορίστηκε

Μέθοδος PCR που έχει ως στόχο το *gyrB* γονίδιο, εμφάνισε μεγάλη ευαισθησία και εξειδίκευση όταν δοκιμάστηκε να ανιχνεύσει στελέχη *P. aeruginosa* ή διάφορα άλλα είδη ψευδομονάδων παρόμοιας συγγένειας με την *P. aeruginosa* (Lavenir et al., 2007). Με γνώμονα την αποτελεσματικότητα της PCR, μπορούμε να εκμεταλλευτούμε την μέθοδο αυτή και να παρακολουθούμε την εμφάνιση της *P. aeruginosa* σε διάφορα περιβάλλοντα όπως βρύσες σπιτιών, εντατικές μονάδες νοσοκομείων και γενικά όπου υπάρχει αυξημένος

κίνδυνος εμφάνισης λοιμώξεων.

Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας που θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν όταν χρησιμοποιούμε τεχνικές μοριακής βιολογίας, είναι η παρουσία αναστολέων PCR. Οργανικές ουσίες και άλλοι αναστολείς PCR ανιχνεύονται συχνά σε επιφανειακά νερά (Wilson I.G., 1997).

Έτσι διάφορες μελέτες συνέκριναν την εξειδίκευση και ευαισθησία ανάμεσα στις καλλιεργητικές μεθόδους και στην PCR (Tramper-Stranders et al., 2005, van Belkum et al., 2000). Αν και η εξειδίκευση της PCR επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες όπως για παράδειγμα η συγκέντρωση του Mg^{2+} και του NaCl πολύ σημαντικό ρόλο παίζει το ποιά συγκεκριμένα γονίδια θα στοχεύσουν από το είδος που θέλουμε να ανιχνεύσουμε, ενώ εξίσου σημαντικό είναι και το ποιά εκκινητικά μόρια (primers) θα χρησιμοποιήσουμε για το σκοπό αυτό. Απαραίτητο είναι να αναπτύξουμε εκκινητικά μόρια που αναγνωρίζουν μόνο το γονίδιο-στόχος. Η επιλογή των εκκινητικών μορίων καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την εξειδίκευση της τεχνικής. Παράλληλα η ευαισθησία της τεχνικής, αν και δεν υπάρχει πρόβλημα τις περισσότερες φορές όταν το βακτηριακό φορτίο είναι μεγάλο, μπορεί να επηρεαστεί από τον τρόπο που επεξεργαζόμαστε τα δείγματα και την μέθοδο εξαγωγής του DNA (DNA extraction).

Μερικές διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα στις μεθόδους ανίχνευσης της *P. aeruginosa*, με καλλιεργητικό εκλεκτικό υλικό (καλλιεργητικές) και PCR, μπορεί να υπάρχουν εξαιτίας των νεκρών ή βιώσιμων αλλά μη καλλιεργήσιμων κυττάρων (VBNC) της *P. aeruginosa* από τα περιβαλλοντικά δείγματα (Lavenir et al., 2007). Όσο αφορά σε ασθενείς με κυστική ίνωση, η PCR παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στην ανίχνευση της *P. aeruginosa* σε πτύελα ασθενών με θετικές καλλιέργειες. Οι Karpati F. and Jonasson J., απέδειξαν την παρουσία της *P. aeruginosa* σε πτύελα με την μέθοδο της PCR, και την συνέκριναν με τις καλλιεργητικές μεθόδους. Ευαισθησία 93% της μεθόδου PCR βρέθηκε, σε σχέση με τις καλλιεργητικές τεχνικές (Karpati F. and Jonasson J., 1996). Επόμενες μελέτες έδειξαν ευαισθησία για την PCR ανάμεσα στο 97-100%, ανάλογα με το ποιά εκκινητικά μόρια χρησιμοποιήθηκαν (da Silva Filho et al., 2004, Xu et al., 2004, Spilker et al., 2004).

Πλεονεκτήματα της μεθόδου PCR είναι η υψηλή ευαισθησία και η δυνατότητα έγκαιρης ανίχνευσης σε παθογόνα βακτήρια του αναπνευστικού. Ακόμα ένα άλλο πλεονέκτημα των μοριακών τεχνικών είναι η χρησιμότητά τους στην παρακολούθηση διασταυρούμενων λοιμώξεων.

Μια σειρά ερευνών έχουν δείξει ότι η τεχνική της PCR δίνει καλύτερα αποτελέσματα ευαισθησίας όσο αφορά την ανίχνευση της *P. aeruginosa* σε σχέση με τις καλλιεργητικές τεχνικές (Lavenir et al., 2007, De Vos et al., 1997, Motoshima et al., 2007, Karpati F. and

Jonasson J., 1996, da Silva Filho et al., 1999, da Silva Filho et al., 2004, da Silva Filho et al., 2007, Zemanick et al., 2010). Τα παραπάνω αποτυπώνονται στον Πίνακα 8.

Συγγραφέας	Τύπος δείγματος	Γονίδιο στόχος	Αριθμός δειγμάτων	Θετικά σε καλλιέργεια	Θετικά σε PCR	Μέθοδος εκχύλισης
Lavenir et al.	Περιβαλλοντικά	gyrB	41	5	3	FastDNA SPIN Kit (qBiogene)
		ecfX	41	5	8	
		16S-23S rDNA ITS	41	5	7	
De Vos et al.	Πτύελα	oprL	49	40	44	Phenol-chloroform or boiling
	Βιοψίες δέρματος	oprL	14	7	9	
Motoshima et al.	Πτύελα	gyrB	108	54	56	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
Karpati et al.	Πτύελα	16S rDNA	90	40	45	Amplicor Sputum Specimen Preparation Kit (Roche)
da Silva Filho et al.	Πτύελα	algD GDP mannose	10	5	5	Freezing-boiling
	Λαιμός	algD GDP mannose	5	2	2	
da Silva Filho et al.	Πτύελα, OS ^b	algD GDP mannose	257	144	200	Phenol-chloroform
da Silva Filho et al.	Πτύελα, OS ^b	algD GDP mannose	87 ^a	42	53	Phenol-chloroform
Zemanick et al.	Πτύελα	16S rDNA	82	40	44	Phenol-chloroform
	OS ^b	16S rDNA	40	16	10	

Πίνακας 8. Θετικότητα αποτελεσμάτων βασισμένη σε έρευνες για κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα, για την ανίχνευση της *P. aeruginosa* με PCR ή με καλλιεργητική μέθοδο.

^a Ασθενείς, ο αριθμός των δειγμάτων δεν διευκρινίζεται

^b Φαρμαγικά επιχρίσματα

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανίχνευση και ο μοριακός χαρακτηρισμός της *Pseudomonas aeruginosa* σε εμφιαλωμένα και πόσιμα νερά.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε τους μήνες Ιούνιο και Ιούλιο του 2008 από διάφορες περιοχές της Θεσσαλίας, Μακεδονίας και Ηπείρου (Πίνακας 9). Συλλέχθηκαν συνολικά 29 δείγματα εκ των οποίων τα 19 προέρχονταν από το δίκτυο ύδρευσης (Δ.Υ), τα 4 ήταν εμφιαλωμένα νερά που κυκλοφορούσαν στο εμπόριο (ΕΜΦ.), τα 2 ήταν από εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων (Ε.Ε.Τ), το 1 προέρχονταν από εν λειτουργία μηχανήμα ψύκτη νερού (Ψ) και τέλος 3 δείγματα προέρχονταν από πόσιμο νερό.

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε πλαστικά αδιαφανή δοχεία χωρητικότητας 4 λίτρων 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.

Ως θετικός μάρτυρας για την PCR, καθώς και για τον έλεγχο της ευαισθησίας χρησιμοποιήθηκε στέλεχος *P. aeruginosa*. Τέλος για την αξιοπιστία της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν πέντε επιβεβαιωμένα με καλλιεργητική μέθοδο σε CN άγαρ θετικά δείγματα για *P. aeruginosa*.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΣΙΜΟΥ ΝΕΡΟΥ

Α/Α	ΔΕΙΓΜΑ	ΗΜΕΡ/ΝΙΑ	ΤΟΠΟΣ	ΝΟΜΟΣ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
1	NTR1	23/6/2008	ΤΥΡΝΑΒΟΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Ε.Ε.Τ
2	PL2	24/6/2008	ΠΑΛΑΜΑΣ	ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	Δ.Υ
3	AGK3	25/6/2008	ΑΓΙΟΚΑΜΠΟΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
4	AG4	26/6/2008	ΑΓΙΑ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
5	ARM5	27/6/2008	ΑΡΜΕΝΙΟ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
6	KR6	28/6/2008	ΚΑΡΔΙΤΣΑ	ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	Δ.Υ
7	SX7	28/6/2008	ΛΑΡΙΣΑ	ΛΑΡΙΣΑΣ	ΨΥΚΤΗΣ
8	BRT8	29/6/2008	ΒΡΥΟΤΟΠΟΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
9	SER9	30/6/2008	ΣΕΡΡΕΣ	ΣΕΡΡΕΣ	Δ.Υ
10	KAT10	30/6/2008	ΚΑΤΕΡΙΝΗ	ΠΙΠΕΡΙΑΣ	Δ.Υ
11	KAL11	1/7/2008	ΚΑΛΑΜΠΑΚΑ	ΤΡΙΚΑΛΑ	Δ.Υ
12	ITEA12	1/7/2008	ΙΤΕΑ	ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ	Δ.Υ

13	OMRF13	2/7/2008	ΟΜΟΡΦΟΧΩΡΙ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
14	GIAN14	2/7/2008	ΓΙΑΝΝΟΥΛΗ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
15	ΙΟΑΝ15	4/7/2008	ΙΩΑΝΝΙΝΑ	ΙΩΑΝΝΙΝΑ	Δ.Υ
16	BIPE16	4/7/2008	ΒΙΠΕ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Ε.Ε.Τ
17	ΑΥΡΑ17	5/7/2008	ΕΜΦΙΑΛ. ΑΥΡΑ		ΕΜΦΙΑΛΩΜΕΝΟ
18	SAM18	5/7/2008	ΕΜΦΙΑΛ. ΣΑΜΑΡΙΝΑ		ΕΜΦΙΑΛΩΜΕΝΟ
19	ZAG19	5/7/2008	ΕΜΦΙΑΛ. ΖΑΓΟΡΙ		ΕΜΦΙΑΛΩΜΕΝΟ
20	LAR20	6/7/2008	ΚΕΝΤΡΟ ΛΑΡΙΣΑΣ	ΛΑΡΙΣΑΣ	Δ.Υ
21	LOUT21	6/7/2008	ΕΜΦΙΑΛ. ΛΟΥΤΡΑΚΙ		ΕΜΦΙΑΛΩΜΕΝΟ
22	BOL22	7/7/2008	ΒΟΛΟΣ	ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	Δ.Υ
23	KOZ23	7/7/2008	ΚΟΖΑΝΗ	ΚΟΖΑΝΗΣ	Δ.Υ
24	SKAL24	8/7/2008	ΣΚΑΛΟΧΩΡΙ	ΚΑΣΤΟΡΙΑΣ	Δ.Υ
25	NEAP25	8/7/2008	ΝΕΑΠΟΛΗ	ΚΟΖΑΝΗΣ	Δ.Υ
26	THES26	9/7/2008	ΘΕΡΜΗ	ΘΕΣ/ΝΙΚΗΣ	Δ.Υ
27	R1	8/11/2009	ΚΡΥΟΒΡΥΣΗ		ΠΟΣΙΜΟ ΝΕΡΟ
28	R2	8/11/2009	ΚΑΡΥΑ		ΠΟΣΙΜΟ ΝΕΡΟ
29	R3	8/11/2009	ΣΙΚΑΜΙΝΕΑ		ΠΟΣΙΜΟ ΝΕΡΟ

Πίνακας 9. Δείγματα πόσιμου νερού

* Ε.Ε.Τ : Εργοστάσιο επεξεργασίας τροφίμων

* Δ.Υ : Δίκτυο ύδρευσης

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

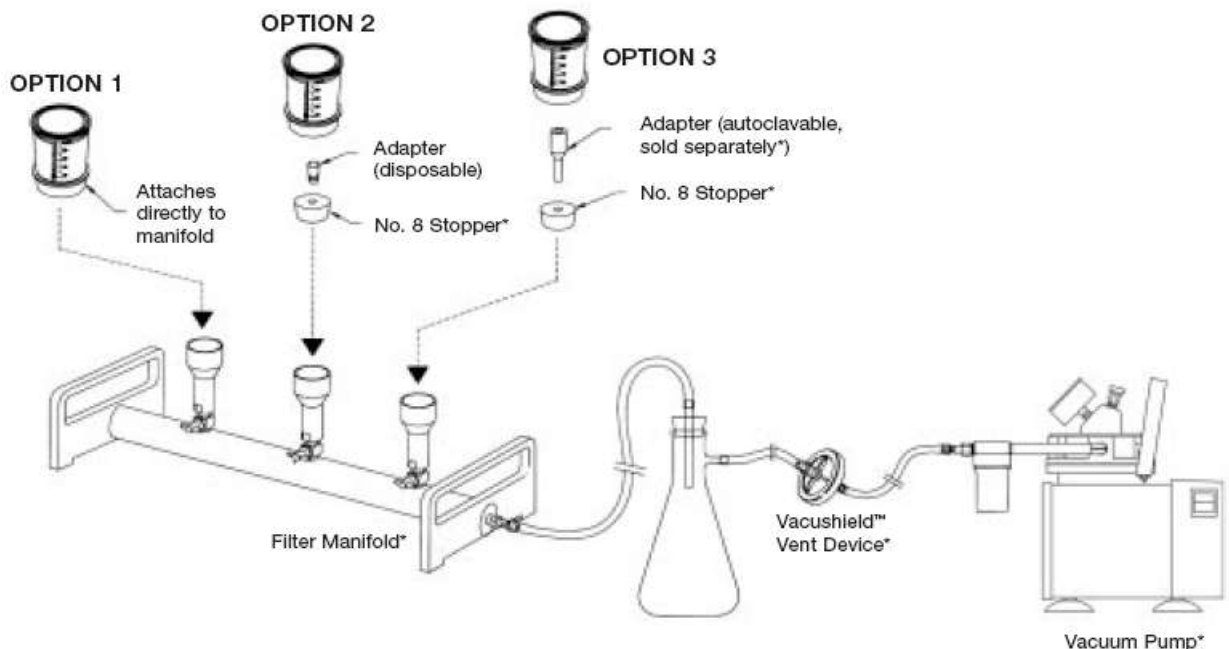
Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι ο όγκος των δειγμάτων του νερού είναι μεγάλος και η συγκέντρωση των βακτηρίων σε αυτά χαμηλή, πριν την απομόνωση των βακτηρίων προηγούνται μέθοδοι συγκέντρωσης τους. Η μέθοδος έκλουσης-προσρόφησης σε ηλεκτροαρνητικά φίλτρα είναι η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Η επεξεργασία των δειγμάτων έλαβε χώρα σε θάλαμο βιολογικής προστασίας (Biological Safety Cabinet, BSC) επιπέδου 2 (Biological Safety Level, BSL 2).

3.2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ - ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΑΠΟ ΗΛΕΚΤΡΑΡΝΗΤΙΚΑ ΦΙΛΤΡΑ

Στην αρχή ρυθμίσαμε το PH στο 3,8 προσθέτοντας 3N HCl, σε 4 λίτρα δείγματος νερού. Στη συνέχεια, με την προσθήκη $Mg_2Cl_2 \cdot 6H_2O$ σε τελική συγκέντρωση 0,05M, τα βακτήρια φορτίστηκαν θετικά, παρουσία Mg^{2+} (Merck Germany), ενώ ακολούθησε αργή ανάδευση του νερού μέχρι την πλήρη διαλυτοποίησή του.

Ακολούθως με την βοήθεια μιας συσκευής αρνητικής πίεσης (Εικόνα 7), το κάθε δείγμα φιλτραρίστηκε ξεχωριστά, σε ένα ηλεκτραρνητικά φορτισμένο φίλτρο (MF-Millipore) διαμέτρου 47mm και μεγέθους πόρου 3 μ m, ώστε να προσροφηθούν στην επιφάνεια του φίλτρου τα βακτήρια. Ο χρόνος που απαιτήθηκε για να φιλτραριστεί το κάθε δείγμα διέφερε.

Έπειτα, το συγκεκριμένο φίλτρο αφαιρέθηκε από την συσκευή, τοποθετήθηκε σε τριβλίο petri και υποβλήθηκε 2 φορές σε έκλυση με 10 ml διαλύματος, αποτελούμενο από Tris 0,05M με PH=9, εμπλουτισμένο με 3% BSA. Ακολούθησε καλή ανάδευση για 10 λεπτά. Τέλος, μετά την αφαίρεση του, το φίλτρο φυλάχτηκε στους 4°C, και το διάλυμα που προέκυψε από τις παραπάνω διαδικασίες, ρυθμίστηκε σε PH=7 με την βοήθεια 3N HCl.



Εικόνα 7. Συσκευή φιλτραρίσματος των δειγμάτων του νερού

3.2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ ΜΕ PEG

Μέσω της τεχνικής συγκέντρωσης με πολυαιθυλενική γλυκόλη (PEG), επετεύχθη η συγκέντρωση του υπερκείμενου, όπου προσθέσαμε στο διάλυμα που προέκυψε μετά την έκλυση 10% (w/v) PEG6000 και NaCl (Sigma, USA) σε τελική συγκέντρωση 0,5M. Όλη την νύχτα πραγματοποιήθηκε ανάδευση στους 4°C.

Την επομένη μέρα το διάλυμα κατανεμήθηκε σε σωληνάρια των 2ml, ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 11.000 rpm, για 1 ώρα στους 4°C και έτσι δημιουργήθηκε ίζημα σε κάθε σωληνάριο.

Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου και την διάλυση του ιζήματος σε PBS (phosphate buffer saline) προκύπτει από το κάθε μας δείγμα νερού (των 4 λίτρων) ένα διάλυμα τελικού όγκου 2ml. Τα διαλύματα αυτά φυλλάσσονται στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν στο επόμενο στάδιο που είναι η εκχύλιση του DNA.

3.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA

Αρχικά σε 100 μl από το συγκεκριμένο δείγμα προστέθηκαν 100 μl H₂O με 0,1% Tween 20. Ακολούθησε καλή ανάδευση και βρασμός στους 95° για 5 λεπτά. Για την περαιτέρω εκχύλιση DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (Casas et al., 1995).

Σε eppendorf σωληνάρια των 2 ml τοποθετήθηκαν 300 μl Lysis Buffer που αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol και 25 mM sodium citrate (Merck, Germany). Προστίθενται 10 μl γλυκογόνου (100 mg/ml) (-20°C) και 100 μl δείγματος.

Με σκοπό την λύση των κυτταρικών μεμβρανών των βακτηριακών σωματιδίων ώστε να απελευθερωθούν τα νουκλεϊκά οξέα, λαμβάνει χώρα ισχυρή ανάδευση (vortex) του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια προστέθηκαν 400 μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C) και αφού πραγματοποιήθηκε πάλι ανάδευση (vortex), το μίγμα τοποθετήθηκε για επώαση στους -20°C για τουλάχιστον 20 λεπτά.

Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 14000 rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου.

Στο ίζημα που απέμεινε, προστίθεται 500 μl αιθανόλης 70% και ακολουθεί ανάδευση (vortex) για την διαλυτοποίηση του ιζήματος.

Τέλος μετά από 10 λεπτά φυγοκέντρωσης στις 14000 rpm και απομάκρυνσης του

υπερκείμενου, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 100 μl διπλά απιονισμένου νερού (ddH₂O) (Sigma, USA) ελεύθερου ριβονουκλεασών.

3.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης PCR χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης περιοχής του γενώματος με τη χρήση των ειδικών εκκινητικών μορίων (primers).

Χρησιμοποιήθηκε ένα ζευγάρι εκκινητικών μορίων (PA722F - PA899R) τα οποία (Πίνακας 10), στοχεύουν στο *gyrB* γονίδιο της *P. aeruginosa*, επιτρέποντας την ενίσχυση τμήματος 190 βάσεων του γονιδίου *gyrB* (Lee et al., 2011).

Primers	Πολικότητα	Θέση	Αλληλουχία 5'-3'
PA722F	sense	722-740	GGCGTGGGTGTGGAAGTC
PA899R	Antisense	877-899	TGGTGGCGATCTTGAACCTTCTT

Πίνακας 10. Εκκινητικά μόρια για την ανίχνευση της *P. aeruginosa*

Το γονίδιο *gyrB* της *P. aeruginosa* κωδικοποιεί για την τοποισομεράση τύπου II, και θεωρείται το καταλληλότερο για την ανίχνευση και την αναγνώριση βακτηριακών ειδών (Fukushima et al., 2002, Lan et al., 2008). Πιο συγκεκριμένα, το *gyrB* γονίδιο κωδικοποιεί για την Β υπομονάδα της γυράσης, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του DNA.

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μl/ tube που αποτελούνταν από 5 μl/ tube ρυθμιστικό διάλυμα (Taq Buffer 10x), 1 μl εκκινητικών μορίων με συγκέντρωση 25 pmol το καθένα, 6μl/ tube μείγμα νουκλεοτιδίων 10 mM (dNTPs), 0,25μl MgCl₂ 100 mM, 0,5 μl/ tube Maximo Taq DNA πολυμεράση (Gene on) (5units/ μl), 34,5 μl/ tube ddH₂O, και τέλος 3μl/ tube δείγμα DNA.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή στις εξής συνθήκες:

1 κύκλος	5 min στους 95 °C
40 κύκλους	30 sec στους 95 °C 20 sec στους 55 °C 20 sec στους 72 °C
1 κύκλος	5 min στους 72 °C

3.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Pairsley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml . Χρησιμοποιήθηκαν 10 μl από κάθε προϊόν της PCR, και τα οποία αφού αναμίχθηκαν με 2 μl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης), μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα αγαρόζης. Για τον προσδιορισμό του μήκους των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας μοριακού βάρους, στη συγκεκριμένη περίπτωση ο 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, UK) και αναλύθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου εφαρμόστηκε τάση 120V. Μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto / Phoresis I, Fotodyne) πραγματοποιήθηκε η οπτική παρατήρηση των προϊόντων της PCR στο πήκτωμα αγαρόζης.

3.6 ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Για την επιβεβαίωση της ειδικότητας της PCR με τους εκκινητές PA 722F – PA 899R όπως επίσης και για τον έλεγχο ευαισθησίας κλωνοποιήθηκε το προϊόν της αντίδρασης του θετικού μάρτυρα.

Τα στάδια της μοριακής κλωνοποίησης, που αναλύονται παρακάτω, είναι τα εξής :

- i) ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR,
- ii) η αντίδραση της λιγάσης,
- iii) η παραγωγή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων,
- iv) ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων και
- v) η επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA που μας ενδιαφέρει, στον φορέα

Αντίδραση λιγάσης : Με την αντίδραση αυτή γίνεται η σύνδεση του επιθυμητού προϊόντος (ένθεμα) στον φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο). Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο TOPO Vector (Invitrogen), ο οποίος περιέχει μια περιοχή πολυσυνδέτη, στην οποία ενσωματώνεται το τμήμα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με το TOPO TA Cloning (Invitrogen) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Δημιουργία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων (με την μέθοδο του χλωριούχου ασβεστίου - CaCl_2) : Από το απόθεμα γλυκερόλης που βρίσκεται στους -80°C , μεταφέρουμε βακτηριακά κύτταρα, υπό ασηπτικές συνθήκες σε 1 ml αποστειρωμένης καλλιέργειας LB Broth και επωάζονται στους 37°C στις 210 στροφές / min καθ'όλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight). Την επόμενη μέρα, μεταφέρουμε την καλλιέργεια σε 50 ml LB Broth και ακολουθεί επώαση στους 37°C στις 210 στροφές / min για 2h. Γίνεται έλεγχος της ανάπτυξης των κυττάρων, μετρώντας την απορρόφηση της καλλιέργειας στην οπτική πυκνότητα OD600. Όταν τα κύτταρα βρεθούν σε εκθετική φάση ανάπτυξης, δηλαδή όταν η απορρόφηση τους φτάσει στα 0,450 – 0,550 A, τότε σταματάμε την κυτταρική ανάπτυξη, τοποθετώντας τα στον πάγο για 10 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min στους 4°C και απόρριψη του υπερκείμενου. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 10 ml παγωμένου CaCl_2 0,1 M. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min στους 4°C και απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Τέλος, επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 2 ml παγωμένου CaCl_2 0,1 M.

Μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων: Η διαδικασία ξεκινά με την μεταφορά (για κάθε δείγμα) 200μl δεκτικών κυττάρων σε erpendorf των 0,5 ml. Έπειτα προσθέτουμε 5 μl από το προϊόν της αντίδρασης λιγάσης και ανακινούμε ελαφρώς. Αφήνουμε τα δείγματα στον πάγο για 30 min, μετά τα τοποθετούμε σε υδατόλουτρο στους 42°C για 90 sec ακριβώς και μετά ξανά στον πάγο για 2 min. Ακολουθεί η μεταφορά 200 μl μετασχηματισμένων κυττάρων σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες των 15 ml με 800 μl

LB Broth και επωάζουμε στις 180 στροφές / min στους 37°C για 1h. Επιστρώνουμε 200 μl κάθε καλλιέργειας σε τριβλίο με LB Agar εμπλουτισμένο με 100 μg/ml αμπικιλίνη και προσθέτουμε 12 μl X- Gal (50 mg/ml, Promega, USA). Ακολούθησε επώαση των τριβλίων στους 37 °C για όλη τη νύχτα (overnight). Την επόμενη μέρα συλλέχθηκαν 2-3 λευκές (ανασυνδυσασμένες) αποικίες από κάθε τριβλίο και μεταφέρθηκαν σε 3 ml LB Broth με 100 μl / ml αμπικιλίνη. Οι υγρές καλλιέργειες επωάστηκαν στους 37°C στις 210 στροφές / min για όλη τη νύχτα (overnight). Τέλος, πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του Nucleospin Plasmid (Macherey – Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με EcoRI:

Πραγματοποιούμε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI, προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την ένθεση του DNA στον πλασμιδιακό φορέα. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 2 μl πλασμιδιακού DNA, 2 μl 10 x Buffer, 1 μl περιοριστικού ενζύμου EcoRI (Takara, Japan) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 20 μl. Το μίγμα επωάζεται για 1h στους 37°C. Ολόκληρο το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, αφού προστεθούν 3 μl 10x Loading Buffer. Ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε το 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε τάση 120 Volts περίπου για 1h.

3.7 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Τα κλωνοποιημένα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία CEMIA (CEMIA, Λάρισα). Για την αντίδραση αλληλούχισης των κλωνοποιημένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν σαν εκκινητές αλληλουχίες των T7 και SP6 του πλασμιδιακού φορέα, που βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης ένθεσης του τμήματος DNA. Μετά την απόκτηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα τους με αλληλουχίες στελεχών βακτηρίου, με τη βοήθεια του BLAST.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αφού οι μέθοδοι συγκέντρωσης των βακτηρίων *Pseudomonas aeruginosa* ολοκληρώθηκαν, από τα δείγματα του νερού σε τελικό όγκο 2 ml, ακολούθησαν μοριακές τεχνικές με στόχο την ανίχνευση των βακτηρίων ψευδομονάδας που περιελάμβαναν τα στάδια της εκχύλισης, της PCR και της ηλεκτροφόρησης.

4.1 ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΝΕΡΟΥ ΓΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Σε κάθε δείγμα εφαρμόστηκε PCR για *Pseudomonas aeruginosa* (Πίνακας 11). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι από τα 29 δείγματα νερού τα 8 ήταν θετικά, ενώ στα υπόλοιπα 21 που εξετάστηκαν με τις παραπάνω μεθόδους και τεχνικές δεν ανιχνεύτηκε *Pseudomonas aeruginosa*. Επιπλέον η διαδικασία που ακολουθήσαμε ανίχνευσε την *Pseudomonas aeruginosa* και στα πέντε επιβεβαιωμένα με καλλιέργεια δείγματα θετικά για το βακτήριο.

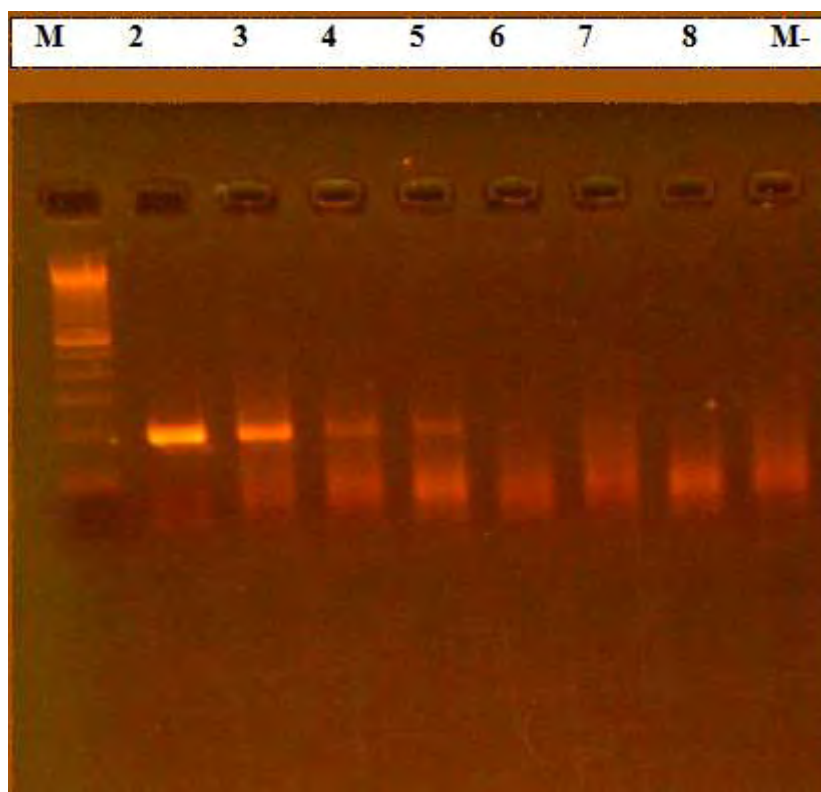
Δείγμα	Ημερομηνία συλλογής	<i>P. aeruginosa</i> PA722F / PA899R
NTR1	23/6/2008	+
PL2	24/6/2008	-
AGK3	25/6/2008	-
AG4	26/6/2008	+
ARM5	27/6/2008	-
KR6	28/6/2008	-
SX7	28/6/2008	-
BRT8	29/6/2008	-
SER9	30/6/2008	-
KAT10	30/6/2008	+

KAL11	1/7/2008	-
ITEA12	1/7/2008	+
OMRF13	2/7/2008	-
GIAN14	2/7/2008	-
IOAN15	4/7/2008	+
BIPE16	4/7/2008	-
AVRA17	5/7/2008	+
SAM18	5/7/2008	-
ZAG19	5/7/2008	-
LAR20	6/7/2008	-
LOUT21	6/7/2008	-
BOL22	7/7/2008	-
KOZ23	7/7/2008	-
SKAL24	8/7/2008	-
NEAP25	8/7/2008	-
THES26	9/7/2008	+
R1	8/11/2009	+
R2	8/11/2009	-
R3	8/11/2009	-
Σύνολο θετικών δειγμάτων		8
Ποσοστό θετικών		25,8%

Πίνακας 11. Αποτελέσματα ανίχνευσης για την *P. aeruginosa* στα δείγματα νερού

4.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΗΣ PCR

Για τον έλεγχο της ευαισθησίας της μεθόδου και της PCR με τους εκκινητές PA722F και PA899R έγιναν τα εξής: κλωνοποίηση της ζώνης από το θετικό μάρτυρα και εφαρμογή της PCR σε διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις του πλασμιδίου. Όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 8, η ευαισθησία της μεθόδου προσδιορίστηκε μέσω PCR στην 10^{-7} αραιώση του πλασμιδίου (η τελευταία αραιώση που έδωσε θετικό αποτέλεσμα). Στο πηγαδάκι N^ο1 βρίσκεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους, στα επόμενα πηγαδάκια από N^ο2 έως N^ο8 έχουν γίνει οι σειριακές αραιώσεις του πλασμιδίου από 10^{-4} έως 10^{-10} , ενώ στο τελευταίο πηγαδάκι N^ο9 βρίσκεται ο αρνητικός μάρτυρας το H₂O.



Εικόνα 8. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR με ζεύγος εκκινητικών μορίων PA722F – PA899R για έλεγχο ευαισθησίας στις σειριακές αραιώσεις του πλασμιδίου από 10^{-4} έως 10^{-10} . M: μάρτυρας μοριακού βάρους [100bp DNA Ladder (Invitrogen, UK)], 2-8: διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις του πλασμιδίου από 10^{-4} έως 10^{-10} , M(-): αρνητικός μάρτυρας (νερό).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η *Pseudomonas aeruginosa* (ψευδομονάδα) είναι ένα Gram αρνητικό αερόβιο βακτήριο και περιλαμβάνει πολλά είδη, από τα οποία τα περισσότερα ζούν ελεύθερα στο χώμα, το νερό, τη θάλασσα, κτλ.

Το γένος *Pseudomonas*, υπάγεται στην οικογένεια *Pseudomonadaceae*, και αποτελεί την rRNA ομάδα I στην ταξινόμηση των ψευδομονάδων με βάση την ομολογία του ριβοσωμικού RNA.

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 αυτή η ιδιότητα χρησιμοποιείται για το χαρακτηρισμό του είδους. Οι τροφικές απαιτήσεις του βακτηρίου είναι ελάχιστες, ενώ είναι δυνατόν να χρησιμοποιήσει το ατμοσφαιρικό CO₂ ως μόνη πηγή άνθρακα και το αμμώνιο ως πηγή αζώτου. Η παγκόσμια κατανομή των ψευδομονάδων υποδεικνύει αξιοσημείωτη προσαρμοστικότητα όσον αφορά στη φυσιολογία και τη γενετική αυτών των μικροοργανισμών σε αρκετά μεγάλο βαθμό (Spiers et al., 2000).

Ψευδομονάδες έχουν απομονωθεί από διάφορα περιβάλλοντα, όπως έδαφος, φυτά, λύματα, επιφανειακά νερά λιμνών και ποταμών, κυρίως από κρύο νερό οικιακής χρήσης, από το νερό πύργων ψύξεως, κολυμβητικές δεξαμενές, από βρύσες, αποχετεύσεις και σωλήνες νερού νοσοκομείων.

Η διεθνής βιβλιογραφία αποκαλύπτει ότι οι συγκεντρώσεις ορισμένων συστατικών που έχουν ανιχνευθεί σε εμφιαλωμένα νερά ανά τον κόσμο βρίσκονται σε ανησυχητικά υψηλά επίπεδα για διάφορες παραμέτρους (Karamanis et al., 2007). Επίσης αρκετές μελέτες έχουν τεκμηριώσει την ανίχνευση κολοβακτηριδίων και ετερότροφων βακτηρίων στο εμφιαλωμένο νερό σε μετρήσεις που υπερβαίνουν τα εθνικά και διεθνή πρότυπα που έχουν καθοριστεί για το νερό που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση (Bharath et al., 2003; Kokkinakis et al., 2008).

Το συχνότερο είδος ψευδομονάδας που προκαλεί νόσο στον άνθρωπο είναι η *Pseudomonas aeruginosa*. Η ικανότητα αυτής της ψευδομονάδας να αποικίζει διάφορους περιβαλλοντικούς χώρους έχει ως συνέπεια η ψευδομονάδα αυτή να είναι η αιτία πολλών ενδονοσοκομειακών και μη λοιμώξεων.

Η μικροβιολογική διάγνωση της νόσου περιλαμβάνει μεγάλο φάσμα μεθόδων με ποικίλη ευαισθησία. Η καλλιεργητική μέθοδος θεωρείται ως μια πολύ αξιόπιστη τεχνική για την απομόνωση και διάγνωση των ειδών *Pseudomonas*. Η αξία της ωστόσο υποβαθμίζεται εξαιτίας του μεγάλου χρόνου επώασης και της χρήσης εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων.

Από τις άλλες μεθόδους οι μοριακές και ειδικά η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) με τις παραλλαγές της, χρησιμοποιούνται πολύ γιατί έχουν μεγάλη ευαισθησία, ανιχνεύουν όλα τα είδη Ψευδομονάδας, αλλά το σημαντικότερο ο εργαστηριακός χρόνος είναι πολύ μικρός, λιγότερο από 4 ώρες.

Έτσι σε θετικά αποτελέσματα μπορεί να απαγορευτεί άμεσα η χρήση αυτού του νερού, να εξαλειφθεί κάθε έκθεση σε αυτό: π.χ. απαγόρευση χρήσης ντους, κολυμβητικών πισινών, υδρομασάζ κλπ. Συγχρόνως επιβάλλεται άμεσα να ληφθούν μέτρα προστασίας των ανθρώπων π.χ. να απολυμανθεί το δίκτυο και να αλλάξουν τις εστίες μόλυνσης (βρύσες, ψεκαστήρες κλπ). Τέτοιοι σωλήνες θα πρέπει να αντικαθίστανται τακτικά, ειδικά αν χρησιμοποιείται ζεστό νερό, αφού τέτοια συστήματα ζεστού νερού υποστηρίζουν την ανάπτυξη βακτηρίων, όπως της *E.coli*, της *P. aeruginosa*, ειδών της *aeromonas sp* και της *Legionella spp.* (Legnani et al., 1999; Leclerc et al., 2002). Απολυμαντικά μέτρα είναι πολύ σημαντικά για την καταπολέμηση των μικροοργανισμών. Χημική απολύμανση (χλωρίο, διοξειδίο του χλωρίου, όζον) και ακτινοβολία UV αποτελούν τις πιο σύνηθες τεχνικές απολύμανσης του νερού στα εργοστάσια ύδρευσης της Ευρώπης. Απεδείχθη ότι τέτοιες επεξεργασίες μπορούν να έχουν αποτελεσματικότητα όσο αφορά την απολύμανση (WHO, 2004b).

Όπως έχει αναφερθεί ήδη, σκοπός αυτής της πειραματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη μεθοδολογίας για την ανίχνευση και μοριακό χαρακτηρισμό της *Pseudomonas aeruginosa* σε εμφιαλωμένα και πόσιμα νερά.

Στην παρούσα εργασία συλλέχθηκαν 29 δείγματα πόσιμου νερού, από διάφορες περιοχές της Ελλάδος, προκειμένου να ανιχνευτεί ψευδομονάδα *Pseudomonas aeruginosa*. Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων βρέθηκαν 8 δείγματα θετικά. Τα περισσότερα από αυτά (πέντε) προέρχονταν από δίκτυα ύδρευσης, επιβεβαιώνοντας ότι η *P. aeruginosa* μπορεί να ευδοκιμεί σε διάφορα περιβάλλοντα, ανιχνεύεται σε συστήματα και κρύου και ζεστού νερού. Τα υπόλοιπα τρία θετικά δείγματα εντοπίστηκαν σε εργοστάσιο επεξεργασίας τροφίμων, σε πόσιμο και σε εμφιαλωμένο νερό. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με πολλές μελέτες που έδειξαν ότι χάρη στην καλή προσαρμοστικότητα της και στην ευκολία με την οποία πολλαπλασιάζεται, η *P. aeruginosa* έχει ανιχνευτεί σε εμφιαλωμένα νερά και σε νερά βρύσης (Pellett et al., 1983; Hunter P.R., 1993; Romling et al., 1994; Ganguli A. and Tripathi A.K., 1999; Aoi et al., 2000), σε μη επεξεργασμένο-εμφιαλωμένο μεταλλικό νερό (Hunter P.R., 1993; Naze et al., 2010), σε συστήματα διανομής νερού (Emde et al., 1992), σε οικιακές υδραυλικές εγκαταστάσεις (Eboigbodin et al., 2008; Keevil C.W., 2002) και σε δίκτυα ύδρευσης (Wingender et al., 2009). Εξαιτίας των δεδομένων ότι, το εμφιαλωμένο νερό κατά γενική ομολογία δεν είναι απολυμασμένο, ούτε το πόσιμο νερό από διάφορες πηγές

είναι αποστειρωμένο αλλά και τα συστήματα διανομής νερού αποτελούν ένα περιβάλλον με πλούσιο βακτηριακό πληθυσμό, έχουν ορισθεί ορισμένες προδιαγραφές με στόχο να προστατέψουν την Δημόσια Υγεία.

Η προστασία του πόσιμου νερού αποτελεί στόχο Εθνικής και Κοινοτικής πολιτικής και υπόκειται σε συμφωνίες υποχρεωτικού χαρακτήρα με σκοπό τη διατήρηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του, ώστε να διασφαλίζεται η προστασία της Δημόσιας Υγείας. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης θα πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ ορισμένων αποδεκτών ορίων, που αποτελούν και τα πρότυπα ποιότητας του νερού, θεσπίζονται δε νομοθετικά.

Στην Ελλάδα τα πρότυπα αυτά έχουν καθορισθεί με την Οδηγία 98/83 Ε.Κ. και αναφέρονται στην Κοινή Υπουργική Απόφαση (ΚΥΑ) Υ2/2600/2001 (ΦΕΚ 892/ 11.7.2001).

Με την Νέα Οδηγία έχουν γίνει τροποποιήσεις σχετικά με τα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά και έχουν καθορισθεί:

A. παραμέτροι που έχουν άμεση σημασία για την προστασία της ανθρώπινης υγείας (υποχρεωτικές παράμετροι) και περιλαμβάνουν μικροοργανισμούς που δεν είναι παθογόνοι από μόνοι τους, αλλά η παρουσία τους επισημαίνει ενδεχομένως την παρουσία ή τη δυνατότητα παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών και

B. παραμέτροι που αναφέρονται σαν ενδεικτικές παράμετροι δηλαδή που από μόνες τους δεν εμφανίζουν κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία, αλλά η παρουσία τους παρέχει σαφείς ενδείξεις μεταβολών στην ποιότητα του νερού και την ενδεχόμενη ανάγκη επανορθωτικών δράσεων κατά τρόπο ώστε να προστατεύεται η ανθρώπινη υγεία. Οι τιμές αυτές έχουν καθορισθεί μόνο για λόγους παρακολούθησης.

Υποχρεωτικές παράμετροι σύμφωνα με τη νέα Οδηγία είναι, όπως φαίνεται και στον πίνακα 12, η *E. coli* και οι Εντερόκοκκοι, για δε το νερό που πωλείται σε φιάλες ή δοχεία είναι η *E. coli*, οι Εντερόκοκκοι, η *P. aeruginosa* και οι κοινοί μεσόφιλοι μικροοργανισμοί στους 22°C και 37°C.

Ενδεικτικές παράμετροι είναι οι κοινοί μεσόφιλοι μικροοργανισμοί στους 37°C και, 22°C, τα ολικά κολοβακτηριοειδή και το *Cl perfringens* (βλαστικές μορφές και σπόροι), όταν το νερό προέρχεται ή επηρεάζεται από επιφανειακά νερά (πίνακας 13).

Για το νερό	
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΤΙΜΗ
<i>E.coli</i>	0/100 ml
<u>Εντερόκοκκοι</u>	0/100 ml

Για το νερό που πωλείται σε φιάλες	
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	ΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΤΙΜΗ
<i>E.coli</i>	0/250 ml
Εντερόκοκκοι	0/250 ml
<i>P. Aeruginosa</i>	0/250 ml
Ολικός αριθμός κοινών αεροβίων μικροβίων 22oC	100/ml
Ολικός αριθμός κοινών αεροβίων μικροβίων 37oC	20/ml

Πίνακας 12. Υποχρεωτικές Μικροβιολογικές παράμετροι

Παράμετρος	Παραμετρική τιμή	Μονάδα	Σημειώσεις
<i>Clostridium perfringens</i> (+ σπόρια)	0	αρ/100ml	
Κολοβακτηριοειδή	0	αρ/100ml	
Αριθμός αποικιών σε 22° C και 37° C	Χωρίς ασυνήθη μεταβολή		αρ/ml
Χρώμα	Αποδεκτό στους καταναλωτές και χωρίς ασυνήθη μεταβολή		
Αγωγιμότητα	2500	μS cm ⁻¹ /20° C	
Συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου	≥ 6,5 και ≤ 9,5	Μον. pH	
Σίδηρος	200	μg/l	
Μαγγάνιο	50	μg/l	
Οσμή	Αποδεκτή στους καταναλωτές και χωρίς ασυνήθη μεταβολή		
Οξειδωσιμότητα	5,0	mg/l O ₂	
Θειικά άλατα	250	mg/l	
Νάτριο	200	mg/l	
Γεύση	Αποδεκτή στους καταναλωτές και χωρίς ασυνήθη μεταβολή		
Ολικός οργανικός άνθρακας (TOC)	Χωρίς ασυνήθη μεταβολή		
Αργίλιο	200	mg/l	
Αμμόνιο	0,50	mg/l	

Χλωριούχα άλατα	250	mg/l
Υπολειμματικό χλώριο		mg/l
Θολότητα	Αποδεκτή στους καταναλωτές και χωρίς ασυνήθη μεταβολή	
ΡΑΔΙΟΕΝΕΡΓΕΙΑ		
Τρίτιο	100	becquerel/l
Ολική ενδεικτική δόση	0,10	mSv/χρόνο

Πίνακας 13. Ενδεικτικές παράμετροι

Για το νερό που πωλείται σε φιάλες

Προστίθεται μία νέα παράμετρος αυτή της *Pseudomonas aeruginosa*, οι δε παραμετρικές τιμές για *E.coli*, Εντεροκόκκους, *Pseudomonas aeruginosa* και ολικά κωλοβακτηριοειδή βασίζονται σε όγκο δείγματος νερού 250 ml για κάθε παράμετρο. Δίδονται δε παραμετρικές τιμές για την παράμετρο του ολικού αριθμού κοινών αεροβίων μικροβίων στους 37°C και 22°C. Οι αλλαγές αυτές έγιναν για την εξασφάλιση της άψογης ποιότητας του πόσιμου νερού που παραμένει για αρκετό χρονικό διάστημα στις φιάλες ή τα δοχεία. Δηλαδή οι τιμές αυτές είναι αυστηρότερες από αυτές που αφορούν τα περισσότερα νερά τα προοριζόμενα για ανθρώπινη κατανάλωση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εργασίας μας, είναι υπαρκτός ο κίνδυνος μόλυνσης του πληθυσμού από ψευδομονάδα *Pseudomonas aeruginosa* μέσω των συστημάτων οικιακής χρήσης ζεστού ή κρύου νερού. Κρίνεται σκόπιμο επομένως, η απαγόρευση που υπάρχει από τη νομοθεσία στην χρήση αυτών των συστημάτων νερού από τον πληθυσμό, όταν ξεπερνιούνται τα όρια περιεκτικότητας με *Pseudomonas aeruginosa* στο δίκτυο ύδρευσης, να συνεχίσει να εφαρμόζεται πιστά και με ακρίβεια. Συγχρόνως θα πρέπει άμεσα να ληφθούν τεχνικά μέτρα προστασίας π.χ. να απολυμανθεί το δίκτυο, να αλλάξουν τις εστίες μόλυνσης (βρύσες, ψεκαστήρες κλπ). Η απαγόρευση αναθεωρείται μετά την εκτέλεση των έργων αφού επαναληφθούν οι έλεγχοι και τα αποτελέσματα επιβεβαιωθούν ως αρνητικά.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allen, M.J., Edberg, S.C., Reasoner, D.J., 2004.** Heterotrophic plate count bacteria-what is their significance in drinking water? *International Journal of Food Microbiology* 92, 265-274.
- Amy, P.S., Haldeman, D. L., Ringelberg, D., Hall, D.H. and Russell, C. (1992)** Comparison of identification systems for classification of bacteria isolated from water and endolithic habitats within the deep subsurface. *Appl Environ Microbiol* 58:3367-3373.
- Annaïsie, EJ, Penzak, SR, Dignani, C. (2002)** The hospital water supply as a source of nosocomial infections; a plea for action. *Arch. Intern Med.* **162**:1483-1492.
- Anuj, S.N., Whiley, D.M., Kidd, T.J., Bell, S.C., Wainwright, C.E., Nissen, M.D. and 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.
- Aoi, Y., Nakata, H., Kida, H., 2000.** Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from Ushubetsu River water in Hokkaido, Japan. *Jpn. J. Vet. Res.* 48, 29-34.
- Armstrong, D.S., Grimwood, K., Garzino, R., Carlin, J.B., Olinsky, A. and Phelan, P.D. (1995)** Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis. *BMJ* 310, 1571-1572.
- ASHRAE Standard, 2000.** Minimizing the risk of legionellosis associated with buildingwater systems. ASHRAE Guideline 12-2000. American Society of Heating, Refrigeration and Air-Conditioning Engineers, Inc., Atlanta.
- Bahme, J. B. and Schroth, M. N., 1987.** Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potato. *Phytopathology* 77:1093–1100.
- Barwick RS, Levy DA, Craun GF, Beach MJ, Calderon RL. (2000)** Surveillance for waterborne disease outbreaks in United States, 1997-1998. In: CDC Surveillance Summaries, May 26, 2000. *MMWR* 2000;49 (No. SS-4):1-34.
- Baumgartner A., Grand M:** Bacteriological quality of drinking water from dispenser (coolers) and possible control measures. *J Food Prot* 2006, 69:3043-3046.
- Bert, F., Maubec, E., Bruneau, B., Berry, P. and 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.
- Berthelot, P., Grattard, F., Mahul, P., Pain, P., Jospe, R., Venet, C., Carricajo, A., Aubert, G. et al. (2001)** Prospective study of nosocomial colonization and infection due to

Pseudomonas aeruginosa in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med* 27, 503-512.

Bharath, J., Mosodeen, M., Motilal, S., Sandy, S., Sharma, S., & Tessaro, T., et al. (2003). Microbial quality of domestic and imported brands of bottled water in Trinidad. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 53–62.

Block, J.C., 1982. Removal of bacteria and viruses by ozonation. In: Masschelein, W.J. (Ed.), *Ozonation Manual for Water and Waste Water Treatment*. John Wiley, Toronto, pp.66-68.

Bodey PG, Jadeja L, and Elting L. (1985). *Pseudomonas bacteremia*. Retrospective analysis of 410 episodes. *Archives of Internal Medicine*. 1985,145:1621-9.

Brewer CS, Wunderink GR, Jones BC, and Leeper VK. Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest*. 1996, 109:1019-29.

Bukanov, N., Ravi, N.V., Miller, D., Srivastava, K. and Berg, D.E. (1994) *Pseudomonas aeruginosa* corneal ulcer isolates distinguished using the arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting method. *Curr Eye Res* 13:783-790.

Casani, S., Knochel, S., 2002. Application of HACCP to water reuse in the food industry. *Food Control* 13, 315-327.

Casas I, L. Powell, P. E. Klapper, and G. M. Cleator. 1995. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Meth.* 53:25-36.

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.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Available online: <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no4/adobe/v4n4.pdf>

Chandrasekar, P.H., Rolston, K.V., Kannangara, D.W., Le Frock, J.L. and Binnick, S.A. (1984) Hot tub-associated dermatitis due to *Pseudomonas aeruginosa*. Case report and review of the literature. *Arch Dermatol* 120, 1337-1340.

Clark, J.A., Burger, C.A., Sabatinos, L.E., 1982. Characterization of indicator bacteria in municipal raw water, drinking water, and new main water samples. *Can. J. Microbiol.* 28, 1002-1013.

Clerc, A., Manceau, C. and Nesme, X. (1998). Comparison of Randomly Amplified Polymorphic DNA with Amplified Fragment Length Polymorphism to assess genetic diversity and genetic relatedness within genospecies III of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1180-1187.

- Cobben, N.A., Drent, M., Jonkers, M., Wouters, E.F., Vaneechoutte, M. and Stobberingh, E.E. (1996)** Outbreak of severe *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections due to contaminated nebulizers. *J Hosp Infect* 33, 63-70.
- Conzalez, A.J., Rodicio, M.R., Mendoza, M.C., 2003.** Identification of an Emergent and Atypical *Pseudomonas viridiflava* Lineage Causing Bacteriosis in Plants of Agronomic Importance in a Spanish Region. *Applied and Environmental Microbiology*, 2936-2941.
- Craun, G., 1985.** A summary of waterborne illness transmitted through contaminated groundwater, *Journal of Environmental Health* 48, 122-127.
- da Silva Filho LVF, Levi JE, Bento CNO, Ramos SRTS, Rozov T.** PCR identification of *Pseudomonas aeruginosa* and direct detection in clinical samples from cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol* 1999;48:357-61.
- da Silva Filho LVF, Taneto AF, Martins KM, et al.** The combination of PCR and serology increases the diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infection in cystic fibrosis. *Ped Pulmonol* 2007;42:938-44.
- da Silva Filho LVF, Tateno AF, Velloso LDF, et al.** Identification of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, and *Stenotrophomonas maltophilia* in respiratory samples from cystic fibrosis patients using multiplex PCR. *Ped Pulmonol* 2004;37:537-47.
- De Vos, D., Lim, A. Jr, Pirnay, J.P., Struelens, M., Vandenvelde, C., Duinslaeger, L. et al. (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.
- Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31.** Attuazione della direttiva 98/83/CE relative alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana*. Supplemento n. 52 del 3 marzo 2001.
- Deschaght P, De Baere T, Van Simaey L, et al.** 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* 2009;9:244.
- Doring, G., Ulrich, M., Muller, W., Bitzer, J., Schmidt-Koenig, L., Munst, L. et al. (1991)** Generation of *Pseudomonas aeruginosa* aerosols during handwashing from contaminated sink drains, transmission to hands of hospital personnel and its prevention by use of a new heating device. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 191, 494-505.
- Drenkard, E., Ausubel, F.M., 2002.** *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416 (6882), 740-743.
- Dubois, V., Arpin, C., Melon, M., Melon, B., Andre, C., Frigo, C. and Quentin, C. (2001).** Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12 :

Efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of β -lactam resistance. J. Clin. Microbiol. 39:2072-2078.

Eboigbodin, K.E., Seth, A., Biggs, C.A., 2008. A review of biofilms in domestic plumbing. J. Am. Water Works Assoc. 100 (10), 131-138.

Elguindi, J., Wagner, J., Rensing, C., 2009. Genes involved in copper resistance influence survival of *Pseudomonas aeruginosa* on copper surfaces. J. Appl. Microbiol. 106, 1448-1455.

Elomari, M., Coroler, L., Izard, D. and Leclerc, H. (1995) A numerical taxonomic study of fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters. J. Appl. Bacteriol. 78:71-81.

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

Emtiazi, F., Schwartz, T., Marten, S.M., Krolla-Sidenstein, P., Obst, U., 2004. Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration. Water Res. 38, 1197-1206.

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 I. 330, 32-54.

European Council Directive 98/83/EC of 3 November, 1998. On the quality of water intended for human consumption. Official J Europ Commun 330:32-54.

Exner, M., Hartemann, P., 2009. Summary of the second meeting of the International Forum on Water Hygiene in Buildings (IFOWAHB) from 01 to 02.06.2007 in Stockholm. Int. J. Hyg. Environ. Health 212, 449-458.

Farmer, J.J., Weinstein, R.A., Zierdt, C.H. and Brokopp, C.D. (1982). Hospital outbreaks caused by *Pseudomonas aeruginosa*: importance of serogroup O11. J. Clin. Microbiol. 16:266-270.

Feizabadi, M.M., Majnooni, A., Nomanpour, B., Fatolahzadeh, B., Raji, N., Delfani, S. et al. (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. and 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.

Filali, B.K., Taoufik, J., Zeroual, Y., Dzairi, F.Z., Talbi, M., Blaghen, M., 2000. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. Curr. Microbiol. 41, 151-156.

Food and Drug Administration, 1995. Beverages: Bottled Water; Final Rule. Federal Register, 21 CFR Part 103 et al. 60, 57075-57130.

Food and Drug Administration (FDA) (2008). 21 CFR part 165: Beverages: Bottled water. FDA.

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 fluorescent probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus spp.* And *Escherichia coli* in water samples. Journal of Microbiological Methods 52, 123-131.

Frederiksen B, Koch C, Hoiby N. Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 1997;23:330-5.

Fukushima, M., Kakinuma, K. and Kawaguchi, R. (2002) Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. J Clin Microbiol 40, 2779-2785.

Ganguli, A., Tripathi, A.K., 1999. Survival and chromate reducing ability of *Pseudomonas aeruginosa* in industrial effluents. Lett. Appl. Microbiol. 28, 76-80.

Geuenich, H.H., Muller, H.E. (1984). Occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in wastewater and behavior under biological treatment. Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiol. Hyg. [B]. 179:259-265.

Govan J.R.W. and Fyfe J.A.M. Mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*: The influence of culture medium on the stability of mucus production. J. Med. Microbiol. 8: 513-22, 1975.

Granstrom, M., Ericsson, A., Strandvik, B., Wretling, B., Pavlovskis, O.R., Berka, R. and Vasil, M.L. (1984) Relation between antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins and colonization/infection in patients with cystic fibrosis. Acta Paediatr Scand 73, 772-777.

Green, S.K., Schroth, M.N., Cho, J.J., Kominos, S.K., Vitanza-jack, V.B., 1974. Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Microbiol. 28, 987-991.

Griese M, Muller I, Reinhardt D. Eradication of initial *Pseudomonas aeruginosa* colonization in patients with cystic fibrosis. Eur J Med Res 2002;7:79-80.

- 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.
- Güler, C. (2007).** Evaluation of maximum contaminant levels in Turkish bottled drinking waters utilizing parameters reported on manufacturer's labeling and government-issued production licenses. *Journal of Food Composition Analysis*, 20, 262–272.
- Haase, A., Melder, A., Smith-Vaughan, H., Kemp, D. and Currie, B. (1995a)** RAPD analysis of isolates of *Burkholderia pseudomallei* from patients with recurrent melioidosis. *Epidemiol Infect* 115:115-121.
- Hambusch, B., Sacré, C., Wagner, I., 2004.** Heterotrophic plate count and consumer's health under special consideration of water softeners. *Int. J. Food Microbiol.* 92, 365-373.
- Hardalo, C., Edberg, S.C., 1997.** *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.* 23 (1), 47-75.
- Havelaar, A.H., Bosman, M. and Borst, J. (1983).** Otitis externa by *Pseudomonas aeruginosa* associated with whirlpools. *J. Hyg.* 90:489-498.
- Hrudley SE, Hrudley EJ:** Published case studies of waterborne disease outbreaks-evidence of a recurrent threat. *Water Environ Res* 2007, 79:233-245.
- Hsueh, P-R., Teng, L-J., Pan, H-J., Chen, Y-C., Sun, C-C., Ho, S-W. and Luh, K-Y. (1998)** Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bacteremia among oncology patients. *J. Clin. Microbiol.* 36:2914-2917.
- Hunter, P.R. (1993)** The microbiology of bottled natural mineral waters. *J Appl Bacteriol* 74, 345-352.
- Jones AQ, Majowicz SE, Edge VL, Thomas MK, MacDougall L, Fyfe M, Atashband S, Kovacs SJ:** Drinking water consumption patterns in British Columbia: an investigation of associations with demographic factors and acute gastrointestinal illness. *Sci Total Environ* 2007, 388:54-65.
- Karadzic, I., Masui, A., Zivkovic, L.I. and 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 Biosci Bioeng* 102, 82-89.
- Karamanis, D., Stamoulis, K., & Ioannides, K. G. (2007)** Natural radionuclides and heavy metals in bottled water in Greece. *Desalination*, 213, 90–97.
- Karpati F., Jonasson J.** Polymerase chain reaction for the detection of *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia* in sputum of patients with cystic fibrosis. *Mol Cell Probes* 1996;10:397-403.

- Keevil, C.W., 2002.** Pathogens in environmental biofilms. In: Bitton, G. (Ed.), Encyclopedia of environmental microbiology, 4. John Wiley & Sons, New York, pp. 2339-2356.
- Khan, A.A and 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. and 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.
- Kilb, B., Lange, B., Schaule, G., Flemming, H.-C., Wingender, J., 2003.** Contamination of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves. Int. J. Hyg. Environ. Health 206, 563-573.
- Kimata, N., Nishimo, T., Suzuki, S., Kogure, K., 2004.** *Pseudomonas aeruginosa* isolated from marine environments in Tokyo Bay. Microb. Ecol. 47, 41-47.
- Kokkinakis, E., Fragkiadakis, G. A., & Kokkinaki, A. (2008).** Monitoring microbiological quality of bottled water as suggested by HACCP methodology. Food Control, 19, 957–961.
- Kuo, H. W., Chiang, T. F., Lo I. I., Chan, C. C., Lai, J. S., Wang J. D. (1997).** Exposure assessment of volatile organic compounds from water in Taiwan Metropolitan and petrochemical areas. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 59, 708–714.
- Lambert, V., 1993.** Bottled water – new trends, new rules. FDA Consumer June, 8-11.
- Lan, J., Zhang, X.H., Wang, Y., Chen, J. and Han, Y. (2008)** Isolation of an unusual strain of *Edwardsiella tarda* from turbot and establish a PCR detection technique with the gyrB gene. J Appl Microbiol 105, 644-651.
- Lashev, L., Lasarova, S., 2001.** Pharmacokinetics and side-effects of gentamicin in healthy and *Pseudomonas aeruginosa* infected sheep. J. Vet. Pharmacol. Ther. 24, 237-240.
- Lavenir R, Jocktane D, Laurent F, Nazaret S, Cournoyer B.** Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific ecfX gene target. J Microbiol Meth 2007;70:20-29.
- Leclerc, H., 2003.** Relationships between common water bacteria and pathogens in drinking water. In: Bartram, J., Cotruvo, J., Exner, M., Fricker, C., Glasmacher, A. (Eds.), Heterotrophic Plate Counts and Drinking Water Safety: The Significance of HPCs for Water Quality and Human Health. : WHO Emerging Issues in Water and Infectious Disease Series, Chapter 6. IWA Publishing, London.
- Leclerc, H., Schwartzbrod, L., Dei-Cas, E., 2002.** Microbial agents associated with waterborne diseases. Critical Reviews in Microbiology 28 (4), 371-409.

- Lee C.S., Wetzel K., Buckley T., Wozniak D. and Lee J.** Rapid and sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* in chlorinated water and aerosols targeting gyrB gene using real-time PCR. J. Appl. Microbiol 2011;0421:1364-5072.
- Lee, D.-G., Kim, S.-J., 2003.** Bacterial species in biofilm cultivated from the end of the Seoul water distribution system. J. Appl. Microbiol. 95, 317-324.
- 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.
- Lévesque B, Simard P, Gauvin D, Gingras S, Dewailly E, Letarte R:** Comparison of the microbiological quality of water coolers and that of municipal water systems. Appl Environ Microbiol 1994, 60:1174-1178.
- Li, X., Dorsch, M., Del Dot, T., Sly, L.I., Stackebrandt, E. and Hayward, A.C. (1993).** Phylogenetic studies of the rRNA group II *pseudomonads* based on 16S rRNA gene sequences. J. Appl. Bacteriol. 74:324-329.
- Lightfoot, N.F. (2003)** Bacteria of potential health effect in: World Health Organization (WHO). *Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety*. Edited by Bartram, J., Cotruvo, J., Exner, M., Glasmacher, A. Published by IWA Publishing, London, UK.
- Liguori G., Cavallotti I., Arnese A., Amiranda C., Anastasi D., Angelillo F.I.** Microbiological quality of drinking water from dispensers in Italy. *BMC Microbiol* 2010;10:19.
- Littlewood JM, Miller MG, Ghoneim AT, Ramsden CH.** Nebulised colomycin for early *pseudomonas* colonization in cystic fibrosis. Lancet 1985;1:865.
- Marlier, D., Mainil, J., Linde, A., Vindevogel, H., 2000.** Infectious agents associated with rabbit pneumonia: isolation of *amyxomatous myxoma* virus strains. Vet. J. 159, 171-178.
- Marshall JK, Thabane M, Garg AX, Clark WF, Salvadori M, Collins SM, The Walkerton Health Study Investigators:** Incidence and epidemiology of irritable bowel syndrome after a large waterborne outbreak of bacterial dysentery. Gastroenterology 2006, 131:445-450.
- Martin Barrasa, J.L., Lupiola Gomez, P., Gonzalez Lama, Z., Tejedor Junco, M.T., 2000.** Antibacterial susceptibility patterns of *Pseudomonas* strains isolated from chronic canine otitis externa. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health 47, 191-196.
- Maschmeyer, G. and Braveny, I. (2000).** Review of the incidence and prognosis of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cancer patients in the 1990s. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19:915-925.

- Moore, E.R.B., Mau, M., Arnscheidt, A., Bottger, E.C., Hutson, R.A., Collins, M.D. et al. (1996)** The determination and comparison of the 16S rRNA gene sequences of species of the genus *Pseudomonas* (sensu strict) and estimation of the natural intrageneric relationships. *Syst Appl Microbiol* 19, 478-492.
- Morais, P.V., Mesquita, C., Andrade, J.L. and Da Costa, M.S. (1997)** Investigation of persistent colonization by *Pseudomonas aeruginosa*-like strains in a spring water bottling plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:851-856.
- Morales, A., Garland, J.L., Lim, D.V., 1996.** Survival of potentially pathogenic human-associated bacteria in the rhizosphere of hydroponically grown wheat. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20, 155-162.
- Moritz, M.M., Flemming, H.-C., Wingender, J.** Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2010;213:190-197.
- Motoshima M, Yanagihara K, Fukushima K, et al.** Rapid and accurate detection of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis targeting *gyrB* gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;58:53-8.
- Nawrocki, J., Raczyk-Stanislawiak, U., Swietlik, J., Olejnik, A., Sroka, M.J., 2010.** Corrosion in a distribution system: steady water and its composition. *Water Res.* 44 (6), 1863-1872.
- Naze, F., Jouen, E., Randriamahazo, R.T., Simac, C., Laurent P., Bleriot, A. et al. (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.
- O'Reilly CE, Bowen AB, Perez NE, Sarisky JP, Shepherd CA, Miller MD, Hubbard BC, Herring M, Buchanan SD, Fitzgerald CC, Hill V, Arrowood MJ, Xiao LX, Hoekstra RM, Mintz ED, Lynch MF, The Outbreak Working Group:** A waterborne outbreak of gastroenteritis with multiple etiologies among resort island visitors and residents: Ohio, 2004. *Clin Infec Dis* 2007, 44:506-512.
- Ohtake, H., Kato, J., Kuroda, A., Taguchi, K. and Sakai, Y. (1996).** Chemotactic signal transduction network in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Molecular Biology of Pseudomonads*, ed. Nakarawa, T., Furukawa, K., Haas, D., Silver, S., ASM Press, Washington, D.C.
- Olczak-Woltman, H., Masny, A., Bartoszewski, G., Plucienniczak, A., Niemirowicz-Szczytt, K., 2007.** Genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans strains isolated from cucumber leaves collected in Poland. *Plant Pathology* 56(3): 373-382.

- Oliver, J.D., 2000.** The public health significance of viable but nonculturable bacteria. In: Colwell, R.R., Grimes, D.J. (Eds.), *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. ASM Press, Washington, D.C., pp. 277-300.
- Oliver, J.D., 2005.** The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 43, 93-100.
- Oliver, J.D., 2005.** Viable but nonculturable bacteria in food environments. In: Fratamico, P.M., Bhunia, A.K., Smith, J.L., (Eds). *Foodborne Pathogens – Microbiology and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Great Britain, p. 99.
- Palleroni, N.J., Kunisawa, R., Contopoulou, R., Doudoroff, M. (1993)** Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23:333-339.
- Parslow, R. C., McKinney, P. A., Law, G. R., Staines, A., Williams, R., Bodansky, J. (1997).** The incidence of childhood diabetes mellitus in Yorkshire, northern England, is associated with nitrate in drinking water: an ecological analysis. *Diabetologia*, 40, 550–556.
- Peace T, Mazumder A:** Tracking patterns of enteric illness in populations and communities. *Environ Health Perspect* 2007, 115:58-64.
- Pellet, S., Bigley, D.V. and Grimes, D.J. (1983)** Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a riverine ecosystem. *Appl Environ Microbiol* 45, 328-332.
- Pier G.B. and Thomas M.D.** Lipopolysaccharide and High molecular weight polysaccharide serotypes of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Inf. Dis.* 145: 217-223, 1982.
- Price, D., Ahearn, D.G. (1988)** Incidence and persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in whirlpools. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1650-1654.
- Qin, X., Emerson, J., Stapp, J., Stapp, L., Abe, P. and 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.
- Quittner, A.L., Modi, A.C., Wainright, C., Otto, K., Kirihara, J. and Montgomery, A.B. (2009)** Determination of the minimal clinically important difference scores for the cystic fibrosis questionnaire-revised respiratory symptom scale in two populations of patients with cystic fibrosis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. *Chest* 135, 1610-1618.
- Ratnam, S., Hogan, K., March, S.B., Butler R.W. (1986).** Whirlpool-associated folliculitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*: Report of an outbreak and review. *J. Clin. Microbiol.* 23:655-659.
- Ratjen F, Doring G, Nikolaizik WH.** Effect of inhaled tobramycin on early *Pseudomonas aeruginosa* colonization in patients with cystic fibrosis. *Lancet* 2001;358:983-4.
- Real Decreto 140/2003, 2003.** Royal Decree of 7 February, establishment of sanitary criteria of water quality for human consumption, BOE number 45, pp. 7228-7245. Spain.

- Reid, T.M. and Porter, I.A. (1981)** An outbreak of otitis externa in competitive swimmers due to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hyg (Lond)* 86, 357-362.
- Rello J, Rue M, Jubert P, Muses G, Sonora R, Valles J, Niederman SM.** Survival in patients with nosocomial pneumonial pneumonia: impact of the severity of illness and the etiologic agent. *Critical Care Medicine*. 1997, 25:1862-7.
- Relman, D.A., Schmidt, T.M., MacDermott, R.P. and Falkow, S. (1992)** Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med* 327, 293-301.
- Reynolds KA, Mena KD, Gerba CP:** Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Rev Environ Contam Toxicol* 2007, 192:117-158.
- Rhame, F. S. (1980)** The ecology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* p.31-51. In *Pseudomonas aeruginosa*. The organism, diseases it causes and their treatment. (ed.) Sabath, L.D. Hans Huber Publishers, Bern, Switzerland.
- Ritter, I., Solomon, K., Sibley, P., Hall, K., Keen, P., Mattu, G., Linton, B., 2002.** Sources, pathways, and relative risks of contaminants in surface water and groundwater: a perspective prepared for the Walkerton inquiry. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 65 (1), 1-142.
- Romling, U., Wingender, J., Muller, H., Tummler, B., 1994.** A Major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1734-1738.
- Rose CS, Martyny JW, Newman LS, Milton DK, King TE Jr, Beebe JL, McCammon JB, Hoffman RE, Kreiss K (1998)** "Lifeguard lung": Endemic granulomatous pneumonitis in an indoor swimming pool. *Am. J. Public Health* 88:1795-1800.
- Rossello-Mera, A. R.; Lalucat, J.; Garcia-Valdes, E., (1994).** Comparative biochemical and genetic analysis of naphthalene degradation among *Pseudomonas stutzeri* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (3), 966-972 (7 pages).
- Rusin, P.A., Rose J.B., Haas, C.N., Gerba C.P. (1997)** Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 152:57-83.
- Ruskin, R.H., Krishna, J.H., Beretta, G.A., 1991.** Microbiological quality of selected bottled water brands in the US Virgin Islands. In: Abstracts of the 91st General Meeting of the American Society for Microbiology, May 5-9, 1991, Dallas, TX, Q-246, p. 317.
- Sallal, A.K., Abu-Alteen, K.H., Jafri, A.M. (1989).** Enumeration of *Pseudomonas* species and *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages in domestic sewage. *Microbios.* 60:35-43.
- Samek, K. (2004).** Unknown quantity: the bottled water industry and Florida's springs. *Journal of Land Use*, 19 (2), 569–595.

- Sasser, M. and Miller, L. T., 1984.** Identification of *pseudomonads* by fatty acids profiling. 45–46. Sounion. Greece.
- Scandura, J.E., Sobsey, M.D., 1997.** Viral and bacterial contamination of groundwater from on-site sewage treatment systems. *Water Science and Technology* 35 (11). 141-146.
- Schaad N.W., 2001.** Initial identification of common genera. In: Schaad ND (ed) *Laboratory Guide for Identification of PlantPathogenic Bacteria* (pp 1-11). The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA
- Schneider, W., Rump, H.H., 1983.** Use of ozone in the technology of bottled water. *Ozone: Sci. Eng.* 5, 95-101.
- Schroth, M. N. and Hildebrand, D. C., 1981.** Phytopathogenic members of the genus *Pseudomonas*. 362–369.
- Schroth, M., Hildebrand, D., Panopoulos, N., 2006.** Phytopathogenic *pseudomonads* and related plant-associated *pseudomonads*, *The Prokaryotes* 3(3.3): 714-740.
- 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., Kohnen, W., Jansen, B., Obst, U., 2003.** Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol* 43(3), 325-335.
- Schwartz, T., Volkmann, H., Kirchen, S., Kohnen, W. Schon-Holz, K., Jansen, B. and 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.
- Semerjian, L. A. (2011).** Quality assessment of various bottled waters marketed in Lebanon. *Environmental Monitoring and Assessment*, 172, 277–285.
- Siegman-Igra Y, Ravona R, Primerman H, and 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*. 1998, 2:211-5.
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A.C., Levy, S. B. and Jackson, R. W. (2011),** *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35: 652–680. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x

Silva Filho LV, Tateno AF, Velloso LF, Levi JE, Fernandes S, Bento CN, et al. Identification of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, and *Stenotrophomonas maltophilia* in respiratory samples from cystic fibrosis patients using multiplex PCR. *Pediatr Pulmonol* 2004;37:537-47.

Smith, J.J., Scott-Craig, J.S., Leadbetter, J.R., Bush, G.L., Roberts, D. L. And Fulbright, D. W. (1994). Characterization of random amplified polymorphic DNA (RAPD) products from *Xanthomonas campestris* and some comments on the use of RAPD products in phylogenetic analysis. *Mol Phylogenet Evol* 3:135-145.

Sobsey, M.D., Bartram, S., 2003. Water quality and health in the new millennium: the role of the World Health Organization guidelines for drinking water quality. *Forum Nutr.*56, 396-405.

Sørensen, J., Skouv, J., Jørgensen, A. and Nybroe, O. (1992) Rapid identification of environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* and *P. putida* by SDS-PAGE analysis of whole-cell protein patterns. *FEMS Microbiol Ecol* 101: 41-50.

Spiers, A.J., Buckling, A. and Rainey, P.B. (2000) The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* 146:2345-2350.

Spilker T, Coenye T, Vandamme P, Lipuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2004;42:2074-9.

Subrayan, V., Peyman, M., Lek Yap, S., Mohamed Ali, N.A. and 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.

Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W., Schleifer, K.-H., 2000. Microbiological safety of drinking water. *Annual Review of Microbiology* 54, 81-127.

Todar K. (2004a). *Pseudomonas* and its relatives. In: *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. <http://textbookofbacteriology.net>.

Todar K. (2004b). *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. <http://textbookofbacteriology.net>.

Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Wolfs TFW. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2005;4:37-43.

Trautmann, M., Michalsky, T., Wiedeck, H., Radosavljevic, V. and 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.

TrinkwV 2001. Trinkwasserverordnung [Drinking Water Ordinance 2001]. Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch [Ordinance on water quality for human use]. Germany. http://bundesrecht.juris.de/bundesrecht/trinkwv_2001/gesamt.pdf.

USEPA, 1992. Seminar publication: control of biofilm growth in drinking water distribution systems. EPA/625/R-92/001. Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC. <http://www.p2pays.org/ref/15/14291.pdf>,

Valerius NH, Koch C, Hoiby N. Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis by early treatment. Lancet 1991;338:725-6.

Valles, J., Mariscal, D., Cortes, P., Colli, P., Villagra, A., Diaz, E. et al. (2004) Patterns of colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in intubated patients: a 3-year prospective study of 1.607 isolates using pulsed-field gel electrophoresis with implications for prevention of ventilator-associated pneumonia. Intensive Care Med 30, 1768-1775.

Van Belkum A, Render NH, Smith S, Overbeek SE, Verbrugh HA. Comparison of conventional and molecular methods for the detection of bacterial pathogens in sputum samples from cystic fibrosis patients. FEMS Immunol Med Microbiol 2000;27:51-7.

Villareal V.J., Schwartz T., Obst U. Culture-independent techniques applied to food industry water surveillance - A case study. Int J of food Microbiol 2010;141:147-155.

Völker S., Schreiber C., Kistemann T. Drinking water quality in household supply infrastructure- A survey of the current situation in Germany. Int J of Hyg and Env Health 2010;213:204-209.

Warburton, D.W., Austin, J.W., 1997. Bottled water. Chapter 34. In: Microbiology of Food. Chapman and Hall, London, (in press).

Warburton, D.W., Bowen, B., Konkle, A., 1994. The survival and recovery of *Pseudomonas aeruginosa* and its effect upon salmonellae in water: methodology to test bottled water in Canada. Can. J. Microbiol. 40. 987-992.

Warburton, D.W., Dodds, K.L., Burke, R., Johnston, M.A., Laffey, P.J., 1992. A review of the microbiological quality of bottled water sold in Canada between 1981 and 1989. Can. J. Microbiol. 38, 12-19.

Warburton, D.W., McCormick, J.K., Bowen, B., 1993. Survival and recovery of *Aeromonas hydrophila* in water: development of methodology for testing bottled water in Canada. Can. J. Microbiol. 40. 145-148.

Warburton, D.W., Peterkin, P.I., Weiss, K.F., Johnston, M.A., 1986. Microbiological quality of bottled water sold in Canada. Can. J. Microbiol. 32, 891-893.

- West, S.E., Zeng, L., Lee, B.L., Kosorok, M.R., Laxova, A., Rock, M.J. et al. (2002)** Respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis: early detection by serology and assessment of risk factors. *JAMA* 287, 2958-2967.
- 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, 2008.** Guidelines for Drinking Water Quality, vol. 1, 3rd ed. Geneva.
- Wiesemann HG, Steinkamp G, Ratjen F, Bauernfeind A, Przyklenk B, Doring G, et al.** Placebo-controlled, double-blind, randomized study of aerosolized tobramycin for early treatment of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1998; 25:88-92.
- Wilson, I.G., 1997.** Minireview: inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3741-3751.
- Wingender, J., Hamsch, B., Schneider, S., 2009.** Mikrobiologisch-hygienische Aspekte des Vorkommens von *Pseudomonas aeruginosa* im Trinkwasser. *Energie Wasser-Praxis* 60 (3), 60-66.
- Wolfgang, M.C., Kulasekara, B.R., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q. et al. (2003)** Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 8484-8489.
- Xu J, Moore JE, Murphy PG, Millar BC, Elborn JS.** Early detection of *Pseudomonas aeruginosa*-comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2004;3:21.
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D.L., Jackson, R.W., Vivian, A. and Harayama, S. (2000)** Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* 146, 2385-2394.
- Yoder, J., Blackburn, B., Craun, G., Hill, V., Levy, D., Chen, N., Lee, S., Calderon, R., Beach, M. (2004)** Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with recreational waters in United States, 2001-2002. In: *CDC Surveillance Summaries*, October 22, 2004. *MMWR* 2004;53 (No. SS-8) 1:22.
- Zanetti F, De Luca G, Sacchetti R:** Control of bacterial contamination in microfiltered water dispensers (MWDs) by disinfection. *Int J Food Microbiol* 2009, 128:446-452.

Zemanick ET, Wagner BD, Sagel SD, Stevens MJ, Accurso FJ, Harris JK. Reliability of quantitative real-time PCR for bacterial detection in cystic fibrosis airway specimens. PLoS One 2010;5:e15101.

Αντιγόνη Αρσένη. Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή διάγνωση των λοιμώξεων, Ψευδομονάδες, 4η έκδοση, Ιατρικές εκδόσεις << Ζήτα >>, 1994.

Αρσένη Α. (1996). Κλινική Μικροβιολογία & Εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων. Εκδόσεις Ζήτα Ιατρικές (τέταρτη έκδοση).

Δημητρακόπουλος Γ. Ιατρική Βακτηριολογία, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη, Αθήνα 1982.

Μ. Μήτρακας, « Επεξεργασία πόσιμου νερού », εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη, 2000.