

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
ΠΟΙΟΤΗΤΑ – ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *Pseudomonas aeruginosa* ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ
ΧΛΩΡΙΩΣΗ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΤΩΝΙΑ Π. ΘΕΟΦΙΛΟΥ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ
Τ.Ε.Ι. ΛΑΡΙΣΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2011

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

Καθηγήτρια
Καθηγητής
τ. Δ/ντρια Κ.Ε.Δ.Υ.

Αθηνά Μαυρίδου
Δρ. Βασίλειος Κρικέλης
Δρ. Παναγιώτα Γεωργίου Μπούφα

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Ερευνητικό εργαστήριο του Τ.Ε.Ι Αθηνών υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας Αθηνάς Μαυρίδου σε συνεργασία με το εργαστήριο Μοριακής αντοχής και τυποποίησης του Κεντρικού Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Αλκιβιάδη Βατόπουλου.

ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *Pseudomonas aeruginosa* ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΧΛΩΡΙΩΣΗ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε μια μοριακή μέθοδος για την τυποποίηση στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* σε χλωριωμένα δείγματα νερού, με σκοπό την καταγραφή των κλώνων που ενδημούν στο συγκεκριμένο περιβάλλον και επιπλέον τη μελέτη της διασποράς του βακτηρίου.

Απομονώσεις στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* τυποποιήθηκαν με την Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) μέθοδο, καθώς και με μια φαινοτυπική μέθοδο (Οροτυποποίηση). Το 36% των στελεχών τυποποιήθηκε και με τις δυο τυποποιητικές μεθόδους, ενώ το υπόλοιπο 64% δεν τυποποιήθηκε με τη μία ή την άλλη μέθοδο ή και με τις δυο. Η τυποποιητική ικανότητα των δυο μεθόδων συνεκτιμήθηκε.

Διαπιστώθηκε ότι η RAPD ανάλυση είναι μια γρήγορη και εύκολη μέθοδος για μια αρχική ομαδοποίηση των στελεχών, με ικανότητα τυποποίησης ενός σημαντικού ποσοστού στελεχών (35%) που δεν τυποποιήθηκαν με την οροτυποποίηση.

Σημαντικοί όροι της διπλωματικής εργασίας: *Pseudomonas aeruginosa*, περιβαλλοντικά στελέχη, RAPD, Οροτυποποίηση.

Typing of resistant to chlorination strains *Pseudomonas aeruginosa* by molecular methods

Abstract

A molecular method was applied for the typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains that were isolated from chlorinated water samples in order to identify and classify them and assess the spread of the bacterium in this environment.

Pseudomonas aeruginosa strains were subjected to Random Amplification of Polymorphic DNA and Serotyping. 36% of the strains were typeable by both typing methods while the remaining 64% were not typeable either by both or by each one of the typing methods. The typeability of the two typing methods was estimated. RAPD is considered as an easy and rapid typing method with high typeability (35% of the strains that were not typeable by serotyping have been successfully typed by the RAPD-PCR analysis).

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, environmental strains, Random Amplification of Polymorphic DNA, Serotyping

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	i
Κατάσταση πινάκων.....	ii
Κατάσταση εικόνων	iii
Συντμήσεις επιστημονικών όρων.....	v
1. Εισαγωγή	1
1.1 Γενικά	1
1.2 Βιολογικό υμένιο.....	3
1.3 Οικολογία.....	9
1.4 Ταξινόμηση.....	10
1.5 Παθογόνος δράση.....	13
1.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> και χλωριωμένο νερό	15
1.6.1 Γενικά.....	15
1.6.2 Ιδιότητες του χλωρίου.....	17
1.6.3 Χλωρίωση.....	19
1.6.4 Παραπροϊόντα της χλωρίωσης και επίπτωση στην υγεία	20
1.6.5 Αντοχή των μικροοργανισμών στα απολυμαντικά.....	21
1.6.6 Ισχύουσα νομοθεσία για την απολύμανση.....	23
1.6.7 Ικανότητα της <i>Ps. aeruginosa</i> να επιβιώνει στο χλωριωμένο νερό.....	24
1.7 Νομοθεσία για τον μικροβιολογικό έλεγχο <i>Ps. aeruginosa</i>	25
1.8 Επιδημιολογία	25
1.9 Σκοπός	32
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	33
2.1 Θρεπτικά υποστρώματα και αντιδραστήρια	33
2.2 Χημικά και ρυθμιστικά διαλύματα.....	35
2.3 Εξοπλισμός - Συσκευές.....	36
2.4 Στοιχεία δειγμάτων νερού.....	36
2.5 Ανίχνευση της <i>Ps. aeruginosa</i> στα δείγματα νερού.....	52
2.5.1 Καλλιεργητική μέθοδος ταυτοποίησης.....	52
2.5.1.1 Μέθοδος διήθησης μέσω μεμβρανών	53
2.5.1.2 Επιβεβαιωτικές δοκιμασίες	55
2.5.1.3 Υπολογισμός.....	55
2.6 Τυποποίηση στελεχών <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56
2.6.1 Φαινοτυπικές Μέθοδοι.....	58
2.6.1.1 Οροτυποποίηση.....	59
2.6.2 Μοριακές Μέθοδοι	63
2.6.2.1 Random Amplified Polymorphic DNA Ανάλυση	64
2.6.2.2 Random Amplified Polymorphic DNA Ανάλυση και <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	67
2.6.3 Απομόνωση Γενετικού Υλικού	69
2.6.3.1 Απομόνωση Γενετικού Υλικού με proteinase K (Da Silva Filho Luiz, 2001, Wilson T. <i>et al</i> , 2001).....	69
2.6.3.2 Απομόνωση Γενετικού Υλικού με έτοιμο σετ απομόνωσης (Kit QIAGEN)	69
2.6.3.3 Απομόνωση Γενετικού Υλικού με lysozyme (Rademaker L. W. Jan <i>et al</i> , 2000).....	70
2.6.4 Υλικά και συνθήκες της RAPD ανάλυσης.....	71
2.6.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης	72

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	73
3.1 Ταυτοποίηση αποικιών <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	73
3.2 Οροτυποποίηση στελεχών <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80
3.3 Μοριακή τυποποίηση των στελεχών <i>Pseudomonas aeruginosa</i> με RAPD-PCR.....	89
3.4 Σύγκριση των δυο τυποποιητικών μεθόδων	98
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	107
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	110

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στην Καθηγήτρια Α. Μαυρίδου για την ανάθεση του θέματος της παρούσας διπλωματικής εργασίας και την άρτια επιστημονική καθοδήγηση της. Η συμβολή της ήταν αδιάκοπη και ουσιαστική για την πραγματοποίηση της.

Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Βασίλειο Κρικέλη, ο οποίος υπήρξε πολύ καλός καθηγητής μου τόσο στο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Λάρισας, όσο και στο παρόν μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών, για τις καίριες υποδείξεις του.

Ιδιαίτερως ευχαριστώ την Δρ. Παναγιώτα Γεωργίου Μπούφα για τις επισημάνσεις της και κυρίως για τον καθοριστικό της ρόλο, στα πρώτα μου βήματα στην Περιβαλλοντική Μικροβιολογία.

Ιδιαίτερως οφείλω να ευχαριστήσω την Msc Παππά Όλγα για την αδιάκοπη και πολύπλευρη συμβολή της για την άρτια ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Η βοήθεια της ήταν ανεκτίμητη.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Υπεύθυνη Ποιότητας του Κεντρικού Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας Ρουσιά Βασιλική, για την διαρκή ενθάρρυνση της σε όλη την διάρκεια του Μεταπτυχιακού προγράμματος, αλλά και για τις παρατηρήσεις και συμβουλές της που αποτελούν πάντα αφορμή για την απόκτηση πολύτιμης γνώσης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Αλκιβιάδη Βατόπουλο και το προσωπικό του εργαστηρίου Μοριακής αντοχής και τυποποίησης του Κεντρικού Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας, για την καθοριστική βοήθεια τους στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Κατάσταση πινάκων

Πίνακας 1.8.1 Ποσοστό θετικών δειγμάτων νερού και περιπτώσεις αποικισμού /λοιμώξης από <i>Ps. aeruginosa</i> αντίστοιχα για το κάθε δωμάτιο	27
Πίνακας 1.8.2 Ποσοστά ανεύρεσης παθογόνων σε συγκεκριμένες λοιμώξεις Μονάδων Εντατικής Θεραπείας, που συμμετείχαν στο σύστημα του NNIS, για το χρονικό διάστημα 1992-1998 (Michael J. Richards, 2000).....	29
Πίνακας 1.8.3 Επιδημίες από <i>Ps. aeruginosa</i> σε πολιτείες των ΗΠΑ, τις χρονιές 2003 και 2004	30
Πίνακας 1.8.4 Παρουσία μικροοργανισμών (%) σε δείγματα νερού και βιολογικού υμενίου.....	32
Πίνακας 2.1. Στοιχεία δειγμάτων.....	37
Πίνακας 2.2. Απαιτούμενα στάδια για την επιβεβαίωση των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο CN agar.....	54
Πίνακας 3.1.2 Απομονώσεις από τα δείγματα νερού και οι επιβεβαιωτικές τους δοκιμασίες όπου απαιτούνται	75
Πίνακας 3.2.1 Αποτελέσματα οροτυποποίησης.....	81
Πίνακας 3.2.2 Κατανομή των στελεχών <i>Ps. aeruginosa</i> ανά ορότυπο.....	86
Πίνακας 3.2.3 Κατανομή των 15 στελεχών <i>Ps. aeruginosa</i> που τυποποιούνται μόνο με τους πολυδύναμους ορούς	88
Πίνακας 3.2.4 Συσχέτιση Rough στελεχών με το είδος του δείγματος και την γεωγραφική προέλευση	89
Πίνακας 3.3.1 Κατανομή των στελεχών <i>Ps. aeruginosa</i> στους 28 RAPD- τύπους και συσχέτιση με βάση το είδος και την προέλευση τους.....	94
Πίνακας 3.4.1 Συγκεντρωτικός πίνακας των 83 στελεχών που μελετήθηκαν και η κατάταξη τους στους αντίστοιχους ορότυπους και RAPD- τύπους.....	98
Πίνακας 3.4.2 Κατάταξη των στελεχών που τυποποιούνται μόνο με τους πολυδύναμους ορούς σε RAPD-τύπους.....	103
Πίνακας 3.4.3 Κατάταξη των Rough στελεχών σε RAPD-τύπους.....	104
Πίνακας 3.4.4 Συσχέτιση RAPD-τύπων και οροτύπων στελεχών <i>Ps. aeruginosa</i>	105

Κατάσταση εικόνων

Εικόνα 1.1.1 Χρώση Gram <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
(www.textbookofbacteriology.net)	1
Εικόνα 1.1.2 Αποικίες <i>Pseudomonas aeruginosa</i> σε άγαρ	2
(www.textbookofbacteriology.net)	2
Εικόνα 1.1.3 Παραγωγή πράσινης χρωστικής, πυοκυανίνης από κάποια στελέχη <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (www.textbookofbacteriology.net).....	2
Εικόνα 1.2.1 Μικροαποικίες σε σχήμα μανιταριού ή πυραμίδας, ανάμεσα στις οποίες δημιουργούνται κανάλια, μέσα στα οποία ρέει το υγρό (www.ehp.niehs.nih.gov)	4
Εικόνα 1.2.2 Σχηματική απεικόνιση του κύκλου ζωής του βιοφιλμ (www.hypertextbooksshop.com)	5
Εικόνα 1.2.3 Απεικόνιση των σημείων στο σύστημα διανομής ποσίμου νερού όπου μπορεί να παρατηρηθεί ο σχηματισμός βιομεμβρανών (www.hypertextbooksshop.com)	7
Εικόνα 1.6.1 Απεικόνιση της εξάλειψης ενός υδατογενούς νοσήματος, όπως είναι ο τυφοειδής πυρετός μετά την εφαρμογή της χλωρίωσης το 1908 στην Αμερική (www.waterandhealth.org)	16
Εικόνα 2.1 Τυπικές αποικίες που παράγουν μπλε/πράσινο χρώμα (πυοκυανίνη) σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα <i>Pseudomas agar base + Supl. CN</i>	54
και αναφέρονται ως επιβεβαιωμένες αποικίες <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (www.emlab.com)	54
Εικόνα 2.2 Σχηματική απεικόνιση ενός μορίου LPS (Thereza A. Soares et al, 2008)	61
Εικόνα 2.3 Αρχή μεθόδου της RAPD ανάλυσης (Σαζακλή Ε., 2005)	66
Εικόνα 3.1.1 Ποσοστιαία απεικόνιση των 3 ειδών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74
Εικόνα 3.2.1 Ποσοστό στελεχών που τυποποιήθηκαν με την οροτυποποίηση (T), στελεχών που δεν τυποποιήθηκαν (NT), Rough στελεχών (R) και στελεχών που τυποποιήθηκαν μόνο με τους πολυδύναμους ορούς (POLYVALENT)	85
Εικόνα 3.2.2 Κατάταξη των στελεχών στους διάφορους ορότυπους	87
Εικόνα 3.3.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης των στελεχών (από αριστερά): DNA ladder 100 bp, 104B, 105B, 230B, 184B, 194B, 17, 18, 102, 120, 37, 14, 36, 77, 79 και DNA ladder 100 bp	90
Εικόνα 3.3.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης των στελεχών (από αριστερά): DNA ladder 100 bp, 109, 103B, 104, 15, 78, 39, 52, 57, 61, 102B, 107B, 106B, 114B, 170B, 91, 97, 213B, 80, DNA ladder 100 bp	90
Εικόνα 3.3.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης των στελεχών (από αριστερά): DNA ladder 100 bp, Reference, 118B, 148B, 149B, 164B, 165B, 170B, 173B, 179B, 184B, 204B, H2O, DNA ladder 100 bp	91
Εικόνα 3.3.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης των στελεχών (από αριστερά): DNA ladder 100 bp, Reference, 186B, 187B, 188B, 191B, 192B, 193B, 194B, 210B, 213B, 214B, 224B, 122, 123, 124, 125, 126, H2O, DNA ladder 100 bp.....	91
Εικόνα 3.3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης των στελεχών (από αριστερά): DNA ladder 100 bp, Reference, 18, 74, 79, 101, 117, 187B, 192B, 229B, 230B, 231B, 241B, 253B, 254B, H2O, DNA ladder 100 bp	92
Εικόνα 3.3.6 Δενδρόγραμμα των 59 στελεχών <i>Ps. aeruginosa</i> που τυποποιήθηκαν με τη Μοριακή Τυποποιητική μέθοδο RAPD-PCR, το οποίο προέκυψε από την ανάλυση των ηλεκτροφορητικών εικόνων με το πρόγραμμα Gel Compar Software. Βάση της υπολογιστικής ανάλυσης τα 59 στελέχη ομαδοποιούνται σε 28 RAPD- τύπους. Τα	

ποσοστά ομοιότητας και τα Μοριακά Βάρη φαίνονται στο πάνω μέρος του δενδρογράμματος.....	93
Εικόνα 3.4.1 Ποσοστά στελεχών <i>Ps. aeruginosa</i> που τυποποιήθηκαν και με τις δυο μεθόδους (Οροτυποποίηση- RAPD), μόνο με οροτυποποίηση, μόνο με RAPD ή με καμία από τις δυο (NT)	103

Συντμήσεις επιστημονικών όρων

EPS: exopolisaccharide, εξωκυτταρικός πολυσακχαρίτης

EPDM: μονομερή διένια προπυλενίου αιθυλενίου

ASR: Aquifer Storage and Recovery

PAHO: Pan American Health Organization

WHO: World Health Organization

CDC: Center for Disease Control

THM: Τριαλομεθάνια

TTHM: Ολικά τριαλομεθάνια

mg: milligram

l: litre

KYA: Κοινή Υπουργική Απόφαση

cfu: colony forming units

ΠΟΥ: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

ΜΕΘ: Μονάδα εντατικής θεραπείας

ISO: International Organization for Standardization

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis- Ηλεκτροφόρηση σε εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο

LPS: λιποπολυσακχαρίτης

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

TBE: Tris- borate electrophoresis buffer

bp: base pair(s)

1. Εισαγωγή

1.1 Γενικά

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα Gram αρνητικό, μη σπορογόνο και μη ελντροφόρο βακτηρίδιο μήκους 1.5-5 μm και διαμέτρου 0.5-1 μm , που ανήκει στην οικογένεια *Pseudomonadaceae*. Τα κύτταρα της διατάσσονται μεμονωμένα, σε ζεύγη ή σε μικρές αλυσίδες.



Εικόνα 1.1.1 Χρώση Gram *Pseudomonas aeruginosa* (www.textbookofbacteriology.net)

Είναι κινητό βακτήριο και αυστηρά αερόβιο, δηλ. χρησιμοποιεί το O_2 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 στερεά θρεπτικά υλικά με άριστη θερμοκρασία αναπτύξης τους 37°C . Είναι το μόνο είδος του γένους που αναπτύσσεται στους 42°C και αυτή η ιδιότητα χρησιμοποιείται για το χαρακτηρισμό του είδους (Λαγουμιντζής Σ. Γεώργιος, 2004).

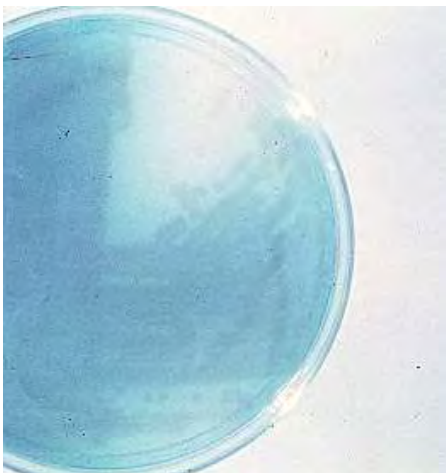
Η *Pseudomonas aeruginosa* μπορεί να παράγει αποικίες με διαφορετική μορφολογία. Τα περιβαλλοντικά στελέχη, που προέρχονται από το χώμα ή το νερό, συνήθως παράγουν μικρές και ξηρές (rough) αποικίες. Τα στελέχη που προέρχονται από κλινικά δείγματα γενικά παράγουν μεγάλες, λείες (smooth) αποικίες με ανώμαλα επίπεδα άκρα, ενώ από τις εκκρίσεις της αναπνευστικής οδού και του ουροποιητικού συστήματος, συνήθως απομονώνονται βλενώδεις (mucoid) αποικίες, η εμφάνιση των οποίων αποδίδεται στην παραγωγή ενός βλενώδη εξωκυττάριου πολυσακχαρίτη (alginate slime) (<http://textbookofbacteriology.net>).



Εικόνα 1.1.2 Αποικίες *Pseudomonas aeruginosa* σε άγαρ (www.textbookofbacteriology.net)

Στο αιματούχο άγαρ πολλά στελέχη προκαλούν β-αιμόλυση. Στο Mc Conkey άγαρ παρατηρούνται άχρωμες αποικίες διότι το βακτηρίδιο δεν διασπά τη λακτόζη. Τα τρυβλία με στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* που παράγουν πυοκυανίνη αποκτούν πράσινο, σκούρο σχετικά χρώμα και μια ευχάριστη αρωματική οσμή. Όλα τα στελέχη δίνουν θετικές τις αντιδράσεις καταλάσης και οξειδάσης. Διασπούν οξειδωτικά τη γλυκόζη, χωρίς παραγωγή αερίου, ενώ δεν μπορούν να διασπάσουν τη λακτόζη ή τη μαλτόζη. Επίσης δεν παράγουν H_2S (Λαγουμιντζής Σ. Γεώργιος, 2004).

Η *Ps. aeruginosa* παράγει διάφορες χρωστικές με κυριότερη την πυοκυανίνη, μια πράσινη χρωστική χαρακτηριστική αυτού του είδους, δεδομένου ότι δεν έχει βρεθεί άλλο είδος να την παράγει (Σαζακλή Ε.,2005). Πυοκυανίνη ωστόσο δεν παράγουν όλα τα στελέχη της *Ps. aeruginosa*, ενώ παράγεται σε αφθονία σε θρεπτικά υλικά με χαμηλή περιεκτικότητα σε σίδηρο. Η πυοκυανίνη συμμετέχει στον μεταβολισμό του σιδήρου στο βακτήριο (www.textbookofbacteriology.net). Άλλες χρωστικές που παράγει η *Ps. aeruginosa* είναι η πυοφθορεσεΐνη, φθορίζουσα χρωστική, η πυορουμπίνη, κοκκινωπή μη καροτινοειδή χρωστική που προέρχεται από το γλουταμινικό και η πυομελανίνη, καστανόμαυρη χρωστική που προέρχεται από αρωματικά αμινοξέα, όπως η τυροσίνη και η φαινυλαλανίνη. Η πυοφθορεσεΐνη λειτουργεί ως σιδηροφορέας, ενώ ο λειτουργικός ρόλος των άλλων χρωστικών παραμένει ασαφής (Σαζακλή Ε.,2005).



Εικόνα 1.1.3 Παραγωγή πράσινης χρωστικής, πυοκυανίνης από κάποια στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* (www.textbookofbacteriology.net)

1.2 Βιολογικό υμένιο

Σήμερα είναι πλέον γνωστό ότι τα βακτήρια στο φυσικό τους περιβάλλον δεν υπάρχουν αποκλειστικά ως ελεύθερα «αιωρούμενα» κύτταρα (planktonic), αλλά βρίσκονται κατά κανόνα προσκολλημένα σε κάποια βιολογική ή μη επιφάνεια, αρκεί αυτή να είναι επαρκώς υγρή.

Περιβάλλονται από στρώμα εξωκυτταρικού πολυμερούς (γλυκοκάλυκας, exopolysaccharide: EPS) που παράγουν τα ίδια τα βακτήρια, δημιουργώντας πολύπλοκες δομές που ονομάζονται βιομεμβράνες ή βιολογικά υμένια (biofilms). Στην προσκολλημένη τους μορφή τα βακτήρια εκφράζουν ένα διαφορετικό φαινότυπο σε σχέση με τα μη προσκολλημένα. Για παράδειγμα, στην *Ps. aeruginosa* το γονίδιο *algC*, ένα από τα γονίδια που απαιτούνται για την παραγωγή του αλγινικού, του κύριου συστατικού του εξωκυτταρικού πολυσακχαρίτη της, γίνεται πέντε φορές ενεργότερο αμέσως μετά από την προσκόλληση της, για να απενεργοποιηθεί μόλις τα κύτταρα εγκολπωθούν στο αλγινικό, ενώ το γονίδιο που ευθύνεται για τη βιοσύνθεση των βλεφαρίδων απενεργοποιείται. Για να σχηματιστεί επομένως, βιομεμβράνη δεν αρκεί απλή συνάθροιση κυττάρων, αλλά θα πρέπει οι μικροοργανισμοί να εκφράσουν το φαινότυπο που αντιστοιχεί στην προσκολλημένη τους μορφή. Επιπλέον, αν και η βιομεμβράνη εμποδίζει την ταχεία ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού που φιλοξενεί, λόγω περιορισμένης προσφοράς οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών, ωστόσο λόγω των νέων ιδιοτήτων που εμφανίζουν, σε σχέση με τα ελεύθερα αιωρούμενα μικρόβια, η βιομεμβράνη όχι μόνο προστατεύει τον πληθυσμό αυτό από την δράση των αντιμικροβιακών φαρμάκων, αλλά ταυτόχρονα ευνοεί την ανάπτυξη πολυανθεκτικών στελεχών, δημιουργώντας συχνά δυσεπίλυτα κλινικά προβλήματα (Ζ. Μελαμπιανάκη *et al*, 2007, Ε. Καλογεροπούλου, 2008).

Υπολογίζεται ότι το 65% των λοιμώξεων στον άνθρωπο οφείλονται σε βακτήρια που ασκούν τη λοιμογόνο δράση τους μέσω των βιομεμβρανών. Οι κυριότερες λοιμώξεις που οφείλονται στο σχηματισμό βιομεμβράνης και στις οποίες συμμετέχει η *Ps. aeruginosa* είναι:

- Η μέση πυώδης ωτίτιδα, μια από τις πλέον κοινές παθήσεις της παιδικής ηλικίας, η οποία οφείλεται στο σχηματισμό βιομεμβράνης πάνω στο βλεννογόνο του μέσου ωτός. Συνήθως, οι βιομεμβράνες αυτές έχουν πολυμικροβιακό χαρακτήρα και μεταξύ των μικροοργανισμών που συμμετέχουν είναι και η *Ps. aeruginosa*.
- Η χρόνια βακτηριακή προστατίτιδα, στην οποία το συχνότερο αίτιο είναι ο σχηματισμός βιοφιλμ μεταξύ άλλων και από *Ps. aeruginosa*.
- Η κυστική ίνωση των πνευμόνων, νόσος με υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα, στην οποία η ανάπτυξη βιομεμβρανών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Ο επικρατέστερος αποικιστής στις βιομεμβράνες αυτές είναι η *Ps. aeruginosa* (Ζ. Μελαμπιανάκη *et al*, 2007).

Η *Ps. aeruginosa* επίσης μεταξύ άλλων βακτηρίων όπως είναι ο *Staphylococcus aureus*, ο *Staphylococcus epidermidis* και ο *Enterococcus faecalis* αποικίζουν συχνά εμφυτευμένες ιατρικές συσκευές (όπως βηματοδότες, ενδοφλέβιους καθετήρες, ουροκαθετήρες, προσθετικά αρθρικά εμφυτεύματα και καρδιακές βαλβίδες) και δημιουργούν βιομεμβράνες, προκαλώντας έτσι χρόνιες και συχνά ανθεκτικές στη θεραπεία λοιμώξεις (Ε. Καλογεροπούλου, 2008).

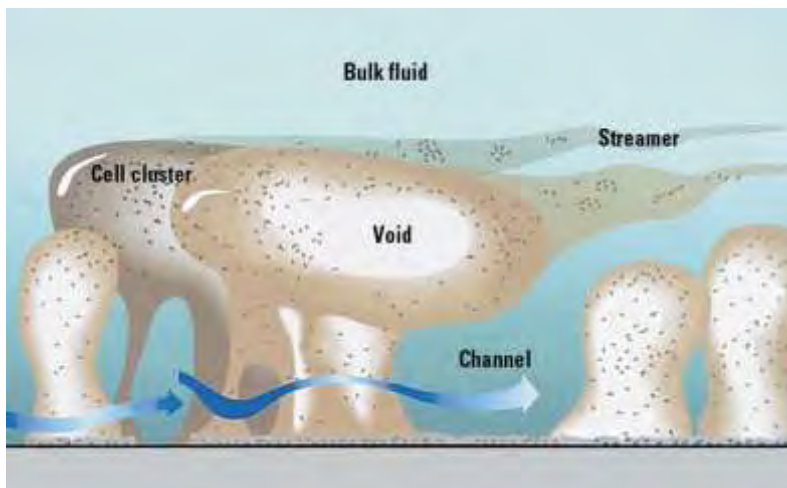
Ο σχηματισμός βιοφιλμ ευθύνεται επίσης για λοιμώξεις εγκαυμάτων, τραυμάτων καθώς και του κερατοειδούς χιτώνα σε ανθρώπους που χρησιμοποιούν φακούς επαφής (www.medicalnewstoday.com).

Εκτός όμως από τον χώρο της ιατρικής, οι βιομεμβράνες κατά την ανάπτυξη τους στο δίκτυο παροχής νερού, επηρεάζουν την ποιότητα και την ταχύτητα ροής του, ενώ προκαλούν σημαντικά προβλήματα και στο χώρο της βιομηχανικής παραγωγής, λόγω διάβρωσης και πρόωρης φθοράς των επιφανειών μεταλλικών αντικειμένων ή ακόμη και στη βιομηχανία τροφίμων, όπου η ανάπτυξη βιομεμβρανών στην επιφάνεια των μηχανημάτων θεωρείται ότι προστατεύει τα παθογόνα από τα απολυμαντικά (Ζ. Μελαμπιανάκη *et al*, 2007, Ε. Καλογεροπούλου, 2008).

Τα κύρια συστατικά που συνιστούν μια βιομεμβράνη είναι :

- Τα μικροβιακά κύτταρα
- Το στρώμα του εξωκυττάριου πολυμερούς (γλυκοκάλυκας)
- Η επιφάνεια προσκόλλησης (Ζ. Μελαμπιανάκη *et al*, 2007)

Οποιαδήποτε επιφάνεια βρεθεί σε υγρό περιβάλλον αποκτά μια επικάλυψη από μόρια του φέροντος υγρού, όπως χημικές ουσίες και μακρομόρια πρωτεϊνικής κυρίως δομής. Η επικάλυψη αυτή τροποποιεί ή και αλλάζει τελείως τις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας του υποστρώματος. Εκτός όμως από τα χαρακτηριστικά του υποστρώματος και η παρουσία βλεφαρίδων, ινιδίων ή ελύτρου συμβάλλει στην ανάπτυξη μικροβιακής προσκόλλησης και αυτό διότι, τα μικρόβια πρέπει να υπερβούν τις απωθητικές δυνάμεις που εμφανίζονται κατά την επαφή με όλα τα υλικά. Στη συνέχεια τα βακτήρια προσκολλώνται στις επιφάνειες με ειδικό, σταθερό και μη αντιστρεπτό τρόπο και μέσω της κυτταρικής διαίρεσης σχηματίζουν μικροαποικίες σε σχήμα μανιταριού ή πυραμίδας, ενώ ταυτόχρονα αρχίζουν να εκκρίνουν πολυμερές υλικό (EPS). Η διαδικασία αυτή οδηγεί στην ανάπτυξη της βιομεμβράνης (Ε. Καλογεροπούλου, 2008).



Εικόνα 1.2.1 Μικροαποικίες σε σχήμα μανιταριού ή πυραμίδας, ανάμεσα στις οποίες δημιουργούνται κανάλια, μέσα στα οποία ρέει το υγρό (www.ehp.niehs.nih.gov)

Η δομή της βιομεμβράνης είναι σχετικά απλή όταν αναπτύσσεται στα βιοϊατρικά προσθετικά υλικά, ενώ γίνεται ιδιαίτερα πολύπλοκη στο περιβάλλον, όπως για παράδειγμα σε ένα δίκτυο παροχής νερού (Z. Μελαμπιανάκη *et al*, 2007).



Εικόνα 1.2.2 Σχηματική απεικόνιση του κύκλου ζωής του βιοφιλμ (www.hypertextbooksshop.com)

Ο κύκλος ζωής της βιομεμβράνης, όπως και σχηματικά αποδίδεται στην εικόνα 1.2.2 ακολουθεί τα εξής στάδια:

1. Ελεύθερα αιωρούμενα βακτήρια συναντούν τυχαία μια επιφάνεια που βρίσκεται κάτω από την στάθμη του νερού και μέσα σε λίγα λεπτά μπορούν να προσκολληθούν σε αυτή. Αρχίζουν να παράγουν μια γλοιώδη εξωκυτταρική πολυμερή ουσία (EPS) και να σχηματίζουν αποικίες
2. Η παραγωγή του πολυμερούς (EPS) επιτρέπει στον μικροβιακό πληθυσμό να αναπτύξει μια πολύπλοκη, τρισδιάστατη δομή που επηρεάζεται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Το βιοφιλμ μπορεί να σχηματιστεί μέσα σε ώρες.
3. Βακτηριακά κύτταρα αποσπώνται μεμονωμένα ή κατά ομάδες από τις ανώτερες στιβάδες της βιομεμβράνης, κυκλοφορούν στο υγρό μέσο και είναι δυνατόν να προσκολληθούν σε νέα επιφάνεια (www.hypertextbooksshop.com).

Στις δομές που σχηματίζονται υπάρχει μεγάλη πυκνότητα βακτηρίων και έτσι ευνοείται η μεταξύ τους επικοινωνία, γνωστή ως quorum sensing. Η επικοινωνία αυτή φαίνεται να είναι σημαντική για τη φυσιολογική ανάπτυξη της βιομεμβράνης, μέσα στην οποία οι μικροαποικίες τελικά περικλείονται. Η κυτταρο-κυτταρική επικοινωνία γίνεται με την έκκριση από τα βακτήρια μεσολαβητικών μορίων χαμηλού μοριακού βάρους, γνωστών ως αυτοεπαγωγέων, που συγκεντρώνονται στο μικροπεριβάλλον. Η συγκέντρωση των αυτοεπαγωγέων αυξάνεται σε ευθεία αναλογία με τη βακτηριακή πυκνότητα μέχρι μια ορισμένη συγκέντρωση (critical concentration). Όταν η ενδοκυττάρια συγκέντρωση φτάσει σε αυτό το κρίσιμο σημείο, πυροδοτείται η έκφραση διαφόρων βακτηριακών

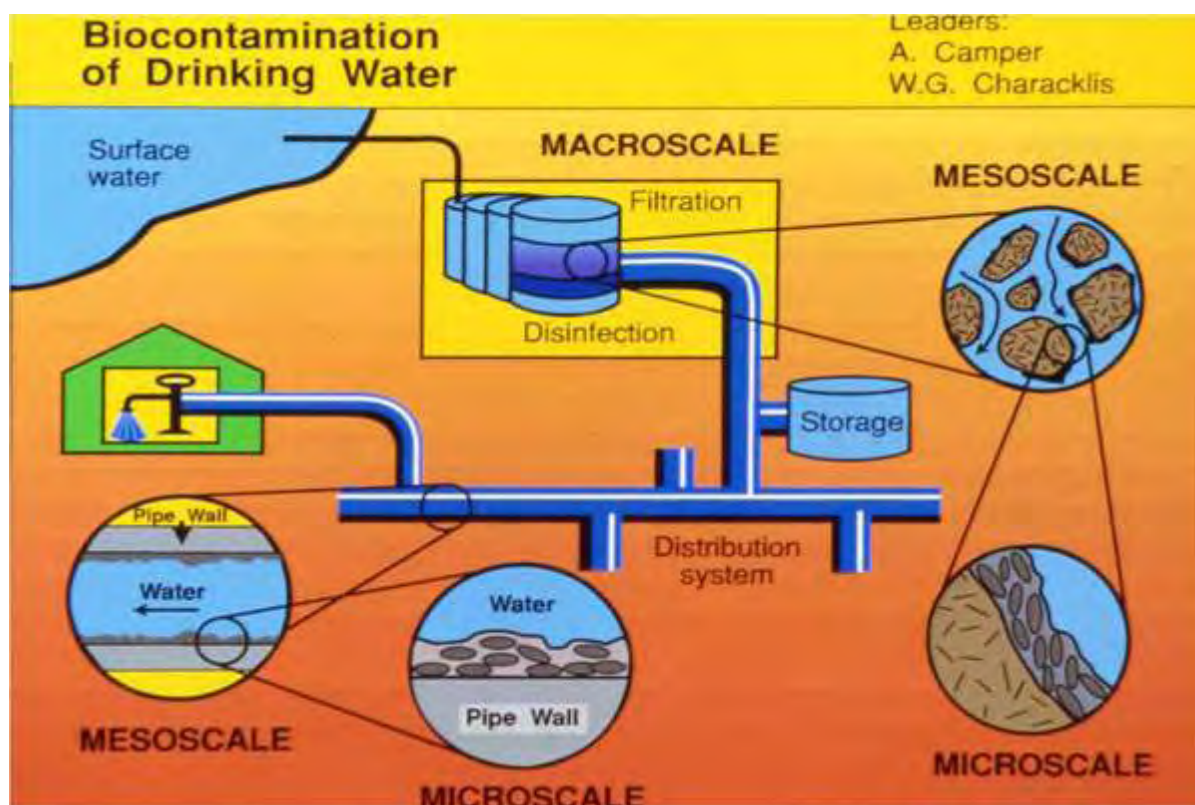
γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την παραγωγή λοιμογόνων παραγόντων, τη βακτηριακή σύζευξη και την άμυνα του μικροοργανισμού. Έχει βρεθεί σε μεταλλαγμένα στελέχη *Ps. aeruginosa* ότι η απουσία κυτταρο-κυτταρικής επικοινωνίας έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πολύ λεπτής και ελλιπώς δομημένης βιομεμβράνης. Στην *Ps. aeruginosa* έχει βρεθεί ότι τουλάχιστον 39 διαφορετικά γονίδια ρυθμίζονται μέσω της κυτταρο-κυτταρικής επικοινωνίας.

Ένας τρόπος αντιμετώπισης του ανεπιθύμητου σχηματισμού βιομεμβρανών θα ήταν να σιγάσουν τα σήματα που στέλνουν τα βακτήρια μεταξύ τους, ώστε αυτά να παραμείνουν πλαγκτονικά. Το μακροφύκος *Delisea pulchra*, στην Αυστραλία, εκλύει μια χημική ουσία που ονομάζεται φουρανόνη, η οποία εμποδίζει τα χημικά σήματα να λειτουργήσουν. Τα βακτήρια δεν αντιλαμβάνονται έτσι την παρουσία άλλων βακτηρίων και δεν ενεργοποιείται η διαδικασία σχηματισμού βιομεμβράνης. Αν αυτή η ουσία μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση παθήσεων του ανθρώπου, όπως π.χ. για την κυστική ίνωση, όπου βακτήρια *Ps. aeruginosa* δημιουργούν βιομεμβράνη που καλύπτει τους πνεύμονες ή για την ανάπτυξη βιομεμβρανών σε σωλήνες δικτύου ύδρευσης θα ανοίγονταν πολλές νέες προοπτικές.

Σε ότι αφορά τη χημική σύσταση και δομή του πολυμερούς υλικού της βιομεμβράνης, αυτό αποτελείται κυρίως από ένα σύμπλεγμα εξωπολυσακχαριτών (αλγινικό στην περίπτωση της *Ps. aeruginosa*) καθώς επίσης από εξωγενή στοιχεία που δεσμεύονται από το παρακείμενο υδάτινο περιβάλλον, όπως νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, μέταλλα και λοιπές ουσίες απαραίτητες για το μεταβολισμό των βακτηριδίων.

Όσον αφορά τις φυσικοχημικές της ιδιότητες η βιομεμβράνη είναι έντονα υδρόφιλη (98% νερό) και ισχυρά συνδεδεμένη με την υποκείμενη επιφάνεια. Επιπλέον, ο γλυκοκάλυκας δημιουργεί ένα προστατευτικό φραγμό έναντι επιβλαβών ουσιών (όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου και τα χλωριούχα), αλλά και επιτρέπει ταυτόχρονα την αργή διάχυση μικρών μορίων διαμέσου της μεμβράνης, δημιουργώντας έτσι ένα ισόρροπο περιβάλλον μεταβολικών ανταλλαγών. Αυτό το ευνοϊκό για την ανάπτυξη των βακτηρίων μικροπεριβάλλον επιτρέπει την συνύπαρξη πολλών ειδών ή στελεχών στη βιομεμβράνη, καλύπτοντας ταυτόχρονα διαφορετικές θρεπτικές απαιτήσεις. Επίσης, η άμεση γειννίαση διαφορετικών βακτηρίων μέσα στη βιομεμβράνη επιτρέπει τη μεταξύ τους μεταφορά γενετικού υλικού, κάτι που προσφέρει στα βακτήρια ένα σχετικό πλεονέκτημα για την προσαρμογή και επιβίωση τους σε συνάρτηση με τις αλλαγές του περιβάλλοντος (Ζ. Μελαμπιανάκη *et al*, 2007, Ε. Καλογεροπούλου, 2008).

Σε επιφάνειες των συστημάτων ύδρευσης ποσίου νερού ανευρίσκονται βιομεμβράνες με την μορφή κυρίως ενός λεπτού και ετερογενούς στρώματος αποικισμού. Μάλιστα συγκεκριμένοι τύποι σωληνώσεων από ελαστομερή υλικά, καθώς και βαλβίδες καλυμμένες με λάστιχο που χρησιμοποιούνται στα συστήματα διανομής ποσίου νερού, έχει παρατηρηθεί να ευνοούν τον σχηματισμό βιοφίλμ, λόγω της απελευθέρωσης βιοαποδομήσιμων συστατικών που δημιουργούν ιδανικές διατροφικές συνθήκες. Βιοφίλμ σε συστήματα ύδρευσης σχηματίζονται κυρίως από ετερότροφους μικροοργανισμούς της αυτόχθονης μικροχλωρίδας του νερού χωρίς καμία επίπτωση για την ανθρώπινη υγεία. Περιστασιακά όμως, το βιοφίλμ μπορεί να δράσει σαν δεξαμενή παθογόνων μικροοργανισμών. Όταν αυτοί οι μικροοργανισμοί εμμένουν και πολλαπλασιάζονται στο βιοφίλμ και μάλιστα απελευθερώνονται από το βιοφίλμ στο νερό, τότε έχουν σαν αποτέλεσμα την υποβάθμιση της ποιότητας του ποσίου νερού και αποτελούν έναν ενδεχόμενο κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία.



Εικόνα 1.2.3 Απεικόνιση των σημείων στο σύστημα διανομής ποσίου νερού όπου μπορεί να παρατηρηθεί ο σχηματισμός βιομεμβρανών (www.hypertextbooksshop.com)

Με δεδομένο ότι, η *Ps. aeruginosa* είναι ένα βακτήριο που φυσικά υπάρχει στο έδαφος και στο νερό γίνεται αντιληπτό ότι μπορεί να βρεθεί περιστασιακά στο δημόσιο δίκτυο διανομής ποσίου νερού ή σε οικιακά συστήματα διανομής νερού, προερχόμενο από την πηγή υδροδότησης ή εισερχόμενο για παράδειγμα μετά από επισκευές. Αν εγκατασταθεί η *Ps. aeruginosa* στο σύστημα διανομής νερού, είναι συνήθως δύσκολο να εξαλειφθεί και αυτό οφείλεται και στην προστασία που της παρέχει το περιβάλλον του βιοφιλμ. Από εργαστηριακές μελέτες είναι γνωστό ότι η *Ps. aeruginosa* μπορεί να σχηματίζει βιοφιλμ σε υλικά από μέταλλο, πλαστικό και λάστιχο. Επιπρόσθετα, η *Ps. aeruginosa* έχει παρατηρηθεί περιστασιακά σε βιοφιλμ ποσίου νερού, γεγονός που υποδηλώνει την ικανότητα της να επιζεί σε ένα τέτοιο περιβάλλον (D. Bressler *et al*, 2009).

Στην μελέτη των D. Bressler *et al* (2009) σε ροή ποσίου νερού μέσω αντιδραστήρων εργαστηριακής κλίμακας με EPDM λάστιχο(λάστιχο μονομερών διένιων προπυλενίου αιθυλενίου) σαν παράδειγμα ελαστομερούς υλικού, φαίνεται ότι η *Ps. aeruginosa* είναι ικανή να αποικίζει προϋπάρχον βιοφιλμ μεικτού πληθυσμού σε περιβάλλον ποσίου νερού, στο οποίο μπορεί και να εμμένει τουλάχιστον για μια περίοδο 4 έως 5 εβδομάδων, ενώ *Ps. aeruginosa* ανευρέθηκε και στον κύριο όγκο του νερού, γεγονός που υποδηλώνει την απελευθέρωση των βακτηρίων από το βιοφιλμ στο νερό. Μάλιστα, σε εργαστηριακή μελέτη σχετικά με το κατά πόσο το υλικό επηρεάζει την ανάπτυξη του βιοφιλμ στα συστήματα διανομής ποσίου νερού, βρέθηκε ότι τα ελαστομερή υλικά,

συμπεριλαμβανομένου του προπυλενίου αιθυλενίου, αποικίζονται πιο γρήγορα και εμφανίζουν περισσότερο πλούσιο βιοφίλμ συγκριτικά με υλικά από πλαστικό και επιφάνειες από ατσάλι. Αυτή η τάση να ενισχύεται η δημιουργία του βιοφίλμ στα ελαστομερή υλικά αποδίδεται στην έκπλυση θρεπτικών συστατικών από το υλικό κατά την επαφή του με το νερό (D. Bressler *et al*, 2009).

Εκτός, από το περιβάλλον του συστήματος διανομής ποσίμου νερού πρόσφατα, σε εργαστηριακή μελέτη των Banning *et al* διαπιστώθηκε η εμμονή και η δυνατότητα επιβίωσης της *Ps. aeruginosa* σε βιοφίλμ του υδροφόρου ορίζοντα. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν γυάλινοι αντιδραστήρες σε τέτοιες συνθήκες που προσομοιάζαν την αρχή της αποθήκευσης και ανάκτησης νερού που ισχύει για τον υδροφόρο ορίζοντα (ASR, Aquifer Storage and Recovery). Η μελέτη αυτή ασχολήθηκε με το κατά πόσο οι βιομεμβράνες που αναπτύσσονται στον υδροφόρο ορίζοντα, μπορούν να παρέχουν μια δεξαμενή παθογόνων βακτηρίων κατά την επαναχρησιμοποίηση του π.χ για άρδευση. Αυτή η μελέτη απέδειξε ότι η εισαγωγή νερού μεγάλης περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά, όπως είναι τα επεξεργασμένα λύματα στο περιβάλλον των υπογείων υδάτων που κατεξοχήν χαρακτηρίζονται από παράγοντες που περιορίζουν την επιβίωση των παθογόνων βακτηρίων (χαμηλή περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά, απουσία οξυγόνου, ανταγωνισμός του αυτόχθονου μικροβιακού πληθυσμού) αφενός διεγείρει την ανάπτυξη βιομεμβρανών και αφετέρου επηρεάζει διαφορετικά τα παθογόνα βακτήρια. Έτσι, ενώ για την *E.coli* είχε αρνητικές επιπτώσεις για την επιβίωση της, η *Ps. aeruginosa* είχε την ικανότητα να ανταγωνίζεται πιο αποτελεσματικά τον αυτόχθονα μικροβιακό πληθυσμό και να εμμένει στο βιοφίλμ τόσο των υπογείων υδάτων όσο και των επεξεργασμένων λυμάτων. Η *Ps. aeruginosa* όμως είναι αυστηρώς αερόβιο βακτήριο και η μέση συγκέντρωση σε διαλυμένο οξυγόνο στα επεξεργασμένα λύματα, αν και υψηλότερη από την αντίστοιχη στα υπόγεια ύδατα, ήταν πολύ χαμηλή και κατά την διάρκεια του πειράματος συνεχώς μειωνόταν μέσω της παροχής αερίου αζώτου προκειμένου να επιτυγχάνονται οι αναερόβιες συνθήκες. Έτσι, δεν ευνοούνταν η ανάπτυξη της *Ps. aeruginosa*, η επιβίωση της οποίας επομένως μπορεί να αποδοθεί στο ότι χρησιμοποιούσε τα νιτρικά ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων, καθώς και μια μεγαλύτερη ποικιλία οργανικών ενώσεων ως πηγή άνθρακα και ενέργειας για την ανάπτυξη της σε σχέση με τα Εντεροβακτηριακά (N. Banning *et al*, 2003).

Η χρησιμοποίηση επεξεργασμένων αποβλήτων για τον εμπλουτισμό υπόγειων υδροφορέων με σκοπό την παρεμπόδιση διείσδυσης θαλασσίου ύδατος, την ανύψωση της στάθμης υφισταμένων υδροφορέων ή την αποθήκευση νερού για σκοπούς άρδευσης ή ακόμη και ύδρευσης είναι πλέον μια συνήθης πρακτική (www.ellinikietairia.gr/media/pdf/Gkikas.pdf).

Οι Bourion & Cerf (1996) παρατήρησαν επίσης τον γρήγορο σχηματισμό βιοφίλμ από *Ps. aeruginosa* σε καθαρή επιφάνεια αλλά και την ενσωμάτωση της σε βιοφίλμ μεικτού πληθυσμού σε υλικά από λάστιχο, Teflon και ατσάλι. Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί φαινότυποι και γονότυποι της *Ps. aeruginosa*. Όλα τα στελέχη ενσωματώθηκαν και εμμένανε στις βιομεμβράνες στο υλικό EDPM κατά παρόμοιο τρόπο, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο βλεννώδης φαινότυπος, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων του βλεννώδη πολυσακχαρίτη, ούτε ευνόησε, ούτε ανέστειλε τον αρχικό αποικισμό και την εμμονή της *Ps. aeruginosa* στις βιομεμβράνες του ποσίμου νερού (D. Bressler *et al*, 2009).

Λαμβάνοντας υπ' όψιν όλες αυτές τις παρατηρήσεις μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η *Ps. aeruginosa* μπορεί να αποικίσει τόσο καθαρές επιφάνειες όσο και προϋπάρχοντα βιοφίλμ μεικτού πληθυσμού, σε συνθήκες ροής ανεξάρτητα από τον τύπο του υποστρώματος και τα διαθέσιμα θρεπτικά υλικά. Έτσι, τα ελαστομερή υλικά δεν φαίνεται να ευνοούν συγκεκριμένα την επιβίωση της *Ps. aeruginosa* στα βιοφίλμ. Ωστόσο όμως, ενδέχεται να διευκολύνουν τον σχηματισμό βιοφίλμ από ετερότροφα βακτήρια λόγω της παροχής θρεπτικών συστατικών και έτσι έμμεσα να ευνοούν την εξάπλωση της *Ps. aeruginosa* στα βιοφίλμ των υδάτινων συστημάτων.

Αν και η χρήση των υλικών από ελαστομερή είναι συνήθως περιορισμένη συγκριτικά με άλλα υλικά που χρησιμοποιούνται στο δίκτυο διανομής ποσίου νερού, θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν ότι ακόμη και μια πολύ μικρή περιοχή από ελαστομερή που έχει αποικιστεί από βιοφίλμ, το οποίο φιλοξενεί ενδεχομένως και παθογόνα βακτήρια μπορεί να λειτουργεί σαν σημείο επιμόλυνσης του νερού (D. Bressler *et al*, 2009).

Σημαντικό είναι επίσης ότι, συγκέντρωση 0,5-2,0 ppm υπολειμματικού χλωρίου στο νερό είναι συνήθως αρκετή για να θανατώσει τα πλαγκτονικά βακτήρια, όχι όμως και αυτά που βρίσκονται στις βιομεμβράνες. Αυτό ίσως να είναι ο λόγος που ανιχνεύουμε βακτήρια, ενώ το νερό έχει χλώριο (Ζ. Μελαμπιανάκη *et al*, 2007). Η επιβίωση και η ανάπτυξη της *Ps. aeruginosa* έχει αποδειχτεί ότι είναι δυνατή στο προστατευμένο περιβάλλον του βιοφίλμ, σε επίπεδα ελεύθερου χλωρίου 10 έως 15 mg/l, από το οποίο κύτταρα ελευθερώνονται στον κύριο όγκο του νερού (Susanne Grobe *et al*, 2001).

1.3 Οικολογία

Η *Ps. aeruginosa* μπορεί να απομονωθεί από κάθε σχεδόν υδάτινο οικοσύστημα, αλλά και από το βιοφίλμ κάθε φυσικού ή τεχνητού συστήματος νερού (Susanne Grobe *et al*, 2001).

Μπορεί να βρεθεί σχεδόν παντού στο φυσικό περιβάλλον, όπως σε επιφανειακά νερά, βλάστηση και έδαφος, ενώ μπορεί ακόμη να απομονωθεί από το δέρμα, τον φάρυγγα και την εντερική χλωρίδα υγιών ανθρώπων (Richa Shrivastava *et al*, 2004). Σπάνια όμως απομονώνεται από θαλασσινό νερό, εκτός αν βρίσκεται κοντά σε εκβολές μολυσμένων νερών. Δεν είναι παθογόνο για τα ψάρια, αλλά είναι παθογόνο για φυτά όπως ο καπνός, το αγγούρι και το μαρούλι. Είναι επίσης παθογόνο για τις ακρίδες και τα έντομα.

Η *Ps. aeruginosa* έχει απομονωθεί από καύσιμα της αεροπορίας, καλλυντικά καθώς και από οικιακά όσο και νοσοκομειακά σιφόνια νεροχύτη, βρύσες και αποχετεύσεις. Η *Ps. aeruginosa* δεν επιζεί σχεδόν καθόλου στο στεγνό ανθρώπινο δέρμα, σε περιπτώσεις όμως εφύγρανσης του, όπως συμβαίνει με τους κολυμβητές μετά από παρατεταμένη παραμονή σε κολυμβητική δεξαμενή ή τους στρατιώτες που συχνά κινούνται σε ελώδες έδαφος, μολύνσεις όπως εξωτερική ωτίτιδα στους κολυμβητές και μια από τις πιο διαδεδομένες δερματικές ασθένειες, «το πόδι του αθλητή» σε στρατιώτες είναι συχνές (www.hpa.org.uk). Η προσαρμοστικότητα της οφείλεται στο ότι οι διατροφικές της απαιτήσεις είναι ελάχιστες, ενώ είναι δυνατό να χρησιμοποιήσει το ατμοσφαιρικό CO₂ ως μόνη πηγή άνθρακα και το αμμώνιο ως πηγή αζώτου. Για αυτό το λόγο επιζεί στο

χλωριωμένο νερό, στα απολυμαντικά, σε φάρμακα και αποστειρωμένα διαλύματα όπως είναι το απεσταγμένο νερό, τα οφθαλμικά διαλύματα κ.α. (Λαγουμιντζής Σ. Γεώργιος, 2004).

Η *Ps. aeruginosa* μπορεί επίσης να χρησιμοποιήσει περισσότερες από 75 οργανικές ενώσεις για την ανάπτυξη της. Όλες αυτές οι ιδιότητες της αναμφισβήτητα εξηγούν την μεγάλη οικολογική επικράτηση της καθώς και την εξέχουσα θέση που κατέχει ως νοσοκομειακό παθογόνο (Todar's Online Textbook of Bacteriology www.textbookofbacteriology.net).

Η οικολογία του μικροοργανισμού στο νοσοκομειακό περιβάλλον έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς η *Ps. aeruginosa* αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τους νοσοκομειακούς ασθενείς με καρκίνο, κυστική ίνωση, και εγκαύματα για τους οποίους το ποσοστό θνητότητας φτάνει το 50% (Todar's Online Textbook of Bacteriology www.textbookofbacteriology.net). Σύμφωνα μάλιστα με στοιχεία του Health Protection Agency, η *Ps. aeruginosa* είναι υπεύθυνη για το 10% περίπου των λοιμώξεων που αποκτά ένας ασθενής κατά την παραμονή του στο νοσοκομείο (www.hpa.org.uk).

Δεδομένου ότι, η *Ps. aeruginosa* αναπτύσσεται πολύ καλύτερα σε υγρό και θερμό περιβάλλον, το νοσοκομειακό περιβάλλον παρέχει απεριόριστες εστίες ανάπτυξης του μικροοργανισμού, όπως είναι οι αναπνευστικές συσκευές, οι καθετήρες και τα ενδοσκοπικά όργανα (Λαγουμιντζής Σ. Γεώργιος, 2004, www.hpa.org.uk). Η εφαρμογή μοριακών τυποποιητικών μεθόδων βοήθησε σημαντικά στην προσπάθεια διαλεύκανσης της οικολογίας του μικροοργανισμού στο νοσοκομειακό περιβάλλον (Matthias Trautmann *et al*, 2005).

Η *Ps. aeruginosa* εμφανίζεται και πολλαπλασιάζεται επίσης σε πολλούς χώρους των κολυμβητηρίων μόλις οι συνθήκες λειτουργίας τους δεν είναι ικανοποιητικές. Μπορεί να πολλαπλασιαστεί στην επιφάνεια των φίλτρων όταν δεν συντηρούνται σωστά, σε σημεία που υπάρχουν σπασμένα πλακάκια, στα τοιχώματα και τον πυθμένα της δεξαμενής όταν δεν καθαρίζονται σωστά. Καθώς όπως ήδη αναφέρθηκε, το βακτήριο αυτό προκαλεί συχνά εξωτερικές ωτίτιδες στους κολυμβητές προτείνεται σαν ένας επιπλέον δείκτης ελέγχου της καταλληλότητας του νερού των κολυμβητικών δεξαμενών (Μ. ΠΑΠΑΠΕΤΡΟΠΟΥΛΟΥ *et al*, 1995, σελ.74).

1.4 Ταξινόμηση

Το γένος *Pseudomonas* περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1894 από τον Migula, έναν βοτανολόγο ο οποίος δημοσίευσε ένα σύστημα ταξινόμησης των βακτηρίων, και για αυτό το λόγο θεωρήθηκε ο πατέρας της βακτηριακής ταξινόμησης. Το σύστημα αυτό βασιζόταν στο σχήμα και την γενικότερη εμφάνιση των βακτηρίων. Στο Bergey's Manual που εκδόθηκε το 1923, περιλαμβανόταν ήδη ένα κεφάλαιο με το γένος *Pseudomonas* και η ταξινόμηση βασιζόταν στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, η αρχική ταξινόμηση του γένους *Pseudomonas* ως Gram αρνητικά, αερόβια, μη σπορογόνα, κινητά με πολικές βλεφαρίδες βακτηρίδια, δεν τα διαφοροποιούσε σαφώς από άλλα Gram αρνητικά βακτήρια και για αυτό προστέθηκαν στην συνέχεια και άλλα

φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Πάντως, εξαρχής το γένος *Pseudomonas* περιλάμβανε ένα μεγάλο αριθμό από είδη, που αυξανόταν με τον χρόνο.

Την δεκαετία του 1960, η ανάπτυξη μεθοδολογίας για την εξαγωγή του DNA από τα κύτταρα και η ανακάλυψη της επαναδιάταξης του DNA από τον Marmur (Marmur, 1961, Marmur *et al*, 1961) έκαναν εφικτή την βακτηριακή ταξινόμηση με γενετικά κριτήρια.

Η πιο επιτυχής ταξινόμηση του γένους *Pseudomonas* με γενετικά κριτήρια ήρθε την δεκαετία του 1970 από τον Palleroni και τους συνεργάτες του, οι οποίοι κατάφεραν με επιτυχία να ταξινομήσουν το γένος *Pseudomonas* σε πέντε rRNA υποομάδες με βάση την ομοιότητα RNA – DNA. Αυτές οι rRNA υποομάδες απείχαν πολύ μεταξύ τους φυλογενετικά και έτσι μόνο τα είδη που περιλαμβάνονταν στο rRNA group I τελικά παρέμειναν στο γένος *Pseudomonas*.

Παρά την δημοσίευση αυτών των πολύ σημαντικών στοιχείων το 1973, τίποτα από αυτά δεν συμπεριλήφθηκε στο Bergey's Manual of Determinative Bacteriology που εκδόθηκε το 1974 και στο οποίο η ταξινόμηση του γένους *Pseudomonas* βασιζόταν στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, αναφέροντας μόνο την περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη (G + C) ως γενετική πληροφορία στην περιγραφή των ειδών. Σε αυτή την έκδοση το γένος *Pseudomonas* περιλήφθηκε στην οικογένεια *Pseudomonadaceae*.

Ταξινόμηση που βασιζόταν στην ομοιότητα RNA – DNA στο γένος *Pseudomonas* περιλήφθηκε τελικά στην πρώτη έκδοση του Bergey's Manual of Systematic Bacteriology το 1984. Στην διάρκεια των δέκα χρόνων που μεσολάβησαν από την έκδοση του Bergey's Manual του 1974 και του Systematic Bacteriology Manual του 1984 πολύ λίγες αλλαγές στα είδη *Pseudomonas* καταγράφηκαν. Αν και η ομαδοποίηση των ειδών *Pseudomonas* είχε γίνει με βάση το ριβοσωμικό RNA, η ταξινόμηση και αναγνώριση αυτών των ειδών συνεχιζόταν να βασίζεται σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά.

Μεγάλες αλλαγές στην ταξινόμηση των βακτηρίων επήλθαν το 1984 από τον Woese, ο οποίος πρότεινε την κατάταξη και αναγνώριση τους με βάση την αλληλουχία του ριβοσωμικού RNA. Ωστόσο αυτή η καινούργια ανακάλυψη δεν συμπεριλήφθηκε ακόμη στην έκδοση του Bergey's Manual of Determinative Bacteriology το 1994, όπου η διάκριση των ειδών βασιζόταν στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους. Σε αυτή την έκδοση μάλιστα αν και περιλαμβάνονταν τα κλασικά είδη *Pseudomonas*, τα νέα είδη που περιγράφηκαν στο χρονικό διάστημα που μεσολάβησε από την έκδοση του Bergey's Manual του 1984, απλά περιλαμβάνονταν σε μια συμπληρωματική λίστα. Η φυλογενετική ταξινόμηση των βακτηρίων που βασιζόταν στον προσδιορισμό της ακολουθίας της 16S rRNA μονάδας τους, οδήγησε στην θέσπιση τριών υποομάδων, αυτών που αργότερα ονομάστηκαν Proteobacteria, “alpha”, “beta” και “gamma”.

Αυτός ο προσδιορισμός, επαναπροσδιόρισε την ταξινόμηση πολλών βακτηριακών ειδών. Έτσι, για παράδειγμα η *P. acidovorans* και *P. testosteroni* που άνηκαν στο rRNA group III, επαναταξινομήθηκαν το 1987 στο γένος *Comamonas*. Επαναπροσδιορισμοί της ταξινόμησης έγιναν επίσης προς το τέλος της δεκαετίας του '80, με βάση την ομολογία του DNA πολλών στελεχών με διαφορετικά στελέχη της ομάδας *Pseudomonas* (*Pseudomonas sensu stricto* cluster). Για παράδειγμα, τα είδη *P.*

oryzihabitans και *P. luteola* μεταφέρθηκαν στα γένη *Flavimonas* και *Chryseomonas* αντίστοιχα, αν και αυτά τα δύο γένη είναι σχεδόν συνώνυμα του γένους *Pseudomonas*. Από την δεκαετία του '90 και μετά, ο προσδιορισμός της ακολουθίας της 16S rRNA μονάδας όλων των γνωστών βακτηρίων ξεκίνησε και σε συνδυασμό με την ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων για την κατασκευή δέντρων που απεικονίζουν την ομοιότητα των αλληλουχιών, επέτρεψε την φυλογενετική ταξινόμηση των προκαρυωτικών. Σαν αποτέλεσμα αυτών των αναλύσεων, συνεχίστηκε η επαναταξινόμηση των ειδών που περιλαμβάνονταν στις rRNA υποομάδες του Palleroni.

Έτσι, είδη του rRNA group III, όπως *P. facilis*, *P. delafieldii* αποτέλεσαν ένα νέο γένος το *Acidovorax*. Αυτά τα νέα γένη ανήκουν στην β-υποκλάση των Πρωτεοβακτηρίων και αυτό ισχύει και για τα νέα γένη *Burkholderia* (γένος που εμφανίστηκε το 1992, με τυπικό είδος την *B. cepacia*) και *Ralstonia* (εμφανίστηκε το 1995) που προήλθαν από την επαναταξινόμηση των ειδών του rRNA group II. Είδη που περιλαμβάνονταν στο rRNA group IV, *P. diminuta* *P. vesicularis* αποτέλεσαν το 1994 το νέο γένος *Brevundimonas*, που ανήκει στην α-υποκλάση των Πρωτεοβακτηρίων. Τέλος, είδη που ανήκαν στο rRNA group V, αν και αρχικά αποτέλεσαν ένα νέο γένος το *Xanthomonas maltophilia*, επαναταξινομήθηκαν το 1993 στο γένος *Stenotrophomonas*, που ανήκει στην γ-υποκλάση των Πρωτεοβακτηρίων.

Το 2000 πραγματοποιήθηκε μια διεξοδική αναθεώρηση της ταξινόμησης του γένους *Pseudomonas*, μέσω της ανάλυσης της αλληλουχίας της 16S rRNA μονάδας, από τους Anzai *et al.* Στην πραγματικά εξαντλητική εργασία τους, προσδιόρισαν την αλληλουχία της 16S rRNA μονάδας 128 ειδών *Pseudomonas* και βρήκαν 57 στελέχη να είναι *Pseudomonas sensu stricto* και να ομαδοποιούνται σε πέντε υποομάδες:

“*P. syringae* group”, “*P. chlororaphis* group”, “ *P. fluorescens* group”, “ *P. putida* group”, “ *P. stutzeri* group”, “*Ps. aeruginosa* group” και “ *P. pertucinogena* group”, που ουσιαστικά συμπίπτει με την φυλογενετική ταξινόμηση των Palleroni *et al* (1984).

Από το 2000 και μετά, η επαναταξινόμηση συνεχίστηκε και πολλά είδη *Pseudomonas* μεταφέρθηκαν σε διαφορετικά νέα γένη, που ανήκαν σε διαφορετικές κλάσεις των Πρωτεοβακτηρίων. Όλες αυτές οι αλλαγές έχουν καταγραφεί στην πρόσφατη έκδοση του Bergey's Manual of Systematic Bacteriology του 2005. Ωστόσο, από το 2005 πολλά νέα είδη του γένους *Pseudomonas* έχουν περιγραφεί και ο αριθμός τους συνεχώς αυξάνεται, καθώς είναι γενικά αποδεκτό ότι μόνο έναν πολύ μικρό αριθμό γνωρίζουμε από το σύνολο των βακτηριακών ειδών που υπάρχουν στον πλανήτη μας (Alvaro Peix *et al*, 2009).

1.5 Παθογόνος δράση

Η *Ps. aeruginosa* είναι ευκαιριακό παθογόνο βακτήριο. Για την ακρίβεια είναι η επιτομή του ευκαιριακού παθογόνου μικροοργανισμού για τον άνθρωπο. Προκαλεί λοιμώξεις κυρίως σε άτομα με ανεπαρκές ανοσοποιητικό σύστημα, όπως άτομα με εκτεταμένα εγκαύματα, καρκίνο και AIDS που είναι πολύπλοκες και συχνά απειλητικές για τη ζωή του ασθενούς (www.textbookofbacteriology.net). Ο μικροοργανισμός σπάνια προκαλεί νόσο σε υγιή άτομα (<http://emedicine.medscape.com>). Στην *Ps. aeruginosa* αποδίδονται διάφορες ασθένειες, σίγουρα όμως είναι η κύρια αιτία λοίμωξης των πνευμόνων και του θανάτου στους ασθενείς με κυστική ίνωση (Eshwar Mahenthiralingam *et al*, 1996).

Η *Pseudomonas aeruginosa* παράγει ποικίλες ουσίες που θεωρούνται ότι επάγουν τον αποικισμό και τη μόλυνση των ιστών του ξενιστή. Κυτταρικοί παράγοντες που σχετίζονται με τη λοιμογόνο δράση του μικροβίου είναι ο λιποπολυσακχαρίτης LPS, ο εξωκυττάριος πολυσακχαρίτης slime, ο βλεννώδης πολυσακχαρίτης (αλγινικό οξύ, alginate) και τα ινίδια που σχετίζονται με την προσκολλητικότητα του μικροοργανισμού στα επιθηλιακά κύτταρα. Εξωκυττάριοι λοιμογόνοι παράγοντες που ενοχοποιούνται για την παθογόνο δράση του μικροοργανισμού είναι ένζυμα και τοξίνες που παράγονται από το μικροοργανισμό και εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο. Τα κυριότερα από αυτά είναι η αλκαλική πρωτεάση, η ελαστάση, η αιμολυσίνη, η φωσφολιπάση C, το εξωένζυμο S, η εξωτοξίνη A, οι χρωστικές (Παναγιώτα Α. Ξαπλαντέρη, 2008).

Στελέχη *Ps. aeruginosa* που έχουν απομονωθεί από νερό βρύσης, από μεταλλικό νερό και από νερό που προέρχεται από πηγάδια έχουν εξεταστεί συγκριτικά με κλινικά στελέχη ως προς την ικανότητα τους να παράγουν ενδεχόμενους μολυσματικούς παράγοντες. Έτσι, έχει αποδειχτεί ότι τόσο τα περιβαλλοντικά όσο και τα κλινικά στελέχη παράγουν αιμολυσίνη, ενώ μόνο τα περιβαλλοντικά στελέχη παράγουν αιμογλουτίνη. Σχεδόν όλα τα στελέχη (με εξαίρεση ένα πολύ μικρό ποσοστό αυτών που προέρχονται από πηγάδι) εμφανίζουν κυτοτοξική δράση (Marie Eliza Zamberlan da Silva *et al*, 2008).

Η παθογένεια του μικροοργανισμού εκτός από τους λοιμογόνους παράγοντες οφείλεται και στην μεταβολική ποικιλότητα του. Επιπλέον, από την στιγμή που εγκαθίσταται η λοίμωξη, η θεραπεία καθίσταται δύσκολη καθώς η *Ps. aeruginosa* εμφανίζει υψηλό βαθμό εγγενούς αντοχής σε πλήθος αντιβιοτικών. Η έμφυτη ανθεκτικότητα της οφείλεται στα συστήματα εκροής και στη χαμηλή διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης. Ωστόσο η *Ps. aeruginosa* μπορεί να αποκτήσει αντοχή και σε επιπλέον αντιβιοτικά λόγω πολλαπλών μεταλλάξεων που γίνονται σταδιακά και που μειώνουν την πρόσληψη των αντιβιοτικών και αυξάνουν την εκροή. Η εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών συνεισφέρει στην κακή πρόγνωση μολύνσεων που έχουν εγκατασταθεί και συνδέονται με την *Ps. aeruginosa* (Jerry D. King *et al*, 2009).

Οι συνηθέστερες ασθένειες που αποδίδονται στην *Ps. aeruginosa* είναι:

- Λοιμώξεις του αναπνευστικού: Συμβαίνουν σχεδόν αποκλειστικά σε ανθρώπους με κατεσταλμένη κατώτερη αναπνευστική οδό ή κατεσταλμένο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως καρκινοπαθείς που υπόκεινται σε χημειοθεραπεία.

- **Βακτηριαίμια:** Η *Ps. aeruginosa* προκαλεί βακτηριαίμια κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους. Παράγοντες που προδιαθέτουν είναι αιματολογικές κακοήθειες, ασθενείς με σύνδρομο επίκτητης ανοσιακής ανεπάρκειας (AIDS), ουδετεροπενία, σακχαρώδη διαβήτη και σοβαρά εγκαύματα. Τα περισσότερα περιστατικά εκδηλώνονται μέσα στα νοσοκομεία. Η Ψευδομονάδα είναι το αίτιο περίπου του 25% των ενδονοσοκομειακών βακτηριαίμιων.
- **Ενδοκαρδίτιδα:** Η πυοκυανική ψευδομονάδα προσβάλλει τις καρδιακές βαλβίδες των χρηστών ενδοφλέβιων ουσιών και των ανθρώπων με τεχνητές καρδιακές βαλβίδες. Το μικρόβιο εγκαθίσταται στο ενδοκάρδιο με άμεση διείσδυση από το αίμα.
- **Λοιμώξεις του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος:** Η *Ps. aeruginosa* προκαλεί μηνιγγίτιδες και εγκεφαλικά αποστήματα. Το μικρόβιο εισβάλλει στο ΚΝΣ είτε από παρακείμενα όργανα, όπως το εσωτερικό αυτί ή ο παραρρινικός κόλπος είτε άμεσα μέσω κρανιακών τραυμάτων, χειρουργικών και διαγνωστικών επεμβάσεων είτε από απομακρυσμένα μολυσμένα όργανα, όπως το ουροποιητικό σύστημα.
- **Ωτίτιδες:** Το μικρόβιο συχνά αποικίζει τον εξωτερικό ακουστικό πόρο υπό συνθήκες τραυματισμού, ύγρανσης και φλεγμονής.
- **Λοιμώξεις οφθαλμών:** Μόλυνση του ανθρώπινου ματιού με *Ps. aeruginosa* οδηγεί σε οξεία φλεγμονή και έλκος κερατοειδούς που εξελίσσεται ραγδαία σε διάτρηση και μόνιμη μείωση της όρασης, αν δεν αντιμετωπιστεί επιτυχώς.
- **Λοιμώξεις οστών και συνδέσμων:** Συμβαίνουν είτε με άμεσο αποικισμό του μικροβίου είτε με μεταφορά του μικροβίου μέσω του αίματος από άλλες επιμολυσμένες πηγές (πιο συχνές σε χρήστες ενδοφλέβιων ουσιών). Η *Ps. aeruginosa* προκαλεί χρόνια οστεομυελίτιδα και είναι το πιο συχνό παθογόνο που εμπλέκεται σε οστεοχονδρίτιδα ύστερα από τραύματα που προήλθαν από παρακεντήσεις.
- **Λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος:** Συνήθως σχετίζονται με καθετηριασμούς ή χειρουργικές επεμβάσεις. Η *Ps. aeruginosa* είναι το τρίτο επικρατέστερο αίτιο των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων του ουροποιητικού και ευθύνεται για το 12% περίπου όλων των λοιμώξεων αυτού του τύπου. Επιπλέον η *Ps. aeruginosa* μπορεί να εισέλθει στο κυκλοφορικό σύστημα μέσω του ουροποιητικού και αυτό είναι η αιτία του 40% περίπου όλων των ψευδομοναδικών βακτηριαίμιων.
- **Λοιμώξεις του γαστρεντερικού σωλήνα:** Προκαλούνται συνήθως σε ανοσοκατεσταλμένους. Το μικρόβιο έχει ενοχοποιηθεί για περιπρωκτικές λοιμώξεις, τυπική γαστρεντερίτιδα και εντεροκολίτιδα.
- **Λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών ιστών:** Προδιαθετικοί παράγοντες είναι η λύση της συνέχειας του δέρματος είτε από τραύματα είτε από εγκαύματα, οι συνθήκες υψηλής υγρασίας όπως συμβαίνει στο αυτί των κολυμβητών, στα πόδια των αθλητών, στην περινεϊκή περιοχή των βρεφών και στους ασθενείς με AIDS. Η ψευδομονάδα έχει επίσης ενοχοποιηθεί για τη θυλακίτιδα και για μη αντιμετωπίσιμες μορφές κοινής ακμής (Σαζακλή Ε., 2005).

Η μολυσματική δόση *Ps. aeruginosa* που απαιτείται να ληφθεί από το στόμα προκειμένου να αποικιστεί ένας υγιής άνθρωπος είναι υψηλή. Ο κίνδυνος για την ανθρώπινη υγεία από την έκθεση σε *Ps. aeruginosa* μέσω της κατανάλωσης ποσίμου νερού είναι χαμηλός. Ο κίνδυνος είναι ελαφρώς υψηλότερος όταν το άτομο λαμβάνει ένα αντιβιοτικό στο οποίο η *Ps. aeruginosa* είναι ανθεκτική. Το γεγονός ότι τα άτομα

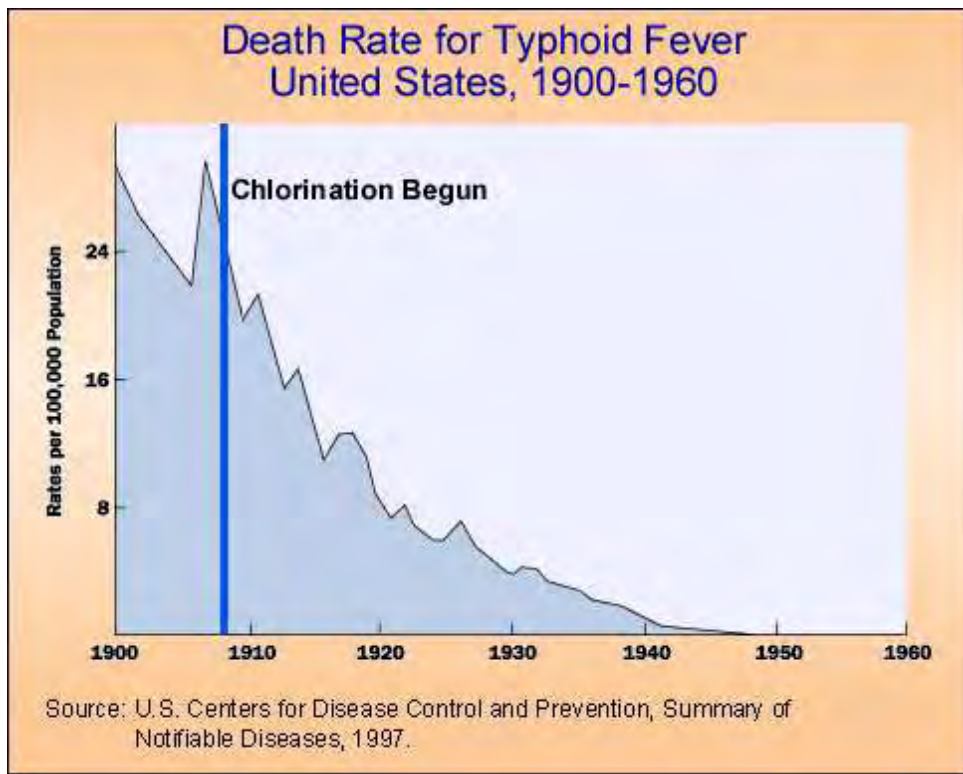
που λαμβάνουν ampicillin είναι περισσότερο επιρρεπή σε λοιμώξεις του γαστρεντερικού συστήματος από *Ps. aeruginosa* προφανώς οφείλεται στην καταστολή της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου, που επιτρέπει τον αποικισμό από *Ps. aeruginosa*. Από τον υπολογισμό του κινδύνου αποικισμού ή λοίμωξης από *Ps. aeruginosa* από κατανάλωση ποσίου νερού φαίνεται ότι η σημαντικότερη πηγή αβεβαιότητας οφείλεται περισσότερο στην συχνότητα έκθεσης παρά στην μολυσματική δόση ή στην ποσότητα του νερού που καταναλώνεται. Συνοπτικά, δυο περιπτώσεις φαίνεται να παρουσιάζουν τον μεγαλύτερο κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου από την επαφή με μολυσμένο νερό με *Ps. aeruginosa* (1) έκθεση του δέρματος σε spa και (2) έκθεση των πνευμόνων μέσω της εισπνοής σταγονιδίων νερού (Mena KD *et al*, 2009).

1.6 *Pseudomonas aeruginosa* και χλωριωμένο νερό

1.6.1 Γενικά

Μια από τις πρώτες φορές που είναι γνωστή η χρήση του χλωρίου για την απολύμανση του νερού, ήταν από τον John Snow το 1850 στην αντλία νερού της οδού Broad στο Λονδίνο ύστερα από μια επιδημία χολέρας. Αργότερα, το 1897 ο Sims Woodhead χρησιμοποίησε διάλυμα χλωρίνης, ως ένα προσωρινό μέτρο για την απολύμανση των κεντρικών αγωγών διανομής ποσίου νερού στην πόλη Maidstone, του Kent στην Αγγλία μετά από επιδημία τυφοειδούς πυρετού.

Συστηματική χλωρίωση του ποσίου νερού στην Μεγάλη Βρετανία καθιερώθηκε στις αρχές του προηγούμενου αιώνα όπου και μειώθηκαν ραγδαία οι θάνατοι από τυφοειδή πυρετό. Πολύ σύντομα, το 1908 η χλωρίωση εφαρμόστηκε και στην πόλη του Jersey, N.J., ενώ ακολούθησαν και άλλες πόλεις σε όλη την Αμερική με αποτέλεσμα την ουσιαστική εξάλειψη υδατογενών νοσημάτων όπως είναι η χολέρα, ο τυφοειδής πυρετός, η δυσεντερία και η ηπατίτιδα Α. Πριν την επεξεργασία του ποσίου νερού με χλώριο, ο τυφοειδής πυρετός ευθυνόταν για τον θάνατο 25 περίπου στους 100000 ανθρώπους στην Αμερική ετησίως (www.waterandhealth.org).



Εικόνα 1.6.1 Απεικόνιση της εξάλειψης ενός υδατογενούς νοσήματος, όπως είναι ο τυφοειδής πυρετός μετά την εφαρμογή της χλωρίωσης το 1908 στην Αμερική (www.waterandhealth.org)

Το μη επεξεργασμένο ή ανεπαρκώς επεξεργασμένο πόσιμο νερό παραμένει η μεγαλύτερη απειλή για την δημόσια υγεία, κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες όπου σχεδόν ο μισός πληθυσμός καταναλώνει μολυσμένο νερό. Σε αυτές τις χώρες, ασθένειες όπως η χολέρα, η τυφοειδή και χρόνια δυσεντερία είναι ενδημικές και προκαλούν τον θάνατο ατόμων όλων των ηλικιών. Το 1990, περισσότερα από τρία εκατομμύρια παιδιά κάτω των πέντε ετών πέθαναν από διάρροια. Δυστυχώς, η διαθεσιμότητα ασφαλούς πόσιμου νερού σε πολλές περιοχές είναι σχεδόν ανύπαρκτη λόγω της φτώχειας, της έλλειψης γνώσης σχετικά με την μόλυνση του νερού και της μειωμένης δυνατότητας υλοποίησης έργων υποδομής.

Ένα πρόσφατο παράδειγμα της συνεχιζόμενης απειλής για την δημόσια υγεία από τις επιδημίες υδατογενών νοσημάτων είναι στο Περού το 1991, λόγω απουσίας ή ανεπαρκούς απολύμανσης του πόσιμου νερού, που οφειλόταν κατά ένα μέρος στην ανησυχία εξαιτίας αναφορών των ΗΠΑ για τα παραπροϊόντα της απολύμανσης. Το αποτέλεσμα ήταν μια επιδημία χολέρας διάρκειας 5 ετών που για πρώτη φορά εμφανίστηκε στην Αμερική αυτόν τον αιώνα. Η επιδημία εξαπλώθηκε σε 19 χώρες της Λατινικής Αμερικής και έχει μόνο μερικώς περιοριστεί μέσω παρεμβάσεων δημόσιας υγείας που υποστηρίζονται από την επιστημονική και τεχνική βοήθεια του Pan American Health Organization (PAHO). Σχεδόν ένα εκατομμύριο περιπτώσεις και 10.000 θάνατοι αναφέρθηκαν.

Αυτά τα στοιχεία ενισχύουν την άποψη ότι η απολύμανση του νερού πρέπει να αποτελεί το πρωταρχικό εργαλείο για την προστασία της δημόσιας υγείας παγκόσμια (www.waterandhealth.org).

Πρέπει ωστόσο να τονιστεί ότι η χλωρίωση ή οποιαδήποτε άλλη τελική επεξεργασία του νερού έχει σαν σκοπό την απολύμανση και όχι την αποστείρωση, δηλαδή την καταστροφή όλων των ζωντανών μικροοργανισμών που υπάρχουν στο νερό. Επομένως, απλώς αυξάνει τον συντελεστή ασφάλειας και φυσικά δεν αναπληρώνει τα έργα υγειονομικής προστασίας ή ενδεχόμενης επεξεργασίας καθαρισμού του νερού. Αποτελεί επομένως, προληπτικό μόνο μέτρο προστασίας του πόσιμου νερού από κινδύνους μόλυνσεων (Βασιλική Ευθ. Καραούλη, Μ. Παπαπετροπούλου σελ.115).

1.6.2 Ιδιότητες του χλωρίου

Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό του χλωρίου είναι η ευρέως φάσματος μικροβιοκτόνος δραστηριότητα του και η εξασφάλιση υπολειμματικής προστασίας. Χρησιμοποιείται επίσης για να αντιμετωπίσει προβλήματα οσμής και γεύσης, από ουσίες που φυσικά υπάρχουν στο νερό, όπως είναι οι δυσώδεις εκκρίσεις των αλγών, οσμές από την αποσύνθεση της βλάστησης, το υδρόθειο και την αμμωνία. Ωστόσο, το πιο σημαντικό όφελος του χλωριωμένου νερού είναι η προστασία της δημόσιας υγείας, μέσω του ελέγχου των υδατογενών νοσημάτων (www.waterandhealth.org).

Ανάλογα με τις τιμές του pH όταν εισαχθεί το χλώριο στο νερό ή παραμένει στην μοριακή του μορφή (σε όξινο pH) ή αντιδρά με το νερό και δημιουργείται υποχλωριώδες οξύ (σε ουδέτερο $5 < \text{pH} < 8$) ή σε αλκαλικό pH διασπάται σε υποχλωριώδη ιόντα OCl^- ($\text{pH} > 7$) (Μ. Παπαπετροπούλου *et al*, 1995, σελ.119).

Η σχέση με το pH είναι σημαντική διότι προδικάζει την υδρόλυση του υποχλωριώδους οξέως σε υποχλωριώδες ιόν σύμφωνα με την αντίδραση:



Η απολυμαντική δράση του χλωρίου μειώνεται κατά σειρά $\text{Cl}_2 > \text{HOCl} > \text{OCl}^-$ (Μ. Παπαπετροπούλου *et al*, 1995, σελ.119).

Έτσι, η μεγαλύτερη δραστηριότητα παρατηρείται σε pH 5 και έκτοτε η δραστηριότητα μειώνεται μέχρι που η χλωρίωση γίνεται πραγματικά ανενεργή σε pH 9,5 (www.arvanitakis.com).

Η δραστική λοιπόν μορφή του χλωρίου που στην πραγματικότητα εκτελεί το έργο της απολύμανσης είναι το υποχλωριώδες οξύ. Είναι επομένως σημαντικό να διατηρούνται οι συγκεντρώσεις του HClO σε αρκετά υψηλά επίπεδα, ώστε να παρέχεται ικανοποιητική προστασία απέναντι στη δράση βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών (www.Chemistry.upatras.gr).

Ωστόσο, το υποχλωριώδες οξύ δεν είναι δυνατόν να τροφοδοτηθεί στο σύστημα. Έτσι τροφοδοτούμε άλλες χημικές μορφές, οι οποίες μετά από σειρά αντιδράσεων ελπίζουμε

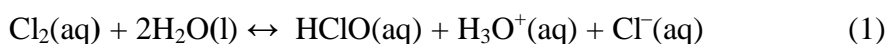
ότι θα απελευθερώσουν την κατάλληλη ποσότητα υποχλωριώδους οξέως, και τις οποίες ονομάζουμε δότες χλωρίου.

Οι περισσότεροι συνηθισμένες είναι:

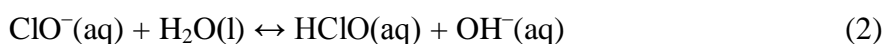
- Το αέριο χλώριο.
- Το Υποχλωριώδες Νάτριο (Χλωρίνη).
- Το Υποχλωριώδες ασβέστιο
- Τα χλωροϊσοκυανουρικά (www.arvanitakis.com)

Συγκεκριμένα, όταν το χλώριο ή τα υποχλωριώδη άλατα ή τα χλωριωμένα παράγωγα του ισοκυανουρικού οξέος προστεθούν στο νερό, παράγεται υποχλωριώδες οξύ (HClO) σύμφωνα με τις αντιδράσεις:

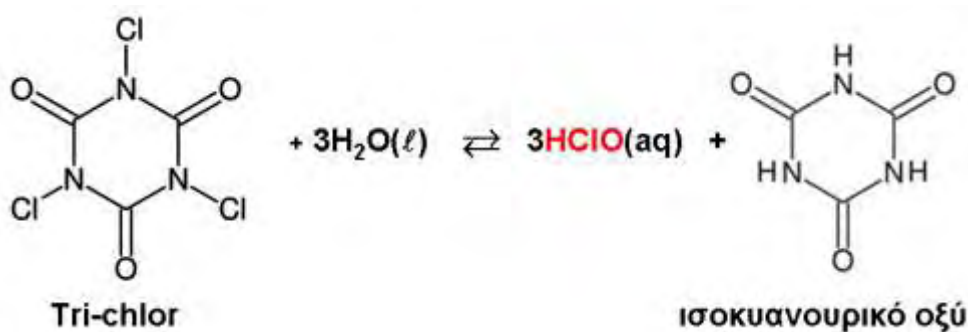
Υδρόλυση χλωρίου



Υδρόλυση υποχλωριωδών αλάτων



Υδρόλυση χλωροϊσοκυανουρικών (3)



Το υποχλωριώδες οξύ διασπάται σε υδροχλωρικό οξύ (HCL) και οξυγόνο εν τω γεννάσθαι (O), το οποίο είναι ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας και προκαλεί καταστροφή των μικροοργανισμών (δρα με οξείδωση των σουλφυδρικών ομάδων) (www.edye.gr/seminaria/apolymantika.htm).

1.6.3 Χλωρίωση

Το χλώριο όταν προστίθεται στο νερό, ένα μέρος του αντιδρά με οργανικές ενώσεις, μέταλλα και άλλα συστατικά που βρίσκονται στο νερό και επομένως δεν είναι διαθέσιμο για απολύμανση (αυτό καλείται απαιτούμενο χλώριο). Η υπόλοιπη ποσότητα του χλωρίου ονομάζεται ολικό χλώριο και διακρίνεται στο δεσμευμένο χλώριο το οποίο αντιδρά με νιτρικά ιόντα και επομένως δεν είναι διαθέσιμο για απολύμανση και στο ελεύθερο χλώριο το οποίο είναι διαθέσιμο για να αδρανοποιήσει παθογόνους μικροοργανισμούς (www.cdc.gov/safewater/publications_pages/chlorineresidual.pdf).

Η ύπαρξη ελεύθερου υπολειμματικού χλωρίου στο πόσιμο νερό υποδηλώνει ότι:

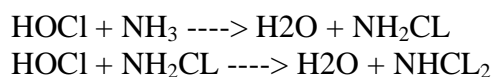
- επαρκή ποσότητα χλωρίου προστέθηκε αρχικά, ικανή να αδρανοποιήσει βακτήρια και ορισμένους ιούς και
- ότι το νερό προστατεύεται από μόλυνση κατά την διάρκεια της αποθήκευσης του

Η παρουσία ελεύθερου υπολειμματικού χλωρίου στο νερό σχετίζεται με την απουσία παθογόνων οργανισμών και για αυτό το λόγο αποτελεί ένα μέτρο του κατά πόσο το νερό είναι πόσιμο (www.cdc.gov/safewater/publications_pages/chlorineresidual.pdf).

Το υπολειμματικό χλώριο είναι η ποσότητα του ενεργού χλωρίου που βρίσκεται σε μορφή υποχλωριώδους οξέος (HClO) και υποχλωριωδών ιόντων (www.geo.auth.gr).

Θεωρητικά, αν το νερό είναι εντελώς καθαρό το απαιτούμενο χλώριο θα ήταν μηδέν και εάν δεν υπήρχαν ούτε νιτρικά δεν θα υπήρχε ούτε δεσμευμένο χλώριο. Επομένως, η συγκέντρωση του ελεύθερου χλωρίου θα ήταν ίση με την συγκέντρωση του χλωρίου που προστέθηκε αρχικά. Στην πραγματικότητα όμως, στα φυσικά νερά και ιδιαίτερα στα επιφανειακά όπως είναι τα ποτάμια, οι οργανικές ενώσεις χρησιμοποιούν το απαιτούμενο χλώριο και τα νιτρικά σχηματίζουν το δεσμευμένο χλώριο και έτσι η συγκέντρωση του ελεύθερου χλωρίου είναι μικρότερη από την συγκέντρωση του χλωρίου που αρχικά προστέθηκε (www.cdc.gov/safewater/publications_pages/chlorineresidual.pdf).

Αν υπάρχει στο νερό αμμωνία, τότε δημιουργούνται οι χλωραμίνες, οι οποίες και αποτελούν το δεσμευμένο χλώριο.



Οι χλωραμίνες οξειδώνονται και δίνουν άζωτο και ιόντα χλωρίου (Μ. Παπαπετροπούλου *et al*, 1995, σελ.120). Έτσι, όταν το νερό περιέχει αμμωνία ή αζωτούχες οργανικές ενώσεις παρέχεται επιπλέον απολυμαντική δράση από χλωραμίνες (Βασιλική Ευθ. Καραούλη).

Καταλαβαίνουμε λοιπόν ότι, η ποσότητα χλωρίου που απαιτείται για απολύμανση δεν μπορεί να προσδιορισθεί εκ των προτέρων γιατί εξαρτάται από το pH, τη θερμοκρασία

και την παρουσία οργανικών ενώσεων στο νερό. Συνήθως η επεξεργασία της απολύμανσης αρχίζει με μια περιεκτικότητα 0,3 mg/L (www.geo.auth.gr).

Ο στόχος της διαδικασίας απολύμανσης σε ένα δίκτυο διανομής ποσίμου νερού είναι η αποτελεσματική απολύμανση στα ακρότατα σημεία του δικτύου (π.χ βρύση), που ορίζεται από τον WHO ως συγκέντρωση υπολειμματικού χλωρίου μεγαλύτερη ή ίση με 0,5 mg/L, τουλάχιστον μετά από 30 λεπτά από την προσθήκη του χλωρίου στο νερό και σε pH λιγότερο από 8,0. Η συγκέντρωση αυτή του ελεύθερου χλωρίου είναι αρκετή για να διατηρηθεί η ποιότητα του νερού στο σύστημα διανομής ποσίμου νερού, αλλά είναι μάλλον ελλιπής όταν το νερό αποθηκεύεται σε δοχεία για 24 h.

Το CDC συνιστά:

1. 30 λεπτά μετά την προσθήκη χλωρίου στο νερό, το υπολειμματικό χλώριο να μην ξεπερνά τα 2,0 mg/L (έτσι εξασφαλίζεται ότι το νερό δεν έχει ανεπιθύμητη γεύση ή οσμή) και
2. 24 h από την προσθήκη του χλωρίου σε νερό που αποθηκεύεται σε δοχεία και προορίζεται για πόση, το υπολειμματικό χλώριο θα πρέπει να υπάρχει σε συγκέντρωση τουλάχιστον 0,2 mg/L (για να εξασφαλίζεται ότι το νερό είναι καθαρό από μικροβιολογικής απόψεως).

Σύμφωνα με τον WHO, η ανώτατη επιτρεπτή τιμή υπολειμματικού χλωρίου στο πόσιμο νερό είναι 5 mg/L και η κατώτατη επιτρεπτή είναι 0,2 mg/L (www.cdc.gov/safewater/publications_pages/chlorineresidual.pdf).

Άλλες μέθοδοι απολύμανσης του νερού εκτός του χλωρίου είναι το όζον που αν και έχει πολύ καλή δράση έναντι των ιών και δεν δημιουργεί αλογονοφόρμια (καρκινογόνες ουσίες τις οποίες σχηματίζει το χλώριο στις αντιδράσεις του με οργανικές ενώσεις) είναι ωστόσο ιδιαίτερα δαπανηρό, δεν εξασφαλίζει υπολειμματική δράση και απαιτεί επιμελημένη συντήρηση και μόνιμη παροχή ηλεκτρικού ρεύματος. Η υπεριώδης ακτινοβολία επίσης, με την οποία επιτυγχάνεται μέγιστη μικροβιοκτόνο δράση για $\lambda=265$ nm, δεν εξασφαλίζει υπολειμματική δράση και απαιτεί επιμελημένη συντήρηση και σταθερότητα στην παροχή ηλεκτρικού ρεύματος. Ωστόσο, θολότητα, χουμικές ουσίες και σίδηρος εμποδίζουν τη μετάδοση της ακτινοβολίας. Το ιώδιο και το βρώμιο αποτελούν δαπανηρότερες μεθόδους από τη χλωρίωση, ενώ η μικροβιοκτόνος δράση του αργύρου, ο οποίος είναι κατάλληλος για μικρής κλίμακας παροχή νερού, αυξάνεται με την άνοδο του pH και της θερμοκρασίας και ελαττώνεται με τη σκληρότητα, τα χλωριούχα και την έλλειψη διαλυμένου οξυγόνου (Βασιλική Ευθ. Καραούλη).

1.6.4 Παραπροϊόντα της χλωρίωσης και επίπτωση στην υγεία

Αν και όλοι αναγνωρίζουν την σημασία της απολύμανσης του νερού στη δημόσια υγεία, υπάρχει και κάποια ανησυχία για τις πιθανές παρενέργειες των απολυμαντικών και ιδίως του χλωρίου στην υγεία των καταναλωτών. Από την δεκαετία του 70 και λόγω της εξέλιξης της τεχνολογίας άρχισαν να ανιχνεύονται σε χλωριωμένα νερά ορισμένες ουσίες οι οποίες είναι παραπροϊόντα της χλωρίωσης. Ορισμένες χημικές ενώσεις που βρίσκονται διαλυμένες στο νερό (χουμικά και φουλβικά οξέα, υδρόφιλα οξέα, αμινοξέα,

υδατάνθρακες κλπ) αντιδρούν με το χλώριο και δημιουργούν τα τριαλομεθάνια (THM). Ορισμένες από αυτές τις χημικές ενώσεις μπορεί να παρέχονται και από ζωντανούς υδρόβιους οργανισμούς όπως φύκη, ενώ ανόργανες ενώσεις (αιθανόλη, ακεταλδεΐδη κλπ) από απόβλητα βιομηχανικών μονάδων δημιουργούν επίσης με το χλώριο THM. Το πιο σημαντικό τριαλομεθάνιο, ως προς τις επιπτώσεις του στην υγεία είναι το χλωροφόρμιο.

Στην υγειονομική νομοθεσία των ΗΠΑ, περί καταλληλότητας του πόσιμου νερού τα ολικά τριαλομεθάνια (TTHM) πρέπει να είναι λιγότερα από 0,1 mg/l σε τέσσερις συνεχόμενες δειγματοληψίες νερού. Δυστυχώς ούτε η ελληνική, ούτε η κοινοτική νομοθεσία δεν έχει θεσπίσει ακόμη όρια συγκέντρωσης TTHM στις αντίστοιχες οδηγίες.

Η συγκέντρωση των THM σε κάποια πηγή υδροληψίας μεταβάλλεται σημαντικά υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων και γι' αυτό πρέπει η μέτρηση τους να γίνεται τουλάχιστον 4 φορές το χρόνο σε διαφορετικές εποχές. Η συγκέντρωσή τους είναι μεγαλύτερη σε επιφανειακά από υπόγεια νερά, όπου απαντώνται μόνο αν αναμειχθούν με επιφανειακές πηγές ρύπανσης. Στα επιφανειακά νερά παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση μετά από βροχοπτώσεις, επειδή γειτονικά προς την πηγή υδροληψίας εδάφη παρασύρονται μέσα στο νερό. Τον σχηματισμό των THM ευνοεί η αύξηση της θερμοκρασίας και έτσι παρατηρούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις το καλοκαίρι. Η ανησυχία για τις πιθανές επιπτώσεις των THM στην υγεία των καταναλωτών, άρχισε με την υπόθεση ότι το χλωροφόρμιο είναι καρκινογόνο. Σήμερα όμως και άλλες παρενέργειες μελετώνται όπως η στειρότητα, η τερατογένεση, η επίδραση στα νεφρά και το συκώτι, οι επιπτώσεις στο νευρικό και το αιμοποιητικό σύστημα.

Συνοπτικά μπορούμε να πούμε ότι δεν υπάρχουν προς το παρόν σαφείς ενδείξεις για τις επιπτώσεις των THM στη υγεία. Σύμφωνα με πολλούς ερευνητές είναι πολύ πιθανόν άλλα παραπροϊόντα του χλωρίου, όπως ορισμένες φουρανόνες να έχουν πολύ ισχυρότερες μεταλλαξιογόνες ιδιότητες από τα THM. Σε έκθεση της National Academy of Science Safe Drinking Water Committee των ΗΠΑ το 1987 επισημαίνεται ότι το ClO₂ και ορισμένα παραπροϊόντα του επιδρούν στο αιμοποιητικό σύστημα και μπορεί να βλάψουν κυρίως άτομα με προβλήματα στην παραγωγή ορισμένων ενζύμων ή άτομα που πάσχουν από θυρεοειδή. Επίσης, αναφέρεται ότι οι χλωραμίνες μπορεί να έχουν αρνητικές επιπτώσεις σε νεφροπαθείς και σε άτομα που πάσχουν στο συκώτι, ενώ το ελεύθερο χλώριο μπορεί να βλάψει άτομα που πάσχουν από τον θυρεοειδή και από το συκώτι (Μ. Παπαπετροπούλου *et al*, 1995, σελ.122).

1.6.5 Αντοχή των μικροοργανισμών στα απολυμαντικά

Ένα ερώτημα το οποίο δημιουργείται είναι αν, δεδομένης της ανάπτυξης μηχανισμών αντοχής των μικροβίων έναντι των αντιβιοτικών, μπορεί να ισχύει το ίδιο και στο επίπεδο των απολυμαντικών ουσιών. Η Ψευδομονάδα για παράδειγμα είναι μικροοργανισμός με αντοχή στην ιμιπενέμη.

Μελέτη του Δρ. Ν. Λεγάκη (Αν/τής Καθ. Μικροβιολογίας - Ιατρική Σχολή Αθηνών - Δ.Ε.Μ.Ε. - 1991) αναφέρει ότι στο νοσοκομειακό περιβάλλον ένα σημαντικό ποσοστό βακτηρίων είναι ανθεκτικά σε διάφορα αντιβιοτικά. Υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι τα

στελέχη αυτά όχι μόνο δεν διαφέρουν στην αντοχή τους, αλλά πολλές φορές είναι και πιο ευαίσθητα στα απολυμαντικά σε σύγκριση με τα ευαίσθητα.

Σε Συνέδριο Υγιεινής που πραγματοποιήθηκε από 9-12 Μαΐου 1996 στο Estoril (Λισσαβόνα), μελέτη του P.M.Kaulfers (Αμβούργο) αναφέρει ως συμπέρασμα ότι ο μηχανισμός αντίστασης των μικροβίων έναντι των απολυμαντικών είναι εντελώς διαφορετικός από το μηχανισμό αντίστασης έναντι των αντιβιοτικών, καθώς και ότι ο μηχανισμός αντίστασης των μικροβίων έναντι των απολυμαντικών θεωρείται υποδεέστερος και ιδιαίτερος δευτερεύουσας σημασίας για τα αποτελέσματά του.

Το δεύτερο συμπέρασμα οδηγεί στο ερώτημα εάν πράγματι υπάρχει μηχανισμός ικανός να οδηγήσει σε πραγματική, ισχυρή μικροβιακή αντοχή έναντι των απολυμαντικών.

Σε μελέτη του Πανεπιστημίου της Β. Καρολίνας (Αμερική) η οποία δημοσιεύθηκε στο Infection Control Hosp. Epidemiology στις 27-6-97 και πραγματοποιήθηκε από τους W.Rutala, M.Stiegel, T.Sarubbi, D.Weber αμφισβητείται εντελώς η ύπαρξη μηχανισμού αντοχής των μικροβίων έναντι των απολυμαντικών.

Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν νοσοκομειακά μικροβιακά στελέχη τα οποία παρουσιάζουν αντίσταση στα αντιβιοτικά. Με κλινική απομόνωση επιλέχθηκαν στελέχη *S.aureus*, *S.epidermidis*, *E.coli*, *Enterococcus* species, *K.pneumoniae* και *Ps.aeruginosa*. Σε δοκιμασίες που έγιναν επί αυτών με μία σειρά απολυμαντικών ουσιών εξάγεται το συμπέρασμα ότι η ανάπτυξη μηχανισμών μικροβιακής αντοχής έναντι των αντιβιοτικών δεν συσχετίζεται με ανάπτυξη παράλληλων μηχανισμών αντίστασης στα απολυμαντικά (www.edye.gr/seminaria/apolymantika.htm).

Ωστόσο, σύμφωνα με άλλες μελέτες ένας αριθμός από βακτήρια έχει παρατηρηθεί να αναπτύσσει αντοχή σε διαφορετικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την απολύμανση του νερού, συμπεριλαμβανομένης και της χλωρίωσης. Συγκριτική μελέτη των Ridway και Olson (1982) βρήκε ότι βακτήρια που προέρχονταν από χλωριωμένα συστήματα νερού ήταν περισσότερο ανθεκτικά στο χλώριο σε σχέση με αυτά που προέρχονταν από μη χλωριωμένα. Αυτό αποδεικνύει ότι, ίσως να υπάρχει επιλογή για περισσότερο ανθεκτικούς μικροοργανισμούς στο χλώριο στα χλωριωμένα δίκτυα νερού. Οι Maillard *et al* (1998) ανέφεραν αντοχή της *P.aeruginosa* PAO1 phage F116 στο υποχλωριώδες νάτριο, ενώ οι Stewart *et al* (2001) παρατήρησαν ότι, βακτήρια στο βιοφίλμ *Ps. aeruginosa* και *Klebsiella pneumoniae* παρουσίαζαν μεγάλη ανθεκτικότητα τόσο στο αλκαλικό υποχλωριώδες νάτριο όσο και στο chlorosulfamates (Richa Shrivastava *et al*, 2004).

1.6.6 Ισχύουσα νομοθεσία για την απολύμανση

Το νομικό πλαίσιο που ισχύει στην χώρα μας, σχετικά με την απολύμανση του πόσιμου νερού περιλαμβάνει την Υγειονομική Διάταξη ΚΥΑ Υ2/2600/2001 «Ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης», σε συμμόρφωση προς την Οδηγία 98/83/ΕΚ του Συμβουλίου της Ευρωπαϊκής Ένωσης της 3^{ης} Νοεμβρίου 1998 και την Υγειονομική Διάταξη Υ.Μ. 5673/ 4.12.57 για την απολύμανση του ύδατος των υδρεύσεων.

Η Κοινή Υπουργική Απόφαση Υ2/2600/2001, στο άρθρο 10 αναφέρει ότι, οι υπεύθυνοι λαμβάνουν όλα τα αναγκαία μέτρα ώστε να εξασφαλίζεται ότι καμία ουσία ή υλικό νέων εγκαταστάσεων, για την παραγωγή ή τη διανομή νερού ανθρώπινης κατανάλωσης, καθώς και οι προσμείξεις που προέρχονται από αυτές τις ουσίες ή υλικά νέων εγκαταστάσεων δεν παραμένουν στο νερό ανθρώπινης κατανάλωσης σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από εκείνες που απαιτούνται για τους σκοπούς της χρήσης τους και δεν υποβαθμίζουν, άμεσα ή έμμεσα, την προστασία της ανθρώπινης υγείας.

Στην Υγειονομική Διάταξη Υ.Μ. 5673/ 4.12.57 αναφέρεται ότι, η απολύμανση του ύδατος των υδρεύσεων είναι υποχρεωτική για πληθυσμό ≥ 3000 κατοίκων και διενεργείται δια του χλωρίου. Είναι ωστόσο δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και άλλη μέθοδος απολύμανσης εκτός της χλωριώσεως, μετά όμως από έγκριση με απόφαση του Υπουργείου Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης, για την οποία προαπαιτείται η υποβολή των απαραίτητων στοιχείων, η εκτέλεση των απαραίτητων δοκιμών και η κατάλληλη τεκμηρίωση για την αποτελεσματικότητα και τον τρόπο παρακολούθησης της μεθόδου. Το ποσό του εισαγόμενου χλωρίου πρέπει να είναι τόσο ώστε να παρέχει υπόλειμμα χλωρίου στα ακρότατα σημεία υδρεύσεως τουλάχιστον 0,2 mg/l, ενώ η δράση του χλωρίου θα πρέπει να εξασφαλίζεται για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 20 min από την εισαγωγή του μέχρι την κατανάλωση. Στην ίδια Υγειονομική Διάταξη, για τον έλεγχο της χλωριώσεως καθορίζεται ελάχιστος αριθμός χλωριομετρήσεων σε συνάρτηση με τον υδροδοτούμενο πληθυσμό.

Για την απολύμανση του νερού σε κανονικές συνθήκες η δόση του χλωρίου που απαιτείται είναι 0,7 – 1,0 mg/l στη δεξαμενή, ώστε στα άκρα του δικτύου να ανιχνεύεται υπόλειμμα χλωρίου τουλάχιστον 0,2 mg/l, με ενδεχόμενη ανάγκη ενδιάμεσης απολύμανσης. Όταν όμως πρέπει να γίνει υπερχλωρίωση του νερού, τότε η δόση του χλωρίου που απαιτείται είναι 50 mg/l για 24 h ή 200 mg/l για 1 – 2 h (Βασιλική Ευθ. Καραούλη).

Το υπολειμματικό χλώριο στο νερό της κολυμβητικής δεξαμενής σύμφωνα με την Υγειονομική διάταξη Γ1/ 443/ 73 «Περί κολυμβητικών δεξαμενών μετά οδηγίων κατασκευής και λειτουργίας αυτών», θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0,4 και 0,7 mg/l. Για απολύμανση με μέθοδο διαφορετική της χλωρίωσης (π.χ. Ag+, Cu+) απαιτείται έγκριση από την Υγειονομική Υπηρεσία (Υγειονομική διάταξη Γ1/ 443/ 73).

1.6.7 Ικανότητα της *Ps. aeruginosa* να επιβιώνει στο χλωριωμένο νερό

Ένας λόγος που ανιχνεύεται η *Ps. aeruginosa* σε χλωριωμένο περιβάλλον, είναι η ικανότητα της να επιβιώνει στις συγκεντρώσεις χλωρίου που κυρίως χρησιμοποιούνται για την απολύμανση τόσο των κολυμβητικών δεξαμενών όσο και άλλων συστημάτων νερού (Susanne Grobe *et al*, 2001).

Στην μελέτη της Susanne Grobe *et al* (2001) συγκρίθηκε ένα βλεννώδες στέλεχος *Ps. aeruginosa* με ένα μη βλεννώδες ίδιου γενετικού προφίλ, προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση της παραγωγής του αλγινικού στην επιβίωση των βακτηρίων σε χλωριωμένα συστήματα νερού. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ένα βλεννώδες στέλεχος *Ps. aeruginosa* που απομονώθηκε από το βιοφίλμ τεχνητού συστήματος νερού και ένα μη βλεννώδες στέλεχος που προέκυψε από την μετατροπή του βλεννώδους στελέχους. Σύμφωνα με μετρήσεις που έγιναν σε χρόνους έκθεσης 0.5 λεπτά και 5 λεπτά διαπιστώθηκε ότι, το βλεννώδες στέλεχος επιβιώνει καλύτερα τόσο σε δείγματα νερού που προέρχονταν από κολυμβητικές δεξαμενές, όσο και σε δείγματα ποσίμου νερού. Μάλιστα, η διαφορά στην επιβίωση μεταξύ των βλεννώδων και των μη βλεννώδων βακτηρίων διέφερε ανάλογα με την προέλευση του νερού, με τα βλεννώδη βακτήρια να είναι περισσότερο ανθεκτικά, έως και δύο τάξεις μεγέθους, μετά από 5 λεπτά έκθεσης. Ωστόσο, η επιβίωση των βλεννώδων βακτηρίων μειώθηκε μετά το πλύσιμο τους. Όταν τα βλεννώδη βακτήρια εκτέθηκαν σε 0,45 mg/l ελεύθερου χλωρίου για 5 min, παρουσίασαν μια μείωση της επιβίωσης τους από 0,06% σε 0,01%, ενώ η επιβίωση των μη βλεννώδων κυττάρων ήταν 0,01% και πριν και μετά την διαδικασία πλυσίματος. Η προσθήκη 500 µg/ml καθαρού αλγινικού μετά το πλύσιμο των βακτηρίων ενίσχυσε την επιβίωση των κυττάρων και μάλιστα σε επίπεδα υψηλότερα από αυτά που είχαν παρατηρηθεί αρχικά. Αυτή η προστατευτική επίδραση θα μπορούσε επίσης να αποδειχτεί και για τα μη βλεννώδη κύτταρα. Γίνεται λοιπόν φανερό ότι, το αλγινικό ήταν από μόνο του αρκετό για να προστατεύσει τα βακτήρια από την δράση του χλωρίου. Η χημική αντίδραση μεταξύ του χλωρίου και του αλγινικού των βλεννώδων στελεχών *Ps. aeruginosa* ήταν προφανώς υπεύθυνη για την μεγαλύτερη κατανάλωση χλωρίου που επιδείκνυαν τα βλεννώδη κύτταρα συγκριτικά με τα μη βλεννώδη.

Μπορούμε λοιπόν να συμπεράνουμε ότι, τα βλεννώδη στελέχη *Ps. aeruginosa* είναι αυτά που επιμένουν σε χλωριωμένα συστήματα νερού. Δεδομένου ότι, όλα τα στελέχη *Ps. aeruginosa* φέρουν τα γονίδια που κωδικοποιούν την ρύθμιση και την βιοσύνθεση του αλγινικού τα βακτήρια αυτά μπορεί να εισέρχονται στα συστήματα νερού ήδη στην βλεννώδη τους μορφή ή αυτή να προκύπτει λόγω επιλογής κατά τον αποικισμό του χλωριωμένου περιβάλλοντος (Susanne Grobe *et al*, 2001).

Μια πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι συγκεντρώσεις χλωρίου 0,2 mg/l και σε χρονικό διάστημα 1 min σκοτώνουν μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό περιβαλλοντικών στελεχών *Ps. aeruginosa* που προέρχονται από νερό βρύσης, μεταλλικό νερό και νερό από πηγάδι. Το αξιοσημείωτο είναι ότι αρκετά από αυτά τα περιβαλλοντικά στελέχη δεν σκοτώνονται ούτε σε συγκεντρώσεις χλωρίου 0,6 mg/l, που είναι τριπλάσια της συνιστώμενης συγκέντρωσης χλωρίου του ≥ 0.2 mg/l. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό κατά πόσο σχετίζεται η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο χλώριο, με αυξημένη μολυσματικότητα των στελεχών (Marie Eliza Zamberlan da Silva *et al*, 2008).

1.7 Νομοθεσία για τον μικροβιολογικό έλεγχο *Ps. aeruginosa*

Η ισχύουσα ελληνική νομοθεσία (Κοινή Υπουργική Απόφαση Υ2/2600/2001 ΦΕΚ 892B/11-7-2001) περί ποιότητας νερού που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση και βρίσκεται σε εναρμόνιση με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 98/83/EK-3/11/1998, απαγορεύει την παρουσία *Ps. aeruginosa* ανά 250 ml δείγματος νερού που πωλείται σε φιάλες ή δοχεία.

Κατά συνέπεια δεν προβλέπεται η ανίχνευση *Ps. aeruginosa* ούτε στο νερό των Νοσοκομείων, αν και είναι δυνατό να έχει ειδικό ενδιαφέρον για τις ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις. Η δε αξιολόγηση της πρέπει να γίνεται κατά περίπτωση. Ειδικά για τις Μονάδες Τεχνητού Νεφρού, σύμφωνα με τα ισχύοντα στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία δεν προβλέπεται να γίνεται δοκιμή απομόνωσης της *Ps. aeruginosa*, ενώ η ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα πρέπει να είναι <100 c.f.u./ml. Ορισμένες χώρες ή Οργανισμοί εντός της Ε.Ε. έχουν συμπληρωματικά συμπεριλάβει την *Ps. aeruginosa* η οποία θα πρέπει να ανιχνεύεται σε αριθμούς <1 c.f.u./100ml (Robert Koch Institute- Γερμανία) ή <1 c.f.u./250ml (Ιταλία). Τέλος, κατά την ευρέως αποδεκτή Association for the Advancement of Medical Instrumentation (ΗΠΑ), δεν προβλέπεται επίσης να γίνεται δοκιμή απομόνωσης της *Ps. aeruginosa*, ενώ για την ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα θεωρείται ότι πρέπει να είναι <200 c.f.u./ml, με όριο επαγρύπνησης- συναγερμό τα 50 c.f.u./ml.

Όσον αφορά τις κολυμβητικές δεξαμενές, σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία (Γ1/443/73 (ΦΕΚ 87B) Υγ. Διάταξη «περί κολυμβητικών δεξαμενών μετά οδηγίων κατασκευής και λειτουργίας αυτών» και τις τροποποιήσεις της Γ4/1150/76/ΦΕΚ 937 B και ΔΥΓ2/80825/06/ ΦΕΚ 120 B) δεν προβλέπεται ο έλεγχος της παρουσίας *Ps. aeruginosa*. Ο έλεγχος για *Ps. aeruginosa* προβλέπεται όμως από τον Π.Ο.Υ. (WHO Guidelines 2006). Έτσι, τα ελληνικά εργαστήρια ελέγχου νερού κολυμβητηρίων ελέγχουν τα δείγματα για *Ps. aeruginosa* σαν συμπληρωματική παράμετρο και καταγράφουν την ανίχνευση της στα αποτελέσματα σαν παρατήρηση. Ο έλεγχος για *Ps. aeruginosa* προβλέπεται επίσης από όλες τις ευρωπαϊκές νομοθεσίες και επομένως συμπεριελήφθη επίσημα στους ελέγχους των κολυμβητηρίων κατά την διάρκεια των ολυμπιακών αγώνων του 2004.

1.8 Επιδημιολογία

Η εφαρμογή μοριακών τυποποιητικών μεθόδων βοηθάει σημαντικά στην προσπάθεια διαλεύκανσης της εξάπλωσης των ασθενειών που σχετίζονται με την *Ps. aeruginosa* καθώς και των λόγων που επηρεάζουν αυτή την εξάπλωση.

Αν και η *Ps. aeruginosa* έχει ανακαλυφθεί περισσότερα από 100 χρόνια και ένα πλήθος μελετών έχει ασχοληθεί με τις κλινικές εκδηλώσεις των ασθενειών που προκαλεί, την αντοχή της στα αντιβιοτικά και τους παράγοντες που σχετίζονται με τη λοίμωξη δράση της, ωστόσο πολύ λίγη γνώση υπάρχει σχετικά με τις δεξαμενές του μικροοργανισμού και τους τρόπους μετάδοσης του. Ωστόσο, με τη χρήση των μοριακών μεθόδων είναι δυνατόν να αποδειχθεί η «οριζόντια» μετάδοση στελεχών του

μικροοργανισμού από ασθενή σε ασθενή ή να εδραιωθεί μια συσχέτιση στελεχών *Ps. aeruginosa* που απομονώνονται από το περιβάλλον και τους ασθενείς (Matthias Trautmann *et al*, 2005).

Πλήθος επιδημιολογικών μελετών έχει ασχοληθεί με την υπόθεση της διασταυρούμενης μετάδοσης *Ps. aeruginosa* μεταξύ ασθενών με κυστική ίνωση. Στη μελέτη των Jacomina A. A. Hoogkamp- Korstanje *et al*, μελετήθηκαν προοπτικά ασθενείς με κυστική ίνωση για την πιθανότητα διασταυρούμενης μετάδοσης και λοίμωξης από *Ps. aeruginosa* σε καλοκαιρινή κατασκήνωση. Συγκεκριμένα, 48 αγόρια και 43 κορίτσια (ηλικίας από 6 έως 16 χρονών) χωρισμένα σε τρεις ομάδες διέμεναν σε κατασκήνωση για 10 ημέρες. Η επαφή όπως είναι φυσικό μεταξύ των ασθενών ήταν πολύ στενή. Δείγματα από πτύελα λήφθηκαν κατά την άφιξη, την αναχώρηση, δύο μήνες μετά και στην συνέχεια σε τακτά χρονικά διαστήματα. 91 στελέχη *Ps. aeruginosa* που απομονώθηκαν από 18 παιδιά της δεύτερης ομάδας μελετήθηκαν περαιτέρω. Από τα παιδιά αυτά 14 ήταν θετικά κατά την άφιξη τους (31 στελέχη), 17 παιδιά ήταν θετικά στο τέλος της κατασκήνωσης (40 στελέχη) και 13 παιδιά ήταν θετικά 2 μήνες μετά (20 στελέχη). Από την μοριακή τυποποίηση με RAPD-PCR ανάλυση φάνηκε ότι δύο γονότυποι στελεχών αποκτήθηκαν από κάποιους ασθενείς, μέσω διασταυρούμενης μετάδοσης μέσα στην κατασκήνωση (J.A.A. Hoogkamp- Korstanje *et al*, 1995).

Τα τελευταία χρόνια η εφαρμογή μοριακών τυποποιητικών μεθόδων έκανε δυνατή την αναγνώριση του νερού της βρύσης στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (Μ.Ε.Θ) ως μια σημαντική εξωγενή πηγή *Ps. aeruginosa*. Από την ανασκόπηση μελετών που δημοσιεύτηκαν τα έτη 1998-2005 φαίνεται ότι, σε ποσοστό 9,7% έως 68,1% δείγματα νερού που λήφθηκαν τυχαία από διαφορετικές Μ.Ε.Θ ήταν θετικά για *Ps. aeruginosa* και σε ποσοστό 14,2% έως 50% ο αποικισμός ή η λοίμωξη ασθενών ήταν από γονότυπους που είχαν ανευρεθεί στο νερό (Matthias Trautmann *et al*, 2005).

Οι Matthias Trautmann *et al* με μια σειρά μελετών που πραγματοποίησαν επικεντρώθηκαν στο ρόλο του νερού της βρύσης Μονάδων Εντατικής Θεραπείας Πανεπιστημιακών Νοσοκομείων. Μια από τις μελέτες που δημοσίευσαν ήταν αυτή του 2006, που πραγματοποιήθηκε σε 12κλινη Μ.Ε.Θ 10 δωματίων, που το κάθε δωμάτιο είχε την δική του βρύση παροχής νερού. Κατά την διάρκεια της εξάμηνης αυτής μελέτης, αναγνωρίστηκαν 16 ασθενείς με αποικισμό ή λοίμωξη από *Ps. aeruginosa*. Τα 60 από τα 143 δείγματα νερού που εξετάστηκαν, ως προς την παρουσία *Ps. aeruginosa* ήταν θετικά (42%). Η συχνότητα των θετικών δειγμάτων νερού σε αντιστοιχία με το κάθε δωμάτιο και τις περιπτώσεις αποικισμού / λοίμωξης των ασθενών φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 1.8.1 Ποσοστό θετικών δειγμάτων νερού και περιπτώσεις αποικισμού /λοίμωξης από *Ps. aeruginosa* αντίστοιχα για το κάθε δωμάτιο

Αριθμός δωματίου	Θετικά δείγματα νερού	Περιπτώσεις αποικισμού/ λοίμωξης ^a
1	7/13 (54%)	2
2	3/13 (23%)	2
3	12/13 (92%)	2
4	11/13 (85%)	1
5	2/13 (15%)	4
6	1/13 (8%)	2
7	0/13 (0%)	0
8	11/13 (85%)	2
9	7/13 (54%)	2
10	5/13 (38%)	1
Clean work station	1/13 (8%)	—
Σύνολο	60/143 (42%)	16

^aΤο άθροισμα των περιπτώσεων είναι μεγαλύτερο από το σύνολο, διότι 4 ασθενείς είχαν διαδοχικά νοσηλευθεί σε δύο δωμάτια

Από τα στοιχεία του πίνακα προκύπτει ότι, στο νερό του δωματίου 7 δεν ανιχνεύθηκε *Ps. aeruginosa* σε όλη την διάρκεια της μελέτης και ούτε κάποιος ασθενής απέκτησε αποικισμό / λοίμωξη από *Ps. aeruginosa*. Άλλου είδους όμως συσχέτιση μεταξύ των θετικών δειγμάτων νερού και της συχνότητας αποικισμού / λοίμωξης των ασθενών δεν μπορεί να εδραιωθεί.

Τα στελέχη που απομονώθηκαν από τους ασθενείς και τα δείγματα νερού τυποποιήθηκαν με RAPD-PCR ανάλυση και οροτυποποίηση. Με βάση τα αποτελέσματα της οροτυποποίησης δεν υπήρχε προφανής συσχέτιση μεταξύ των στελεχών που απομονώθηκαν από τους ασθενείς και τα δείγματα νερού. Από τα αποτελέσματα της RAPD-PCR ανάλυσης ωστόσο προέκυψε ότι, οι 8 από τους 16 ασθενείς (50%) είχαν αποικιστεί ή είχαν λοίμωξη από στελέχη *Ps. aeruginosa* τα οποία είχαν προηγουμένως απομονωθεί από το νερό της βρύσης του ίδιου (στην περίπτωση 1 ασθενούς) ή άλλων (στην περίπτωση 7 ασθενών) δωματίων (Matthias Trautmann *et al*, 2006).

Σε μεταγενέστερη μελέτη των Matthias Trautmann *et al*, 2008 εξετάστηκαν δείγματα νερού από τις βρύσες δωματίων ασθενών που νοσηλεύονταν σε χειρουργική Μ.Ε.Θ. στην οποία παρατηρούνταν ενδημικές λοιμώξεις από *Ps. aeruginosa* για πολλά χρόνια. Το χρονικό διάστημα από τον Μάιο έως τον Οκτώβριο του 2001 εξετάστηκαν

μικροβιολογικά ως προς την παρουσία *Ps. aeruginosa*, 117 δείγματα νερού, από τα οποία τα 113 ήταν θετικά. Η μοριακή τυποποίηση με RAPD-PCR ανάλυση έδειξε ότι όλες οι απομονώσεις *Ps. aeruginosa* άνηκαν σε έναν μοναδικό κλώνο. Το ίδιο χρονικό διάστημα 27 ασθενείς απέκτησαν αποικισμό / λοίμωξη από *Ps. aeruginosa*. Οι απομονώσεις των ασθενών σε ποσοστό 92,6% (25/27) άνηκαν επίσης στον ίδιο κλώνο. Μπορούμε λοιπόν να συμπεράνουμε ότι ο μοναδικός αυτός κλώνος της *Ps. aeruginosa* είχε αποικίσει το περιφερικό σύστημα ύδρευσης (ο μικροβιολογικός έλεγχος δειγμάτων νερού από τις κεντρικές παροχές νερού δεν ανίχνευσε *Ps. aeruginosa*) και αποτελούσε την κύρια αιτία αποικισμού / λοίμωξης των ασθενών (Matthias Trautmann *et al*, 2008).

Συμπερασματικά, όπως προκύπτει και από πλήθος άλλων μελετών στην διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, συχνά οι βρύσες παροχής νερού αποικίζονται από *Ps. aeruginosa* και έτσι ενδέχεται να αποτελούν μια σημαντική πηγή ενδημικών λοιμώξεων στις Μ.Ε.Θ. Αν και δεν έχει καθοριστεί η οδός μετάδοσης σε αυτές τις μελέτες, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι δραστηριότητες όπως το πλύσιμο του προσώπου και του σώματος, το βούρτσισμα των δοντιών του ασθενούς, το ξέπλυμα των ρινογαστρικών σωλήνων μπορούν να ευθύνονται για την μεταφορά στελεχών *Ps. aeruginosa* από την βρύση στους ασθενείς (Matthias Trautmann *et al*, 2005).

Οι στρατηγικές οι οποίες έχουν προταθεί προκειμένου να διακοπεί η μετάδοση στελεχών *Ps. aeruginosa* από την βρύση παροχής νερού στους ασθενείς περιλαμβάνουν πλήρη αποφυγή χρήσης του νερού της βρύσης για την φροντίδα του ασθενούς, αντικατάσταση ή αποστείρωση των εξαρτημάτων που έχουν αποικιστεί, ή χρήση αποστειρωμένου νερού. Στην μελέτη των Matthias Trautmann *et al*, 2008 διαπιστώθηκε μια σημαντική μείωση του χρόνιου ενδημικού αποικισμού ή λοίμωξης από *Ps. aeruginosa* σε μια χειρουργική Μ.Ε.Θ, μετά την εφαρμογή στις βρύσες 0,2 μm αποστειρωμένων φίλτρων, που αλλάζονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα. Πιο συγκεκριμένα, ο αποικισμός των ασθενών από *Ps. aeruginosa* μειώθηκε κατά 85% και οι λοιμώξεις κατά 56%. Επιπλέον, η μικροβιολογική εξέταση του νερού της βρύσης δεν ανίχνευσε *Ps. aeruginosa* στα 52 δείγματα νερού που εξετάστηκαν έναντι των 113 θετικών δειγμάτων νερού στα 117 (97%) που είχαν συλλεχθεί πριν την τοποθέτηση των φίλτρων (Matthias Trautmann *et al*, 2008). Το σημαντικό είναι ότι η τοποθέτηση των φίλτρων παρέχει ένα μόνιμο αποτέλεσμα, αντίθετα με άλλες λύσεις (αντικατάσταση / αποστείρωση εξαρτημάτων που έχουν αποικιστεί) όπου ο αποικισμός μπορεί να συμβεί ξανά γρήγορα, μέσω της ροής νερού από άλλα σημεία του δικτύου (Matthias Trautmann *et al*, 2008).

Στην νεότερη αναφορά του συστήματος US National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) η *Ps. aeruginosa* εξακολουθεί να αποτελεί τον τρίτο πιο συχνά σχετιζόμενο μικροοργανισμό με μολύνσεις τραυμάτων και πνευμονικές λοιμώξεις, την τέταρτη πιο συχνή αιτία λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος και τον πέμπτο σε σειρά απομόνωσης μικροοργανισμό από αιμοκαλλιέργειες, στις περιπτώσεις σηψαιμίας. Τα στοιχεία αυτά φαίνονται και στον πίνακα που ακολουθεί (Michael J. Richards, 2000).

Πίνακας 1.8.2 Ποσοστά ανεύρεσης παθογόνων σε συγκεκριμένες λοιμώξεις Μονάδων Εντατικής Θεραπείας, που συμμετείχαν στο σύστημα του NNIS, για το χρονικό διάστημα 1992-1998 (Michael J. Richards, 2000)

	Αιμοκαλλιέργειες	Πνευμονία	Λοιμώξεις ουροποιητικού	Λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων	Καρδιαγγειακές λοιμώξεις
Συνολικός αριθμός παθογόνων ¹	4.394	9.877	7.574	3.315	1.651
Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> , %	38.7	2.5	3.1	11.7	54.2
<i>Staphylococcus aureus</i> , %	11.5	17.0	1.4	8.8	8.6
<i>Enterococcus</i> species, %	11.3	1.8	14.3	17.1	8.7
Other gram-positive organisms, %	6.6	5.0	1.3	9.2	6.3
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , %	0.4	1.6	0	0.1	0
<i>Enterobacter</i> species, %	3.8	10.9	4.0	8.4	3.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , %	3.7	15.6	10.3	9.6	4.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , %	2.3	7.0	5.2	3.9	2.1
<i>Escherichia coli</i> , %	2.2	4.4	18.5	8.5	1.8
<i>Acinetobacter</i> species, %	1.5	2.9	0.7	0	0
<i>Citrobacter</i> species, %	0.7	1.4	2.0	1.9	1.1
<i>Serratia marcescens</i> , %	1.4	4.3	0.9	1.5	1.5
Other gram-negative organisms, %	4.0	15.7	7.1	9.2	2.0
<i>Candida albicans</i> , %	6.1	5.7	15.3	5.9	3.8
<i>Candida glabrata</i> , %	1.8	0.2	3.5	1.3	0.6
Other <i>Candida</i> species, %	3.6	1.0	6.0	1.7	1.5
<i>Aspergillus</i> , %	0	0.5	0	0.1	0
Other fungi (not <i>Candida</i> species), %	0.7	2.5	6.4	1.1	0.8

¹ Αντιπροσωπεύει τον αριθμό των παθογόνων που αναφέρονται ανά σημείο νοσοκομειακής λοίμωξης. Ακόμη και περισσότερα από 4 παθογόνα μπορεί να έχουν αναφερθεί για ένα σημείο της λοίμωξης.

Επίσης, σε περισσότερο από το 80% των ασθενών με κυστική ίνωση, εμφανίζεται λοίμωξη από *Ps. aeruginosa*. Αν και πολλά είδη βακτηρίων εκτός από την *Ps. aeruginosa* σχετίζονται με την λοίμωξη της αναπνευστικής οδού των ασθενών αυτών, όπως είναι *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* και *Burkholderia cepacia*, ωστόσο η λοίμωξη από *Ps. aeruginosa* είναι η κύρια αιτία της προοδευτικής μείωσης της πνευμονικής λειτουργίας και του πρόωρου θανάτου (Hasan Nazik *et al*, 2007).

Από τα επιδημιολογικά στοιχεία που συλλέγονται από το CDC από όλο τον κόσμο διαπιστώνεται ότι σε μεγάλο αριθμό επιδημιών αιτιολογικός παράγοντας είναι η *Ps. aeruginosa*.

Έτσι, στην Ταϊλάνδη το 1992 αναφέρθηκαν 3 περιπτώσεις μετεγχειρητικής ενδοφθαλμίτιδας σε ασθενείς μετά από επέμβαση καταράκτη, λόγω χρήσης μολυσμένου από *Ps. aeruginosa* οφθαλμικού διαλύματος.

Στην Αγγλία το 2001 αναφέρθηκαν 2340 περιπτώσεις βακτηριαμίας που οφείλονταν σε μέλη του γένους *Pseudomonas*, από τις οποίες το 77% οφειλόταν αποκλειστικά σε *Ps. aeruginosa*. Το 2002 οι περιπτώσεις βακτηριαμίας έφτασαν τις 2597.

Πολλές επιδημίες έχουν αναφερθεί επίσης για τις οποίες ενοχοποιείται η κολύμβηση σε πισίνα ή η χρήση υδρομασάζ. Στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 1.8.3) φαίνονται 8 τέτοιες περιπτώσεις, που αναφέρθηκαν τα έτη 2003 και 2004, που είχαν ως αποτέλεσμα 274 ασθενείς (www.cdc.gov)

Πίνακας 1.8.3 Επιδημίες από *Ps. aeruginosa* σε πολιτείες των ΗΠΑ, τις χρονιές 2003 και 2004

Έτος επιδημίας	Μήνας	Περιοχή	Κρούσματα	Ασθένεια	Πηγή μόλυνσης
2003	Ιανουάριος	Ιλinois	52	δερματίτιδα	spa ξεν/χειου
	Ιανουάριος	Οχάιο	17	δερματίτιδα	Πισίνα, spa ξεν/χειου
2004	Φεβρουάριος	Ιλinois	16	δερματίτιδα, οξεία αναπνευστική λοίμωξη	Πισίνα, spa ξεν/χειου
	Φεβρουάριος	Ιλinois	5	δερματίτιδα	spa ξεν/χειου
	Μάρτιος	Νότια Καρολίνα	41	δερματίτιδα	spa ξεν/χειου
	Ιούλιος	Οχάιο	119	δερματίτιδα, ωτίτιδα	πισίνα, spa
	Μάρτιος	Όρεγκον	2	δερματίτιδα	spa
	Ιούνιος	Γουινσκόνσιν	22	δερματίτιδα, γαστρεντερίτιδα	πισίνα, spa

Στην διάρκεια των ετών 2005-2006 αναφέρθηκαν τέσσερις επιδημίες υδατογενών νοσημάτων (WBDOs:waterborne-disease outbreaks) από *Ps. aeruginosa* σε spa (Κονέτικατ Απρίλιος 2005, Νέο Μεξικό Απρίλιος 2005, Πολιτεία Γουινσκόνσιν Ιούλιος 2005 και Κάνσας Δεκέμβριος 2006) και πέντε WBDOs στις οποίες υπήρχε υπόνοια ότι προκλήθηκαν από *Ps. aeruginosa* (Μινεσότα Μάρτιος 2005, Βερμόντ Φεβρουάριος 2005, Τζόρτζια Φεβρουάριος 2006, Τενεσί Μάρτιος 2006 και Γουινσκόνσιν Φεβρουάριος 2006). Τέσσερις από αυτές τις εξάρσεις κρουσμάτων αφορούσαν spa και πέντε αφορούσαν spa και πισίνες. Το γεγονός ότι συχνά σε ενιαίο χώρο υπάρχουν και χρησιμοποιούνται τόσο spa όσο και πισίνες, κάνει επιδημιολογικά δύσκολο να ενοχοποιηθεί μια συγκεκριμένη πισίνα ή spa. Ωστόσο, ο πολλαπλασιασμός της *Pseudomonas* είναι πιο πιθανό να συμβεί στις υψηλότερες θερμοκρασίες των spa.

Η ανασκόπηση 18 περιπτώσεων έξαρσης κρουσμάτων από *Pseudomonas* έδειξε ότι η ανεπαρκής απολύμανση σχετιζόταν με όλες τις εξάρσεις που συνδέονταν με spa. Ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων και ο σχηματισμός βιοφιλμ μπορεί να αποφευχθεί με τη σωστή συντήρηση των spa, διατηρώντας βέβαια τα επίπεδα χλωρίου συνεχώς >2 ppm και τα επίπεδα pH μεταξύ 7,2-7,8. Μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο η *Pseudomonas* όσο και άλλα βακτηριακά είδη προστατεύονται στο βιοφιλμ, ακόμη και με ικανοποιητικά επίπεδα απολύμανσης και όταν μειωθούν τα επίπεδα απολύμανσης πολλαπλασιάζονται γρήγορα (www.emedicine.medscape.com/article/1053170-overview).

Πολλές περιπτώσεις απομόνωσης στελεχών *Ps. aeruginosa* αναφέρονται επίσης και στην Ελλάδα. Έτσι, σε εργασία των Μαυρίδου και συνεργατών που δημοσιεύθηκε το 2005, μελετήθηκαν 178 δημόσιες πισίνες από Αθήνα, Θεσσαλονίκη και Πάτρα. Από κάθε πισίνα λήφθηκαν από 1 έως 3 δείγματα και συνολικά υποβλήθηκαν σε μικροβιολογικό έλεγχο 3701 δείγματα. Στο 13,7% των δειγμάτων αυτών ανευρέθηκε *Ps. aeruginosa* (Mavridou A. *et al*, 2005).

Στην Ελλάδα πραγματοποιήθηκε επίσης μια μελέτη για τον έλεγχο του νερού των οδοντιατρείων, από τον Φεβρουάριο του 2001 έως και τον Ιούνιο του 2003. Στη μελέτη αυτή συμμετείχαν 42 οδοντιατρεία από Αθήνα και Πειραιά από τα οποία λήφθηκαν τόσο δείγματα νερού όσο και δείγματα βιολογικού υμενίου από τις σωληνώσεις των συσκευών. Τα δείγματα ελέγχθηκαν για τη παρουσία μικροοργανισμών όπως *Ολικά αναερόβια βακτήρια* και *Εντεροβακτήρια*, αλλά και για τη παρουσία ευκαιριακά παθογόνων μικροοργανισμών όπως *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Candida spp* και *Mycobacterium spp*. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων φαίνονται στο Πίνακα 1.8.4.

Πίνακας 1.8.4 Παρουσία μικροοργανισμών (%) σε δείγματα νερού και βιολογικού υμενίου

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	Δείγματα νερού N=42	Δείγμα από σύριγγα N=42	Αεροσύριγγες	Δείγματα από βιολογικό υμένιο N=42
<i>Ολικά αναερόβια</i>	-	88,8%	83,3%	16,1%
<i>Εντεροβακτήρια</i>	-	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>	-	7,1%	7,1%	3,2%
<i>L. pneumophila</i>	-	-	-	16,1%
<i>Mycobacterium spp</i>	-	2,4%	7,1%	-
<i>Candida spp</i>	-	-	2,4%	-

Η απομόνωση του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* από τα δείγματα βιολογικού υμενίου, αλλά όχι από τα δείγματα νερού επιβεβαιώνουν τη συνεισφορά της ανάπτυξης βιολογικού υμενίου στη παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών (Mavridou A. *et al*, 2006).

1.9 Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η τυποποίηση στελεχών *Ps. aeruginosa* που επιζούν σε χλωριωμένα δείγματα νερού με σκοπό, καταρχήν την καταγραφή των κλώνων που ενδημούν στο συγκεκριμένο περιβάλλον και επιπλέον τη μελέτη της διασποράς του βακτηρίου *Ps. aeruginosa*. Για το σκοπό αυτό θα ελέγξουμε στελέχη *Ps. aeruginosa* από χλωριωμένα δείγματα νερού δικτύου ύδρευσης και κολυμβητικών δεξαμενών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Θρεπτικά υποστρώματα και αντιδραστήρια

ο **Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για *Pseudomonas aeruginosa***

Pseudomonas agar base (OXOID CM 559) + Supl. CN (OXOID SR 102)

Περιέχει σε g/L:

Gelatin peptone 16,0

Casein hydrolysate 10,0

Potassium sulfate(anhydrous) (K_2SO_4) 10,0

Magnesium chloride(anhydrous) ($MgCl_2$) 1,4

Agar 11,0

pH 7.1 ± 0.2

Τα άλατα $MgCl_2$ και K_2SO_4 που περιέχει προάγουν την παραγωγή της χρωστικής. Για την προετοιμασία του υλικού προσθέτουμε 48,4g σκόνης σε 1000 ml απεσταγμένου νερού, καθώς και 10 ml glycerol. Αποστειρώνουμε στους 121 °C για 15 min. Όταν το υπόστρωμα φτάσει σε θερμοκρασία 45-50 °C προσθέτουμε το CN Supplement, η ανασύσταση του οποίου γίνεται σε 2 ml αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού και το pseudomonas agar base γίνεται εκλεκτικό για το είδος *Ps. aeruginosa*. Το C-N εκλεκτικό συμπλήρωμα περιέχει hexadecyltrimethyl ammonium bromide (cetrimide) (0,2g) και ναλιδιζικό νάτριο (0,015g), τα οποία προάγουν την παραγωγή της χρωστικής από την *Ps. aeruginosa*, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων εντεροβακτηριακών μικροβίων, όπως *Klebsiella*, *Proteus* και *Providencia*, τα οποία και αποτελούν το μεγαλύτερο πρόβλημα στα θρεπτικά υλικά που περιέχουν cetrimide (Oxoid Manual, 1998).

ο **Nutrient agar (LAB M – LAB 8)**

Περιέχει (g/l):

Peptone 5,0

Beef Extract 3,0

Sodium Chloride 8,0

Agar No.2 12,0

pH 7.4 ± 0.2

Για την προετοιμασία του υλικού προσθέτουμε 28g σε 1 l απιονισμένου νερού. Ακολουθεί ενυδάτωση του υλικού για 10 λεπτά, καλή ανάδευση και αποστείρωση στους 121 °C για 15 min. Μεταφέρουμε το υλικό σε υδατόλουτρο, προκειμένου να φθάσει σε θερμοκρασία περίπου 47°C, ανακινούμε καλά και διανέμουμε σε στείρα τριβλία Petri διαμέτρου 9 cm.

ο **Nutrient broth No 2 (LAB M – LAB 14)**

Περιέχει (g/l):

Beef extract 10,0

Balanced Peptone No.1 10,0

Sodium chloride 5,0

Για την προετοιμασία του υλικού διαλύουμε 25 gr σκόνης σε 1 l απιονισμένου νερού. Ενυδάτωση του υλικού για 10 λεπτά, καλή ανάδευση και διανομή σε σωληνάρια ανά 9 ml. Αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.

- **Acetamide Broth** (Fluka 00185), για επιβεβαιωτικές δοκιμασίες

Περιέχει (gms/litre):

Μέρος Α:

Magnesium sulphate 0,158

Sodium chloride (NaCl) 0,2

Sodium molybdate 0,20

Ferrous sulphate 0,0005

Dipotassium hydrogen phosphate 0,20

Μέρος Β:

Acetamide 2,00

Διαλύουμε 0,56 grams του Μέρους Α και 2,0 grams του Μέρους Β σε 950 ml απεσταγμένου νερού, ελέγχουμε και ρυθμίζουμε το pH σε $7,0 \pm 0,2$ στους 37 °C, αν απαιτείται. Συμπληρώνουμε μέχρι τον τελικό όγκο 1000 ml. Αναδεύουμε καλά το διάλυμα μέχρι να διαλυθεί πλήρως. Διανέμουμε σε σωληνάρια ανά 5 ml. Αποστειρώνουμε στους 121 °C για 15 min.

- **King's Agar B Base** (Merck 10991)

Περιέχει (g/l):

Proteose Peptone 20,0

tri-potassium phosphate 3-hydrate 1,8g

Magnesium sulfate 1,5

Agar-agar 10,0g

Διαλύουμε 33,5 g του υλικού καθώς και 10 g glycerol σε 1 lt απεσταγμένου νερού σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα. Διανέμουμε σε σωληνάρια ανά 9 ml και αποστειρώνουμε στους 121 °C για 15 min.

- **Bactident Oxidase** -Ταινίες του εμπορίου για την ανίχνευση της κυτοχρωμικής οξειδάσης στους μικροοργανισμούς (Merck 13300)

Περιέχουν:

N,N-dimethyl-1,4-phenylene diammonium dichloride 0,1 μmol

1-naphthol 1,0 μmol

Το ένζυμο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης είναι ένα σημαντικό μεταλλοένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας σε πολλούς αερόβιους οργανισμούς.

Η εξέταση οξειδάσης βασίζεται στην παρουσία ενός ενδοκυττάριου συστήματος οξειδάσης κυτοχρώματος, το οποίο ενεργοποιεί την οξείδωση του ανηγμένου κυτοχρώματος από το μοριακό οξυγόνο. Το γένος *Pseudomonas* παράγει ένα ένζυμο οξειδάσης, οπότε παρουσία του ατμοσφαιρικού οξυγόνου το σύστημα οξειδάσης κυτοχρώματος / κυτόχρωμα c μπορεί να οξειδώσει μια σειρά από οργανικές ουσίες, μεταξύ αυτών και το NaDi αντιδραστήριο (1-naphthol + dimethylparaphenylene diamine) με το σχηματισμό μιας έγχρωμης ένωσης, της ινδοφαινόλης. Αυτή η αντίδραση χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση και αναγνώριση των βακτηρίων.

- **Αντιδραστήριο Nessler (Merck 9028)**

Περιέχει:

Potassium tetraiodomercurate, Potassium hydroxide

- **Φιαλίδια Protect**

Τα φιαλίδια Protect είναι φιαλίδια μικρού όγκου (1,5 ml) για την φύλαξη μικροοργανισμών, κάθε ένα από τα οποία περιέχει 20-25 ειδικές χάντρες εμποτισμένες σε ένα υγρό. Φυλάσσονται σε θερμοκρασίες από -20 έως -70° C και κάθε φορά που χρειάζομαστε να αναγεννήσουμε τον μικροοργανισμό τοποθετούμε μια χάντρα από το φιαλίδιο σε θρεπτικό ζωμό (Nutrient broth) ή σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Nutrient agar).

2.2 Χημικά και ρυθμιστικά διαλύματα

- **Διάλυμα λύσης κυττάρων (πρωτόκολλο με proteinase K)** (Da Silva Filho Luiz, 2001, Wilson T. *et al*, 2001)

Χρησιμοποιήθηκε ένα διάλυμα για λύση των κυττάρων (Lysis buffer), το οποίο περιείχε: 50 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 και 1mM EDTA. Στη συνέχεια προσθήκη 20 mg/ml proteinase K.

- **Διάλυμα λύσης κυττάρων (πρωτόκολλο με lysozyme)** (Rademaker L. W. Jan *et al*, 2000)

Χρησιμοποιήθηκε ένα διάλυμα για λύση των κυττάρων (Lysis buffer), το οποίο περιείχε: 25mM Tris, 25mM EDTA, 10,3% sucrose και 10mg/ml lysozyme.

- **Tris – HCl 1M** (Sambrook *et al*, 1989)

Διαλύονται 121,1g Tris base σε 650-700 ml νερό υψηλής καθαρότητας, προστίθενται 80 ml HCl και ρυθμίζεται το pH. Συμπληρώνεται νερό μέχρι τα 1000 ml και ακολουθεί αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.

- **EDTA 0.5M** (Sambrook *et al*, 1989)

Σε 800 ml υψηλής καθαρότητας νερό διαλύονται 186,1 g Na₂EDTA*2H₂O και ρυθμίζεται το pH στο 8,0 προσθέτοντας σιγά-σιγά περίπου 50 ml 10 N NaOH. Συμπληρώνεται νερό μέχρι τα 1000 ml και αποστειρώνεται στους 121 °C για 15 min.

- **10x Tris – Borate EDTA Buffer (TBE)** (Sambrook *et al*, 1989)

Περιέχει: Tris – HCl 1M 108 g, Βορικό οξύ 55 g και 40 ml EDTA 0,5M. Για παρασκευή TBE 0,5 x γίνεται αραιώση ποσότητας του TBE 10x (π. χ. για 100 ml TBE 0,5 x, σε 95ml νερό προστίθενται 5 ml TBE 10x).

- **Βρωμιούχο Αιθίδιο (Ethidium Bromide,Fluka)**

Συσκευασία του 1g συγκέντρωσης 10 mg/ml. Για παρασκευή 2mg/ml Βρωμιούχου Αιθιδίου, σε 100 ml TBE 0,5 x διαλύονται 200 mg σκόνης Βρωμιούχου Αιθιδίου.

- **CH₃COOK 5M**

- **SDS 10%**

➤ Αιθανόλη 70%

2.3 Εξοπλισμός - Συσκευές

- Επωαστικός κλίβανος (36 ± 2) °C
- Υδατόλουτρο KÖTTERMANN
- Φυγόκεντρος minispin erppendorf S/N 0031508
- Συσκευή PCR peQLab advanced primus 25
- Λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας VILBER LOURMAT, CN-15LM, SERIAL V02 6507, μήκους κύματος 365nm
- Αποστειρωμένες μεμβράνες διήθησης 47 mm με μέγεθος πόρου 0,45 µm MILLIPORE, EZ-PAK Membrane Filters
- Ψηφιακή φωτογραφική μηχανή OLYMPUS C-5060 WIDE ZOOM
- Eppendorf Biophotometer plus No. 6132

2.4 Στοιχεία δειγμάτων νερού

Για τους σκοπούς της εργασίας συνολικά διηθήθηκαν 671 δείγματα νερού για απομόνωση στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*, σύμφωνα με την μέθοδο διήθησης μέσω μεμβρανών ISO 16266:2006 “Water quality- Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*- Method by membrane filtration”, που περιγράφεται στην συνέχεια. Όλα τα δείγματα προέρχονται από το Κεντρικό Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας (Κ.Ε.Δ.Υ.), εκτός από 6 δείγματα κολυμβητικών δεξαμενών ξενοδοχείων (του έτους 2010) τα οποία δόθηκαν από το Ερευνητικό Εργαστήριο του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Αθηνών. Τα δείγματα παρελήφθησαν σε αποστειρωμένα μπουκάλια των 500 ή 1000 ml, που περιείχαν θειοθειικό νάτριο για την εξουδετέρωση του χλωρίου, σε τελική συγκέντρωση 18 ή 20 mg/l, αν προέρχονταν από δίκτυο ύδρευσης ή κολυμβητική δεξαμενή αντίστοιχα. Η μεταφορά των δειγμάτων έγινε σε ισόθερμα ψυγεία με παγοκύστες σε θερμοκρασία 5-8 °C, ενώ η ανάλυση των δειγμάτων έγινε εντός 24 ωρών από την ώρα της δειγματοληψίας.

Οι αναλύσεις των δειγμάτων ξεκίνησαν στις 25/11/2008 και ολοκληρώθηκαν στις 24/03/2010. Τα δείγματα προέρχονται από το δίκτυο ύδρευσης διαφόρων Νομαρχιακών Αυτοδιοικήσεων και Νοσοκομείων, καθώς και από κολυμβητικές δεξαμενές.

Στον πίνακα 2.1 φαίνεται:

- ο αύξων αριθμός του δείγματος
- το είδος του δείγματος, αν δηλαδή είναι δίκτυο ύδρευσης κατοικίας, καταστήματος κ.λ.π (Δ.Υ - πράσινο χρώμα), δίκτυο ύδρευσης Νοσοκομείων (Δ.Ν. - ροζ χρώμα) ή κολυμβητική δεξαμενή (Κ.Δ. - μπλε χρώμα)
- η γεωγραφική προέλευση του δείγματος
- η ημερομηνία παραλαβής των δειγμάτων και η ημερομηνία έναρξης των αναλύσεων και τέλος
- το υπολειμματικό χλώριο (mg/l), το οποίο δυστυχώς δεν καταγράφεται πάντα, όπως θα έπρεπε στο δελτίο δειγματοληψίας από τους υπεύθυνους της δειγματοληψίας.

Πίνακας 2.1. Στοιχεία δειγμάτων

Αριθμός δείγματος	Είδος	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Ημ/νια παραλαβής- έναρξης εξέτασης	Υπολειμματικό χλώριο (mg/l)
1 ^a	Δ.Υ ¹	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	25/11/2008	0,19
2	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	25/11/2008	0,09
3	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	25/11/2008	0,32
4	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	25/11/2008	0,53
5	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	25/11/2008	0,32
6	ΔΝ ²	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/12/2008	
7	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/12/2008	
8	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/12/2008	
9	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/12/2008	
10	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	02/12/2008	0,37
11	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	02/12/2008	0,16
12	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	02/12/2008	0,21
13	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	02/12/2008	0,32
14	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	02/12/2008	0,26
15	Κ.Δ ³	Ν.Α. ΘΕΣ/ΚΗΣ	04/12/2008	1,75
16	Κ.Δ	Ν.Α. ΘΕΣ/ΚΗΣ/ ΜΕΣΟΝ ΚΟΛ. ΔΕΞ.	04/12/2008	0,28
17	Κ.Δ	Ν.Α. ΘΕΣ/ΚΗΣ/ ΕΞΟΔΟΣ ΚΟΛ. ΔΕΞ.	04/12/2008	0,25
18	Κ.Δ	Ν.Α. ΘΕΣ/ΚΗΣ	04/12/2008	0,97
19	Κ.Δ	Ν.Α. ΘΕΣ/ΚΗΣ/ ΕΙΣΟΔΟΣ ΚΟΛ. ΔΕΞ.	04/12/2008	0,24
20	Κ.Δ	Ν.Α. ΘΕΣ/ΚΗΣ/ ΕΞΟΔΟΣ ΚΟΛ.ΔΕΞ.	04/12/2008	0,3
21	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/12/2008	
22	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/12/2008	
23	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/12/2008	
24	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/12/2008	
25	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/12/2008	
26	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/12/2008	
27	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/12/2008	
28	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/12/2008	
29	Δ.Υ	Δ.Ε.Υ.Α.ΠΑΡΟΥ	09/12/2008	0,3
30	Δ.Υ	Δ.Ε.Υ.Α.ΠΑΡΟΥ	09/12/2008	0,15
31	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	10/12/2008	0,28
32	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	10/12/2008	0,32
33	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	10/12/2008	0,16
34	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	10/12/2008	0,33
35	Κ.Δ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ/ ΕΙΣΟΔΟΣ ΚΟΛ. ΔΕΞ.	15/12/2008	0,8
36	Κ.Δ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ/ ΥΠΕΡΧΕΙΛΙΣΗ ΑΡ.	15/12/2008	0,68
37	Κ.Δ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ/ ΥΠΕΡΧΕΙΛΙΣΗ ΔΕΞ.	15/12/2008	0,72
38	Δ.Υ	Ν.Α. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	16/12/2008	

Αριθμός δείγματος	Είδος	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Ημ/νια παραλαβής- έναρξης εξέτασης	Υπολειμματικό χλώριο (mg/l)
39	Δ.Υ	N.A. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	16/12/2008	
40	Δ.Υ	N.A. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	16/12/2008	
41	Κ.Δ	N.A. ΘΕΣ/ΚΗΣ/ ΜΕΣΟΝ ΕΞΩΤΕΡ.	16/12/2008	0,58
42	Κ.Δ	N.A. ΘΕΣ/ΚΗΣ/ ΜΕΣΟΝ ΕΣΩΤΕΡ.	16/12/2008	1,09
43	Κ.Δ	N.A. ΘΕΣ/ΚΗΣ	16/12/2008	
44	Κ.Δ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ ΡΗΧΟ ΣΗΜΕΙΟ	16/12/2008	0,93
45	Κ.Δ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ ΒΑΘΥ ΣΗΜΕΙΟ	16/12/2008	0,8
46	Κ.Δ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ ΒΑΘΥ ΣΗΜΕΙΟ	16/12/2008	0,88
47	Κ.Δ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ ΜΙΚΡΗ ΠΙΣ	16/12/2008	1,6
48	Κ.Δ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ ΜΕΓ. ΠΙΣ. ΕΙΣΟΔΟΣ	16/12/2008	2,26
49	Κ.Δ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ ΜΕΓ. ΠΙΣ. ΕΞΟΔΟΣ	16/12/2008	2,38
50	Κ.Δ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ ΜΙΚΡΗ ΠΙΣ.	16/12/2008	3,85
51	Δ.Υ	N.A. ΣΑΜΟΥ	17/12/2008	
52	Δ.Υ	N.A. ΣΑΜΟΥ	17/12/2008	
53	Δ.Υ	N.A. ΣΑΜΟΥ	17/12/2008	
54	Δ.Υ	N.A. ΣΑΜΟΥ	17/12/2008	
55	Δ.Υ	N.A. ΣΑΜΟΥ	17/12/2008	
56 ^β	ΔΝ	Γ.Ν. ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	20/01/2009	
57	ΔΝ	Γ.Ν. ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	20/01/2009	
58	ΔΝ	Γ.Ν. ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	20/01/2009	
59	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	26/01/2009	
60	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	26/01/2009	
61	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	26/01/2009	
62	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	26/01/2009	
63	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	26/01/2009	
64	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	26/01/2009	
65	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	26/01/2009	
66	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	26/01/2009	
67	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	03/02/2009	
68	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	03/02/2009	
69	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	03/02/2009	
70	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	03/02/2009	
71	Δ.Υ	N.A. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	04/02/2009	
72	Δ.Υ	N.A. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	04/02/2009	
73	Δ.Υ	N.A. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	04/02/2009	
74	Δ.Υ	N.A. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	04/02/2009	
75	Δ.Υ	N.A. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	04/02/2009	
76	Δ.Υ	N.A. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	04/02/2009	
77	Δ.Υ	N.A. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	04/02/2009	
78	Δ.Υ	N.A. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	04/02/2009	
79	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	09/02/2009	
80	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	11/02/2009	
81	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	11/02/2009	
82	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	11/02/2009	

Αριθμός δείγματος	Είδος	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Ημ/νια παραλαβής- έναρξης εξέτασης	Υπολειμματικό χλώριο (mg/l)
83	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	11/02/2009	
84	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	11/02/2009	0,61
85	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	11/02/2009	0,52
86	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	11/02/2009	0,37
87	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	11/02/2009	0,52
88	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	11/02/2009	0,46
89	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	11/02/2009	0,44
90	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	11/02/2009	
91	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	11/02/2009	
92	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	11/02/2009	
93	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	11/02/2009	
94	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	11/02/2009	
95	Δ.Υ	Ν.Α. ΕΥΒΟΙΑΣ	11/02/2009	
96	Δ.Υ	Ν.Α. ΕΥΒΟΙΑΣ	11/02/2009	
97	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ	16/02/2009	
98	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ	16/02/2009	
99	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ	16/02/2009	
100	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΑΙΓΙΝΑΣ	17/02/2009	0,2
101	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΑΙΓΙΝΑΣ	17/02/2009	0,28
102	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΑΙΓΙΝΑΣ	17/02/2009	0,54
103	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΑΙΓΙΝΑΣ	17/02/2009	0,16
104	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΑΙΓΙΝΑΣ	17/02/2009	0,37
105	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΑΙΓΙΝΑΣ	17/02/2009	
106	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΑΙΓΙΝΑΣ	17/02/2009	
107	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΑΙΓΙΝΑΣ	17/02/2009	
108	Δ.Υ	Ν.Α. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	18/02/2009	0,37
109	Δ.Υ	Ν.Α. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	18/02/2009	0,73
110	Δ.Υ	Ν.Α. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	18/02/2009	0,16
111	Δ.Υ	Ν.Α. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	18/02/2009	0,12
112	Δ.Υ	Ν.Α. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	18/02/2009	0,56
113	Δ.Υ	Ν.Α. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	18/02/2009	0,17
114	Δ.Υ	Ν.Α. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	18/02/2009	0,16
115	Δ.Υ	Ν.Α. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	18/02/2009	0,21
116	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/02/2009	
117	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/02/2009	
118	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/02/2009	
119	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/02/2009	
120	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/02/2009	
121	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/02/2009	
122	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/02/2009	
123	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/02/2009	
124	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	18/02/2009	0,38
125	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	18/02/2009	0,52
126	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	18/02/2009	0,24

Αριθμός δείγματος	Είδος	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Ημ/νια παραλαβής- έναρξης εξέτασης	Υπολειμματικό χλώριο (mg/l)
127	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	18/02/2009	0,3
128	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	18/02/2009	0,38
129	ΔΝ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ	23/02/2009	
130	ΔΝ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ	23/02/2009	
131	ΔΝ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ	23/02/2009	
132	ΔΝ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ	23/02/2009	
133	ΔΝ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ	23/02/2009	
134	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	03/03/2009	
135	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	03/03/2009	
136	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	03/03/2009	
137	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	03/03/2009	
138	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	04/03/2009	
139	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	04/03/2009	
140	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	04/03/2009	
141	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	04/03/2009	
142	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	04/03/2009	
143	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	04/03/2009	
144	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	04/03/2009	
145	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	04/03/2009	
146	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	04/03/2009	
147	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	04/03/2009	
148	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	10/03/2009	
149	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	10/03/2009	
150	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	10/03/2009	
151	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	10/03/2009	
152	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	10/03/2009	
153	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	10/03/2009	
154	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	10/03/2009	
155	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	10/03/2009	
156	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	10/03/2009	
157	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	10/03/2009	
158	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	10/03/2009	
159	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	16/03/2009	
160	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	16/03/2009	
161	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	16/03/2009	
162	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	16/03/2009	
163	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	16/03/2009	
164	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	16/03/2009	
165	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	17/03/2009	
166	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	17/03/2009	
167	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	17/03/2009	
168	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	17/03/2009	
169	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	17/03/2009	
170	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/03/2009	

Αριθμός δείγματος	Είδος	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Ημ/νια παραλαβής- έναρξης εξέτασης	Υπολειμματικό χλώριο (mg/l)
171	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/03/2009	
172	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/03/2009	
173	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/03/2009	
174	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/03/2009	
175	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/03/2009	
176	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/03/2009	
177	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/03/2009	
178	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/03/2009	
179	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/03/2009	
180	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/03/2009	
181	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/03/2009	
182	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	18/03/2009	
183	Δ.Υ	N.A. ΛΑΚΩΝΙΑΣ	18/03/2009	
184	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/03/2009	
185	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/03/2009	
186	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/03/2009	
187	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/03/2009	
188	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/03/2009	
189	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/03/2009	
190	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/03/2009	
191	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/03/2009	
192	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/03/2009	
193	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/03/2009	
194	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	31/03/2009	
195	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	31/03/2009	
196	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	31/03/2009	
197	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	31/03/2009	
198	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	31/03/2009	
199	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	31/03/2009	
200	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	31/03/2009	
201	Δ.Υ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΜΕΘΑΝΩΝ	31/03/2009	0,18
202	Δ.Υ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΜΕΘΑΝΩΝ	31/03/2009	0,34
203	Δ.Υ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΜΕΘΑΝΩΝ	31/03/2009	0,3
204	Δ.Υ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΜΕΘΑΝΩΝ	31/03/2009	0,15
205	Δ.Υ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΜΕΘΑΝΩΝ	31/03/2009	0,26
206	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/04/2009	
207	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/04/2009	
208	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/04/2009	
209	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/04/2009	
210	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/04/2009	
211	Δ.Υ	N.A. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	01/04/2009	
212	Δ.Υ	N.A. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	01/04/2009	
213	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	06/04/2009	
214	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	06/04/2009	

Αριθμός δείγματος	Είδος	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Ημ/νια παραλαβής- έναρξης εξέτασης	Υπολειμματικό χλώριο (mg/l)
215	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	06/04/2009	
216	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	06/04/2009	
217	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	06/04/2009	
218	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	06/04/2009	
219	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	06/04/2009	
220	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	06/04/2009	
221	ΔΝ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	08/04/2009	
222	ΔΝ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	08/04/2009	
223	ΔΝ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	08/04/2009	
224	ΔΝ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	08/04/2009	
225	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	13/04/2009	
226	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	13/04/2009	
227	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	13/04/2009	
228	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	13/04/2009	
229	Δ.Υ	Ν.Α. ΗΛΕΙΑΣ	22/04/2009	
230	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	27/04/2009	
231	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	27/04/2009	
232	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	27/04/2009	
233	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	27/04/2009	
234	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	27/04/2009	
235	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Ν. ΑΓΚΙΣΤΡΙ	05/05/2009	0,32
236	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Ν. ΑΓΚΙΣΤΡΙ	05/05/2009	0,32
237	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Ν. ΑΓΚΙΣΤΡΙ	05/05/2009	0,21
238	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Ν. ΑΓΚΙΣΤΡΙ	05/05/2009	0,16
239	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Ν. ΑΓΚΙΣΤΡΙ	05/05/2009	0,17
240	Κ.Δ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Ν. ΑΓΚΙΣΤΡΙ	05/05/2009	
241	Κ.Δ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Ν. ΑΓΚΙΣΤΡΙ	05/05/2009	
242	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	06/05/2009	
243	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	06/05/2009	
244	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	06/05/2009	
245	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	06/05/2009	
246	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	06/05/2009	
247	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	11/05/2009	
248	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	11/05/2009	
249	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	11/05/2009	
250	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	11/05/2009	
251	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	19/05/2009	
252	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	19/05/2009	
253	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	19/05/2009	
254	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	19/05/2009	
255	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	19/05/2009	
256	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	19/05/2009	
257	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	19/05/2009	
258	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	19/05/2009	

Αριθμός δείγματος	Είδος	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Ημ/νια παραλαβής- έναρξης εξέτασης	Υπολειμματικό χλώριο (mg/l)
259	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	19/05/2009	
260	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Ν. ΚΥΘΗΡΩΝ	19/05/2009	0,37
261	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Ν. ΚΥΘΗΡΩΝ	19/05/2009	0,89
262	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Ν. ΚΥΘΗΡΩΝ	19/05/2009	0,87
263	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Ν. ΚΥΘΗΡΩΝ	19/05/2009	1,09
264	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Ν. ΚΥΘΗΡΩΝ	19/05/2009	0,937
265	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Ν. ΚΥΘΗΡΩΝ	19/05/2009	1,25
266	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Ν. ΚΥΘΗΡΩΝ	19/05/2009	1,05
267	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Ν. ΚΥΘΗΡΩΝ	19/05/2009	0,917
268	Δ.Υ	Ν.Α. ΣΑΜΟΥ	19/05/2009	
269	Δ.Υ	Ν.Α. ΣΑΜΟΥ	19/05/2009	
270	Δ.Υ	Ν.Α. ΣΑΜΟΥ	19/05/2009	
271	Δ.Υ	Ν.Α. ΣΑΜΟΥ	19/05/2009	
272	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ ΑΤΤΙΚΗΣ	20/05/2009	0,6
273	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ ΑΤΤΙΚΗΣ	20/05/2009	0,6
274	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	25/05/2009	
275	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	25/05/2009	
276	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	25/05/2009	
277	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	25/05/2009	
278	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	25/05/2009	
279	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	25/05/2009	
280	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	25/05/2009	
281	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	25/05/2009	
282	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	25/05/2009	
283	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	25/05/2009	
284	Κ.Δ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΑΙΓΙΝΑΣ	26/05/2009	2,1
285	Κ.Δ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΑΙΓΙΝΑΣ	26/05/2009	2,17
286	Κ.Δ	ΑΤΤΙΚΗΣ/ ΕΣΩΤ. ΔΕΞΑΜ. / ΜΕΣΟΝ	27/05/2009	0,63
287	Κ.Δ	ΑΤΤΙΚΗΣ/ ΕΣΩΤ. ΔΕΞΑΜ. / ΑΚΡΗ	27/05/2009	0,63
288	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ ΑΤΤΙΚΗΣ/ ΕΞΩΤΕΡ. ΠΙΣΙΝΑ	27/05/2009	0,11
289	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ ΑΤΤΙΚΗΣ/ ΕΞΩΤΕΡ. ΠΙΣΙΝΑ	27/05/2009	0,11
290	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ ΑΤΤΙΚΗΣ/ ΕΣΩΤ. ΘΕΡΜΑΙΝΟΜΕΝΗ ΠΙΣΙΝΑ / ΑΚΡΟ 1	27/05/2009	0,27
291	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ ΑΤΤΙΚΗΣ/ ΕΣΩΤ. ΘΕΡΜΑΙΝΟΜΕΝΗ ΠΙΣΙΝΑ / ΑΚΡΟ 2	27/05/2009	0,27
292	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ ΑΤΤΙΚΗΣ/ ΜΙΚΡΗ ΕΣΩΤ. ΘΕΡΜΑΙΝΟΜΕΝΗ	27/05/2009	0,05
293	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ ΑΤΤΙΚΗΣ/ ΤΖΑΚΟΥΖΙ	27/05/2009	0,26
294	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ ΑΤΤΙΚΗΣ/ ΕΣΩΤΕΡ. ΘΕΡΜΑΙΝ. ΠΙΣΙΝΑ - ΤΖΑΚΟΥΖΙ	27/05/2009	0,08
295	Δ.Υ	Ν.Α. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	27/05/2009	
296	Δ.Υ	Ν.Α. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	27/05/2009	
297	Δ.Υ	Ν.Α. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	27/05/2009	
298	Δ.Υ	Ν.Α. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	27/05/2009	

Αριθμός δείγματος	Είδος	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Ημ/νια παραλαβής- έναρξης εξέτασης	Υπολειμματικό χλώριο (mg/l)
299	Δ.Υ	N.A. ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	27/05/2009	
300	Δ.Υ	N.A. ΦΘΙΩΤΙΔΑΣ	27/05/2009	
301	Δ.Υ	N.A. ΦΘΙΩΤΙΔΑΣ	27/05/2009	
302	Δ.Υ	N.A. ΦΘΙΩΤΙΔΑΣ	27/05/2009	
303	Δ.Υ	N.A. ΦΘΙΩΤΙΔΑΣ	27/05/2009	
304	Δ.Υ	N.A. ΦΘΙΩΤΙΔΑΣ	27/05/2009	
305	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	02/06/2009	
306	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	02/06/2009	
307	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	02/06/2009	
308	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	02/06/2009	
309	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	02/06/2009	
310	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	02/06/2009	
311	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	02/06/2009	
312	Δ.Υ	N.A. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	02/06/2009	
313	Δ.Υ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΠΟΡΟΥ	02/06/2009	0,67
314	Δ.Υ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΠΟΡΟΥ	02/06/2009	0,97
315	Δ.Υ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΠΟΡΟΥ	02/06/2009	1,17
316	Δ.Υ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΠΟΡΟΥ	02/06/2009	0,64
317	Κ.Δ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΤΡΟΙΖΗΝΑΣ	02/06/2009	0,57
318	Κ.Δ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΤΡΟΙΖΗΝΑΣ	02/06/2009	2,52
319	Κ.Δ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΤΡΟΙΖΗΝΑΣ	02/06/2009	0,97
320	Κ.Δ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ.ΠΟΡΟΥ	02/06/2009	1,57
321	Κ.Δ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ.ΠΟΡΟΥ	02/06/2009	1,06
322	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	09/06/2009	
323	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	09/06/2009	
324	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	09/06/2009	
325	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	09/06/2009	
326	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	09/06/2009	
327	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	09/06/2009	
328	Δ.Υ	N.A. ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	10/06/2009	0
329	Δ.Υ	N.A. ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	10/06/2009	0
330	Δ.Υ	N.A. ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	10/06/2009	
331	Δ.Υ	N.A. ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	10/06/2009	
332	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/06/2009	
333	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/06/2009	
334	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/06/2009	
335	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/06/2009	
336	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/06/2009	
337	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/06/2009	
338	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/06/2009	
339	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/06/2009	
340	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/06/2009	
341	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/06/2009	
342	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/06/2009	

Αριθμός δείγματος	Είδος	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Ημ/νια παραλαβής- έναρξης εξέτασης	Υπολειμματικό χλώριο (mg/l)
343	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/06/2009	
344	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/06/2009	
345	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/06/2009	
346	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/06/2009	
347	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/06/2009	
348	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/06/2009	
349	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/06/2009	
350	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/06/2009	
351	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/06/2009	
352	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/06/2009	
353	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/06/2009	
354	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/06/2009	
355	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/06/2009	
356	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/06/2009	
357	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/06/2009	
358	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/06/2009	
359	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/06/2009	
360	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/06/2009	
361	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/06/2009	
362	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	29/06/2009	
363	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	29/06/2009	
364	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	29/06/2009	
365	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	29/06/2009	
366	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	29/06/2009	
367	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	29/06/2009	
368	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	29/06/2009	
369	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	29/06/2009	
370	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	29/06/2009	
371	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	29/06/2009	
372	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	29/06/2009	
373	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	29/06/2009	
374	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	29/06/2009	
375	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	29/06/2009	
376	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	29/06/2009	
377	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	29/06/2009	
378	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	29/06/2009	
379	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	29/06/2009	
380	Δ.Υ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ	06/07/2009	1,18
381	Δ.Υ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ	06/07/2009	0,71
382	Δ.Υ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ	06/07/2009	0,56
383	Δ.Υ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ	06/07/2009	0,87
384	Κ.Δ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ	06/07/2009	1,25
385	Κ.Δ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ	06/07/2009	1,25
386	Κ.Δ	N.A. ΠΕΙΡΑΙΑ	06/07/2009	0,15

Αριθμός δείγματος	Είδος	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Ημ/νια παραλαβής- έναρξης εξέτασης	Υπολειμματικό χλώριο (mg/l)
387	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	07/07/2009	
388	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	07/07/2009	
389	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	07/07/2009	
390	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	07/07/2009	
391	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	07/07/2009	
392	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	07/07/2009	
393	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	07/07/2009	
394	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	07/07/2009	
395	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	07/07/2009	
396	Κ.Δ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ.ΑΓΚΙΣΤΡΙΟΥ	07/07/2009	3,84
397	Κ.Δ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ.ΑΓΚΙΣΤΡΙΟΥ	07/07/2009	3,84
398	Κ.Δ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ.ΑΓΚΙΣΤΡΙΟΥ	07/07/2009	3,84
399	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΣΑΛΑΜΙΝΑΣ	07/07/2009	1,4
400	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΣΑΛΑΜΙΝΑΣ	07/07/2009	1,7
401	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΣΑΛΑΜΙΝΑΣ	07/07/2009	1,44
402	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΣΑΛΑΜΙΝΑΣ	07/07/2009	1,057
403	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΣΑΛΑΜΙΝΑΣ	07/07/2009	1,76
404	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΣΑΛΑΜΙΝΑΣ	07/07/2009	1,12
405	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΣΑΛΑΜΙΝΑΣ	07/07/2009	1,06
406	Δ.Υ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ/ Δ. ΣΑΛΑΜΙΝΑΣ	07/07/2009	1,37
407	Κ.Δ	Ν.Α. ΚΟΡΙΝΘΙΑΣ	07/07/2009	
408	Κ.Δ	Ν.Α. ΚΟΡΙΝΘΙΑΣ	07/07/2009	
409	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/07/2009	
410	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	13/07/2009	
411	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	15/07/2009	0,15
412	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	15/07/2009	0,1
413	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	15/07/2009	0,18
414	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	15/07/2009	0,14
415	ΔΝ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	15/07/2009	
416	ΔΝ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	15/07/2009	
417	ΔΝ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	15/07/2009	
418	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/07/2009	
419	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/07/2009	
420	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/07/2009	
421	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/07/2009	
422	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/07/2009	
423	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/07/2009	
424	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/07/2009	
425	Δ.Υ	Ν.Α. ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	21/07/2009	0,1
426	Δ.Υ	Ν.Α. ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	21/07/2009	0,4
427	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	21/07/2009	0,22
428	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	21/07/2009	0,05
429	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	21/07/2009	0,13
430	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	21/07/2009	0,2

Αριθμός δείγματος	Είδος	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Ημ/νια παραλαβής- έναρξης εξέτασης	Υπολειμματικό χλώριο (mg/l)
431	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	21/07/2009	0,15
432	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	21/07/2009	0,21
433	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	21/07/2009	0,01
434	Κ.Δ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	22/07/2009	3,85
435	Κ.Δ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	22/07/2009	3,85
436	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	28/07/2009	
437	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	28/07/2009	
438	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	28/07/2009	
439	Κ.Δ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ	04/08/2009	1,2
440	Κ.Δ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ	04/08/2009	1,2
441	Κ.Δ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ	04/08/2009	1,2
442	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	05/08/2009	0,25
443	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	05/08/2009	0,2
444	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	05/08/2009	0,18
445	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	05/08/2009	0,1
446	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	10/08/2009	
447	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	26/08/2009	
448	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	26/08/2009	
449	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	26/08/2009	
450	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	26/08/2009	
451	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	26/08/2009	
452	Κ.Δ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ	11/11/2009	1,12
453	Κ.Δ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ	11/11/2009	0,19
454	Κ.Δ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ	11/11/2009	0,49
455	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	17/11/2009	
456	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	17/11/2009	
457	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	17/11/2009	
458	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	17/11/2009	
459	Κ.Δ	ΑΤΤΙΚΗΣ- Κ.Δ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ	17/11/2009	0,86
460	Κ.Δ	ΑΤΤΙΚΗΣ- Κ.Δ ΕΚΜΑΘΗΣΗΣ (ΜΙΚΡΗ)	17/11/2009	0,92
461	Κ.Δ	ΑΤΤΙΚΗΣ- ΜΕΓΑΛΗ (ΥΠΕΡΧΕΙΛΙΣΗ)	17/11/2009	0,7
462	Κ.Δ	ΑΤΤΙΚΗΣ- ΜΕΓΑΛΗ (ΜΕΣΟΝ)	17/11/2009	0,7
463	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	18/11/2009	
464	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	18/11/2009	
465	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	18/11/2009	
466	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	18/11/2009	
467	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	18/11/2009	
468	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	18/11/2009	
469	Κ.Δ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ	24/11/2009	0,34
470	Κ.Δ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ	24/11/2009	3,85
471	Κ.Δ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ	24/11/2009	2,64
472	Κ.Δ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ	24/11/2009	3,5
473	Κ.Δ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ	24/11/2009	0,25
474	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/11/2009	

Αριθμός δείγματος	Είδος	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Ημ/νια παραλαβής- έναρξης εξέτασης	Υπολειμματικό χλώριο (mg/l)
475	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/11/2009	
476	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/11/2009	
477	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/11/2009	
478	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/11/2009	
479	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/11/2009	
480	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/11/2009	
481	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/11/2009	
482	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/11/2009	
483	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/11/2009	
484	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/11/2009	
485	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/11/2009	
486	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/11/2009	
487	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/11/2009	
488	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	30/11/2009	
489	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/12/2009	
490	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/12/2009	
491	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/12/2009	
492	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/12/2009	
493	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/12/2009	
494	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/12/2009	
495	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/12/2009	
496	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/12/2009	
497	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/12/2009	
498	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/12/2009	
499	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/12/2009	
500	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	09/12/2009	
501	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	09/12/2009	
502	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	09/12/2009	
503	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	09/12/2009	
504	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	09/12/2009	
505	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	09/12/2009	
506	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	14/12/2009	
507	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	14/12/2009	
508	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	14/12/2009	
509	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	16/12/2009	
510	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	16/12/2009	
511	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	16/12/2009	
512	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	16/12/2009	
513	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	16/12/2009	
514	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	16/12/2009	
515	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	16/12/2009	
516	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	16/12/2009	
517	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	16/12/2009	
518	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	21/12/2009	

Αριθμός δείγματος	Είδος	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Ημ/νια παραλαβής- έναρξης εξέτασης	Υπολειμματικό χλώριο (mg/l)
519	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	21/12/2009	
520	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	21/12/2009	
521	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	21/12/2009	
522	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	21/12/2009	
523	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	21/12/2009	
524	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	21/12/2009	
525	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/12/2009	
526	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/12/2009	
527	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/12/2009	
528	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/12/2009	
529	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/12/2009	
530 ^γ	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	12/01/2010	
531	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	12/01/2010	
532	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	12/01/2010	
533	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	12/01/2010	
534	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	12/01/2010	
535	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	18/01/2010	
536	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	18/01/2010	
537	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	18/01/2010	
538	ΔΝ	Γ.Ν. ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	19/01/2010	
539	ΔΝ	Γ.Ν. ΠΕΡΙΦ. ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	19/01/2010	
540	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	19/01/2010	
541	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	19/01/2010	
542	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/01/2010	
543	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/01/2010	
544	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/01/2010	
545	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/01/2010	
546	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/01/2010	
547	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/01/2010	
548	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/01/2010	
549	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/01/2010	
550	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/01/2010	
551	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/01/2010	
552	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/01/2010	
553	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/01/2010	
554	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/01/2010	
555	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/01/2010	
556	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	20/01/2010	
557	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	25/01/2010	
558	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	25/01/2010	
559	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	25/01/2010	
560	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	27/01/2010	
561	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	27/01/2010	
562	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	27/01/2010	

Αριθμός δείγματος	Είδος	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Ημ/νια παραλαβής- έναρξης εξέτασης	Υπολειμματικό χλώριο (mg/l)
563	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	27/01/2010	
564	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/02/2010	
565	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/02/2010	
566	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/02/2010	
567	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/02/2010	
568	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/02/2010	
569	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/02/2010	
570	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/02/2010	
571	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/02/2010	
572	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/02/2010	
573	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/02/2010	
574	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	01/02/2010	
575	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/02/2010	
576	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/02/2010	
577	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/02/2010	
578	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/02/2010	
579	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/02/2010	
580	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/02/2010	
581	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/02/2010	
582	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/02/2010	
583	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	08/02/2010	
584	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	09/02/2010	
585	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	09/02/2010	
586	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	09/02/2010	
587	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	09/02/2010	
588	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	09/02/2010	
589	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	09/02/2010	
590	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	09/02/2010	
591	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	09/02/2010	
592	Δ.Υ	Ν.Α. ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	09/02/2010	0,2
593	Δ.Υ	Ν.Α. ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	09/02/2010	0,2
594	ΔΝ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	09/02/2010	
595	ΔΝ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	09/02/2010	
596	ΔΝ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ	09/02/2010	
597	Δ.Υ	Ν.Α. ΗΛΕΙΑΣ	10/02/2010	
598	Δ.Υ	Ν.Α. ΗΛΕΙΑΣ	10/02/2010	
599	Δ.Υ	Ν.Α. ΗΛΕΙΑΣ	10/02/2010	
600	Δ.Υ	Ν.Α. ΗΛΕΙΑΣ	10/02/2010	
601	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	10/02/2010	
602	Κ.Δ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ	17/02/2010	
603	Κ.Δ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ	17/02/2010	
604	Κ.Δ	Ν.Α. ΠΕΙΡΑΙΑ	17/02/2010	
605	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ Α	17/02/2010	0,9
606	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ Α	17/02/2010	0,95

Αριθμός δείγματος	Είδος	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Ημ/νια παραλαβής- έναρξης εξέτασης	Υπολειμματικό χλώριο (mg/l)
607	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ Β	17/02/2010	0,45
608	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ Β	17/02/2010	0,5
609	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ Γ	17/02/2010	0,54
610	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ Γ	17/02/2010	0,6
611	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/02/2010	
612	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/02/2010	
613	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/02/2010	
614	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/02/2010	
615	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/02/2010	
616	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/02/2010	
617	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/02/2010	
618	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/02/2010	
619	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/02/2010	
620	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/02/2010	
621	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/02/2010	
622	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/02/2010	
623	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/02/2010	
624	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/02/2010	
625	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	24/02/2010	
626	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	24/02/2010	
627	Δ.Υ	N.A. ΕΥΒΟΙΑΣ	03/03/2010	
628	Δ.Υ	N.A. ΕΥΒΟΙΑΣ	03/03/2010	
629	Δ.Υ	N.A. ΑΡΚΑΔΙΑΣ	03/03/2010	
630	Δ.Υ	N.A. ΑΡΚΑΔΙΑΣ	03/03/2010	
631	Δ.Υ	N.A. ΑΡΚΑΔΙΑΣ	03/03/2010	
632	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/03/2010	
633	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/03/2010	
634	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/03/2010	
635	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/03/2010	
636	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/03/2010	
637	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	15/03/2010	
638	Δ.Υ	N.A. ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	16/03/2010	0,6
639	Δ.Υ	N.A. ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	16/03/2010	0,23
640	Δ.Υ	N.A. ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	16/03/2010	0,53
641	Δ.Υ	N.A. ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	16/03/2010	0,8
642	Δ.Υ	N.A. ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	16/03/2010	0,05
643	Δ.Υ	N.A. ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	16/03/2010	0,01
644	Δ.Υ	N.A. ΑΡΚΑΔΙΑΣ	16/03/2010	
645	Δ.Υ	N.A. ΑΡΚΑΔΙΑΣ	16/03/2010	
646	Δ.Υ	N.A. ΑΡΚΑΔΙΑΣ	16/03/2010	
647	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/03/2010	
648	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/03/2010	
649	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/03/2010	
650	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/03/2010	

Αριθμός δείγματος	Είδος	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Ημ/νια παραλαβής- έναρξης εξέτασης	Υπολειμματικό χλώριο (mg/l)
651	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/03/2010	
652	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/03/2010	
653	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/03/2010	
654	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/03/2010	
655	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/03/2010	
656	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/03/2010	
657	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	22/03/2010	
658	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ-ΠΕΙΡΑΙΩΣ	22/03/2010	0,05
659	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ-ΠΕΙΡΑΙΩΣ	22/03/2010	0,08
660	Δ.Υ	Ν.Α. ΑΘΗΝΩΝ-ΠΕΙΡΑΙΩΣ	22/03/2010	0,25
661	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	24/03/2010	
662	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	24/03/2010	
663	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	24/03/2010	
664	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	24/03/2010	
665	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	24/03/2010	
666	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	24/03/2010	
667	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	24/03/2010	
668	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	24/03/2010	
669	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	24/03/2010	
670	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	24/03/2010	
671	ΔΝ	ΑΤΤΙΚΗΣ	24/03/2010	

^α: Πράσινο χρώμα δείγματα του 2008, ^β:Ροζ χρώμα δείγματα του 2009, ^γ: Κίτρινο χρώμα δείγματα του 2010, ¹:δίκτυο ύδρευσης, ¹:δίκτυο ύδρευσης νοσοκομείων, ³:κολυμβητική δεξαμενή

2.5 Ανίχνευση της *Ps. aeruginosa* στα δείγματα νερού

2.5.1 Καλλιεργητική μέθοδος ταυτοποίησης

Η ταυτοποίηση της *Ps. aeruginosa* βασίζεται στην μέθοδο διήθησης μέσω μεμβρανών ISO 16266:2006 “Water quality- Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*- Method by membrane filtration”. Η μέθοδος αυτή προορίζεται καταρχήν για εμφιαλωμένα δείγματα νερού τόσο από το εμφιαλωτήριο όσο και από το εμπόριο, μπορεί όμως να εφαρμοστεί και σε άλλα δείγματα νερού με χαμηλό μικροβιακό φορτίο, όπως είναι τα δείγματα νερού από κολυμβητικές δεξαμενές και το νερό ανθρώπινης κατανάλωσης.

Με την ταυτοποίηση καθορίζουμε το είδος στο οποίο ανήκει ένας συγκεκριμένος μικροοργανισμός (A. van Belkum *et al*, 2007).

Η *Pseudomonas aeruginosa* ορίζεται με βάση το διεθνές αυτό πρότυπο ISO, ως μικροοργανισμός που αναπτύσσεται σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει cetrimide και παράγει πυοκυανίνη ή μικροοργανισμός που αναπτύσσεται σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει cetrimide, είναι οξειδάση θετικός, φθορίζει υπό λάμπα UV ακτινοβολίας (360 ± 20)nm και παράγει αμμωνία από acetamide broth (International Standard ISO 16266:2006).

2.5.1.1. Μέθοδος διήθησης μέσω μεμβρανών

Η μέθοδος διήθησης δειγμάτων νερού μέσω μεμβρανών γίνεται σύμφωνα με το διεθνές πρότυπο ISO 8199 “Water quality- General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture”

Ληθούμε 100ml ή 250 ml από το προς εξέταση δείγμα, ανάλογα με το είδος του, αφού το ανακινήσουμε πολύ καλά.

Μεταφέρουμε τη μεμβράνη σε τρυβλίο Petri που περιέχει το CN agar, προσέχοντας να μην παγιδευτούν φυσαλίδες αέρα ανάμεσα στην μεμβράνη και το θρεπτικό υλικό.

ΕΠΩΑΣΗ

Επωάζουμε στους $(36 \pm 2)^\circ \text{C}$ για (44 ± 4) h

ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ

Ελέγχουμε τις μεμβράνες για τυχόν ανάπτυξη των αποικιών μετά από (22 ± 2) h και (44 ± 4) h.

Μετράμε όλες τις αποικίες που παράγουν μπλε/πράσινο χρώμα (πυοκυανίνη) και τις αναφέρουμε ως επιβεβαιωμένες αποικίες *Pseudomonas aeruginosa*.

Εξετάζουμε τη μεμβράνη κάτω από το UV. Προσέχουμε γιατί παρατεταμένη περίοδος παραμονής κάτω από φως UV μπορεί να καταστρέψει τις αποικίες και να μην αναπτυχθούν κατά τις επιβεβαιωτικές δοκιμασίες. Μετράμε όλες τις αποικίες που δεν παράγουν πυοκυανίνη αλλά φθορίζουν ως πιθανές αποικίες Ψευδομονάδας πυοκυανικής και τις επιβεβαιώνουμε με Acetamide Broth, όπως περιγράφεται στην συνέχεια.

Μετράμε τις αποικίες με καστανέρυθρο χρώμα οι οποίες δεν φθορίζουν ως πιθανές αποικίες Ψευδομονάδας πυοκυανικής και τις επιβεβαιώνουμε με το τεστ οξειδάσης, Acetamide Broth και King's B medium, όπως περιγράφεται στην συνέχεια. Στον πίνακα 2.2 που ακολουθεί φαίνονται συνοπτικά οι επιβεβαιωτικές δοκιμασίες όπου απαιτούνται, ανάλογα με το είδος των αποικιών.

Πίνακας 2.2. Απαιτούμενα στάδια για την επιβεβαίωση των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο CN agar

Περιγραφή αποικιών στο CN Agar	Παραγωγή αμμωνίας στο Acetamide Broth	Παραγωγή οξειδάσης	Φθορισμός στο King's B Medium	Επιβεβαιωμένες ως αποικίες Ψευδομονάδας πυοκυανικής
Μπλε-πράσινες	NT	NT	NT	NAI
Φθορίζουσες	+	NT	NT	NAI
Καστανέρυθρες	+	+	+	NAI
Άλλοι τύποι	NT	NT	NT	OXI

NT: not tested (δεν γίνεται η δοκιμή)



Εικόνα 2.1 Τυπικές αποικίες που παράγουν μπλε/πράσινο χρώμα (πυοκυανίνη) σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Pseudomas agar base + Supl. CN και αναφέρονται ως επιβεβαιωμένες αποικίες Pseudomonas aeruginosa (www.emlab.com)

2.5.1.2 Επιβεβαιωτικές δοκιμασίες

Ανακαλλιεργούμε όλες -ή όσες περισσότερες αποικίες είναι δυνατόν (ISO 8199) απαιτούν επιβεβαίωση- από τη μεμβράνη σε Nutrient agar και επωάζουμε για (22 ± 2) ώρες στους $(36 \pm 2)^\circ \text{C}$. Ελέγχουμε την ανακαλλιέργεια για καθαρότητα και συνεχίζουμε όπως φαίνεται στον πίνακα 2.2, ελέγχοντας δηλαδή την οξειδάση για τις καστανέρυθρες αποικίες. Σημειώνουμε ότι, οι αποικίες που φθορίζουν στην αρχική μεμβράνη, είναι σίγουρα οξειδάση θετικές και για αυτό το λόγο δεν τις εξετάζουμε για αυτή την παράμετρο. Χρησιμοποιούμε τα Bactident Oxidase, ως εξής: με πλαστικό ή ξύλινο ραβδάκι παίρνουμε μια καλά απομονωμένη και με καλή ανάπτυξη αποικία και την απλώνουμε στη ζώνη ανάπτυξης του Bactident Oxidase. Παρατηρούμε μέσα σε 20-60 δεύτερα την αλλαγή χρώματος και τη συγκρίνουμε με τη χρωματική κλίμακα της συσκευασίας.

Εμβολιάζουμε τις οξειδάση θετικές καστανέρυθρες αποικίες σε σωληνάριο με King's B Medium, και επωάζουμε στους $(36 \pm 2)^\circ \text{C}$ μέχρι 5 ημέρες. Εξετάζουμε την παρουσία φθορισμού κάτω από το UV και σημειώνουμε την παρουσία του ή όχι.

Εμβολιάζουμε ένα σωληνάριο με Acetamide Broth (παραγωγή αμμωνίας), από την ανακαλλιέργεια στο Nutrient agar και επωάζουμε για (22 ± 2) ώρες στους $(36 \pm 2)^\circ \text{C}$. Μετά την επώαση προσθέτουμε 1-2 σταγόνες αντιδραστηρίου Nessler. Εάν έχουμε αλλαγή χρώματος από κίτρινο ως κόκκινο κεραμιδί (ανάλογα με τη συγκέντρωση), τότε υπολογίζονται ως επιβεβαιωμένες αποικίες *Pseudomonas aeruginosa*.

2.5.1.3 Υπολογισμός

Υπολογίζουμε ως επιβεβαιωμένες αποικίες *Pseudomonas aeruginosa*, τις αποικίες που παράγουν πυοκυανίνη (μπλε – πράσινη χρωστική) ή τις αποικίες εκείνες που είναι οξειδάση θετικές, φθορίζουν κάτω από λάμπα UV και παράγουν αμμωνία από το Acetamide broth.

2.6 Τυποποίηση στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*

Ως τυποποίηση ορίζεται η διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται ανάλυση φαινοτυπικών ή/και γονοτυπικών χαρακτηριστικών των στελεχών του είδους που μελετάται και έτσι έχουμε ανάλυση σε επίπεδο είδους – υποείδους, με σκοπό την ταξινόμηση των στελεχών σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά τους και την διαλεύκανση των πηγών προέλευσης και των οδών μετάδοσης των βακτηρίων (A. van Belkum *et al*, 2007).

Η τυποποίηση μπορεί να γίνεται είτε για κλινικούς σκοπούς (μετάδοση της μόλυνσης από ασθενείς ή άλλες πηγές σε υγιή άτομα), είτε για περιβαλλοντικούς σκοπούς (παρουσία ή μετάδοση των οργανισμών στο άηυχο περιβάλλον). Η τυποποίηση όμως, εκτός του ότι διευκολύνει στην αναγνώριση των πηγών και των οδών μετάδοσης των βακτηρίων, που μπορεί να οδηγήσει στον έλεγχο της ασθένειας, μπορεί επιπλέον να συνεισφέρει στην μελέτη της παθογένειας μιας ασθένειας (π.χ. διάκριση μεταξύ μιας ασθένειας που προέρχεται από την φυσιολογική χλωρίδα ή από εξωτερική πηγή). Τέλος, η τυποποίηση μπορεί να εφαρμοστεί σε έναν μεγάλο αριθμό απομονώσεων που προέρχονται από πολλές και διαφορετικές πηγές με σκοπό να καθορίσει την δομή του βακτηριακού πληθυσμού του ίδιου είδους και να καταλήξει σε φυλογενετική υπόθεση από αυτή την δομή. Για παράδειγμα, η PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis – Ηλεκτροφόρηση σε εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο) ανάλυση του γονιδιώματος της *Ps. aeruginosa* δείχνει ότι η ομοιότητα του DNA στελεχών που δεν σχετίζονται μεταξύ τους κυμαίνεται κατά μέσο όρο μεταξύ 20% και 60%, ενώ στελέχη που προέρχονται από έναν κοινό ξενιστή εμφανίζουν ομοιότητα σε ποσοστό πάνω από 80% (A. van Belkum *et al*, 2007).

Κάθε τυποποιητική μέθοδος πρέπει να αξιολογείται και να αποδεικνύεται η εγκυρότητα της σύμφωνα με κάποια κριτήρια. Επειδή, διαφορετικές μελέτες μπορεί να εξαρτώνται από διαφορετικούς παράγοντες και να έχουν διαφορετικές απαιτήσεις, δεν υπάρχει ιδανική μέθοδος τυποποίησης. Τα κριτήρια με βάση τα οποία αξιολογείται μια τυποποιητική μέθοδος είναι:

Σταθερότητα: Αναφέρεται στην σταθερότητα του δείκτη που εξετάζει η μέθοδος τυποποίησης. Για παράδειγμα, τα χαρακτηριστικά που εξετάζει μια μέθοδος τυποποίησης πρέπει να παραμένουν σταθερά μετά την αρχική απομόνωση και κατά την διάρκεια της φύλαξης στο εργαστήριο και της ανακαλλιέργειας. Για να ελεγχθεί η σταθερότητα της μεθόδου, ανακαλλιέργειες της ίδιας απομόνωσης που αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές χρονικές περιόδους και κάτω από διαφορετικές συνθήκες εξετάζονται ταυτόχρονα (προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η διακύμανση των αποτελεσμάτων που οφείλεται στις εργαστηριακές συνθήκες) και ο δείκτης θεωρείται σταθερός αν οι ανακαλλιέργειες αυτές δεν είναι εύκολο να διακριθούν με την τυποποίηση που βασίζεται σε αυτό τον συγκεκριμένο δείκτη.

Ικανότητα τυποποίησης: Αναφέρεται στην ικανότητα της μεθόδου να τυποποιήσει όλα τα στελέχη που εξετάζει. Εκφράζεται ως το ποσοστό των τυποποιημένων στελεχών προς το συνολικό αριθμό των στελεχών που εξετάστηκαν. Αν και οι περισσότερες μοριακές μέθοδοι μπορούν να τυποποιήσουν όλα τα στελέχη που εξετάζουν (100% ικανότητα

τυποποίησης) η ικανότητα τυποποίησης μπορεί να είναι χαμηλή με τις κλασικές φαινοτυπικές μεθόδους.

Διακριτικότητα: Αναφέρεται στην ικανότητα της μεθόδου να αναγνωρίσει διαφορετικό τύπο σε δύο στελέχη που δεν σχετίζονται μεταξύ τους και εξετάζονται τυχαία από τον πληθυσμό ενός συγκεκριμένου είδους. Εκφράζεται σαν πιθανότητα χρησιμοποιώντας τον Simpson's δείκτη ποικιλότητας:

$$D = 1 - 1 / N (N - 1) \sum_{j=1}^S n_j (n_j - 1)$$

Όπου N είναι ο συνολικός αριθμός των στελεχών, S είναι ο συνολικός αριθμός των τύπων που έχουν περιγραφεί και n_j είναι ο αριθμός των στελεχών που ανήκουν στον jth τύπο. Ο δείκτης θα πρέπει ιδανικά να είναι 1.00 αλλά στην πράξη, θα πρέπει να είναι τουλάχιστον της τάξης του 0.95 για να θεωρηθεί μια μέθοδος τυποποίησης περισσότερο ή λιγότερο ιδανική. Ο υπολογισμός του δείκτη ποικιλότητας θα πρέπει να εκτιμηθεί και σε συνδυασμό με τα όρια εμπιστοσύνης, αν και αυτό είναι κάτι που γίνεται σπάνια. Οι μέθοδοι τυποποίησης που εξετάζουν ποικιλομορφία σε πολλά σημεία ολόκληρου του γονιδιώματος είναι πιο πιθανό να έχουν μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα από τις μεθόδους που εξετάζουν ποικιλομορφία σε μια συγκεκριμένη περιοχή. Για να αποφευχθεί υπερεκτίμηση της διακριτικής ικανότητας μιας μεθόδου, είναι προτιμότερο όλα τα ατυποποίητα στελέχη να συμπεριληφθούν σε μια ομάδα.

Συμφωνία με επιδημιολογικά στοιχεία: Τα αποτελέσματα μιας μεθόδου τυποποίησης θα πρέπει να αντικατοπτρίζουν, να συμφωνούν και πιθανόν να διαφωτίζουν περαιτέρω τα διαθέσιμα επιδημιολογικά στοιχεία. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από μια φαινοτυπική μέθοδο είναι λιγότερο πιθανό να συμφωνούν με τα επιδημιολογικά στοιχεία, αφού για παράδειγμα διαφορετικά στελέχη εμφανίζουν τον ίδιο φαινότυπο.

Αναπαραγωγιμότητα: Αναφέρεται στην ικανότητα της μεθόδου να αποδώσει τον ίδιο τύπο σε ένα στέλεχος που εξετάζεται σε διαφορετικό τόπο και χρόνο. Εξαρτάται τόσο από το πρωτόκολλο της μεθόδου που χρησιμοποιείται όσο και από την συνέπεια της εφαρμογής του. Οι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη είναι για παράδειγμα διακύμανση στις συνθήκες απομόνωσης του DNA, διαφορετικές παρτίδες ή αντιδραστήρια, διαφορετικός εξοπλισμός, bias στην παρατήρηση και την καταγραφή των αποτελεσμάτων και τέλος ανάλυση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Ευελιξία: Αντικατοπτρίζει το εύρος των βακτηριακών ειδών που μπορούν να τυποποιηθούν με μικρές τροποποιήσεις της μεθόδου. Κυρίως οι σύγχρονες μέθοδοι που βασίζονται στην αλληλουχία βάσεων DNA είναι ιδανικά ευέλικτες, υπό την έννοια ότι τόσο η αρχή της μεθόδου, όσο και τα προσόντα και ο εξοπλισμός που απαιτούνται είναι τα ίδια για διαφορετικά είδη.

Χρόνος: Αναφέρεται στον συνολικό χρόνο που απαιτείται από την απομόνωση του βακτηρίου μέχρι να ληφθούν τα τελικά αποτελέσματα της μεθόδου. Ιδανικά, η τυποποίηση θα πρέπει να πραγματοποιείται "in real time" έχοντας τα αποτελέσματα διαθέσιμα στην διάρκεια μιας εργάσιμης ημέρας και αυτό θα μπορούσε να ενισχύσει σημαντικά την επίδραση της τυποποίησης που γίνεται για επιδημιολογικούς σκοπούς, στην γενική ιατρική.

Προσιτότητα: Αυτή εξαρτάται από την διαθεσιμότητα των αντιδραστηρίων και του εξοπλισμού, όσο και των προσόντων που απαιτούνται για την συγκεκριμένη μέθοδο στο συγκεκριμένο εργαστήριο.

Ευκολία στην χρήση: Περιλαμβάνει την ευκολία εφαρμογής της μεθόδου από τεχνικής απόψεως, το φόρτο εργασίας, την καταλληλότητα για την ανάλυση μεγάλου αριθμού απομονώσεων και την ευκολία του να λάβεις και να ερμηνεύσεις τα αποτελέσματα.

Κόστος: Αυτό εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Αρχικά, είναι το κόστος του εξοπλισμού που απαιτείται, της ανανέωσης και της συντήρησης του καθώς και οποιεσδήποτε τροποποιήσεις πιθανόν απαιτούνται στον χώρο, όπως είναι επιπλέον εξαερισμός και ενίσχυση του δαπέδου. Πρέπει επίσης να υπολογιστεί το κόστος των αναλώσιμων ειδών και της εκπαίδευσης του προσωπικού (A. van Belkum *et al*, 2007).

Οι τυποποιητικές μέθοδοι χωρίζονται στις φαινοτυπικές και στις μοριακές. Οι φαινοτυπικές μέθοδοι βασίζονται στην σύγκριση μακροσκοπικών και μικροσκοπικών βιολογικών χαρακτηριστικών μεταξύ των βακτηριακών στελεχών ενώ, οι μοριακές εκμεταλλεύονται τα χαρακτηριστικά του γενετικού υλικού για σύγκριση στελεχών που ανήκουν στο ίδιο είδος (A. van Belkum *et al*, 2007).

2.6.1 Φαινοτυπικές Μέθοδοι

Παραδοσιακές φαινοτυπικές μέθοδοι, όπως είναι η βακτηριοφαγική τυποποίηση των *Staphylococcus aureus* και *Listeria monocytogenes*, η οροτυποποίηση της *Salmonella spp.* και της *E.coli* καθώς και η τυποποίηση των *Enterobacteriaceae* με βάση τα βιοχημικά τους χαρακτηριστικά έχουν συνεισφέρει σημαντικά στην κατανόηση της ιστορίας και της επιδημιολογίας των ασθενειών που προκαλούνται από στελέχη αυτών των βακτηρίων. Το αντιβιογράμμα επίσης, που βασίζεται στην εξέταση της ευαισθησίας του μικροοργανισμού σε διάφορα αντιβιοτικά, αποτελεί στην κλινική μικροβιολογία την πρώτη μέθοδο που χρησιμοποιείται προκειμένου να αναγνωριστούν πιθανές περιπτώσεις διασταυρούμενης μόλυνσης σε νοσηλευτικά ιδρύματα.

Οι φαινοτυπικές μέθοδοι τυποποίησης βακτηρίων ωστόσο, αν και είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για συγκεκριμένους σκοπούς, εμφανίζουν αρκετούς πρακτικούς περιορισμούς που τις καθιστούν ακατάλληλες για εμπεριστατωμένες μελέτες της δομής και της δυναμικής του βακτηριακού πληθυσμού, καθώς επίσης και της προσπάθειας ελέγχου και επιτήρησης των νοσημάτων. Επιπλέον, οι περισσότερες φαινοτυπικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για συγκεκριμένα είδη βακτηρίων και δεν έχουν γενικότερη εφαρμογή. Όμως, αν και είναι γενικά παραδεκτό ότι οι φαινοτυπικές μέθοδοι δεν μπορούν να σταθούν από μόνες τους, σε ορισμένες περιπτώσεις π.χ. οροτυποποίηση της *Salmonella* αποτελούν ένα πολύ χρήσιμο προαπαιτούμενο. Το πιο σημαντικό είναι ότι ο φαινότυπος δεν αντικατοπτρίζει πάντοτε με ακρίβεια τον γονότυπο του μικροοργανισμού και για αυτό το λόγο δεν παρέχει έναν σταθερό και αξιόπιστο επιδημιολογικό δείκτη. Επιπλέον, ο φαινότυπος δεν φανερώνει πάντοτε την εξελικτική πορεία των βακτηριακών ειδών, δηλαδή τον ρυθμό των γενετικών αλλαγών που πραγματοποιούνται (A. van Belkum *et al*, 2007). Για αυτούς τους λόγους, τις τελευταίες δεκαετίες οι φαινοτυπικές μέθοδοι έχουν αντικατασταθεί σε πολλά εργαστήρια από νεότερες μοριακές μεθόδους, όπως

είναι οι μέθοδοι που βασίζονται σε PCR, η μέθοδος αποτύπωσης του πλασμιδιακού DNA, η Ριβοτυπία, και η PFGE (FRED C. TENOVER *et al.*, 1995).

Από τις φαινοτυπικές μεθόδους τυποποίησης θα περιγράψουμε την οροτυποποίηση, η οποία αφενός εφαρμόζεται στην παρούσα εργασία στα στελέχη *Ps. aeruginosa* και αφετέρου αποτελεί τη σημαντικότερη φαινοτυπική μέθοδο που έχει αναπτυχθεί και χρησιμοποιείται ευρέως στα περισσότερα εργαστήρια τόσο για κλινικά όσο και για περιβαλλοντικά στελέχη.

2.6.1.1 Οροτυποποίηση

Η οροτυποποίηση είναι μια από τις σημαντικότερες φαινοτυπικές μεθόδους, η οποία έχει αναπτυχθεί από τις πρώτες μέρες της Μικροβιολογίας. Οι περισσότεροι τυποποιητικοί αντιοροί αντιδρούν με αντιγόνα της επιφάνειας του βακτηρίου. Είναι διαθέσιμες υψηλής απόδοσης τεχνικές, που χρησιμοποιούν καθορισμένα πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα. Ωστόσο, η ικανότητα τυποποίησης και η διακριτικότητα της μεθόδου ποικίλλει, καθώς περιπλέκεται από διασταυρούμενες αντιδράσεις. Με επαρκή όμως ποιοτικό έλεγχο τόσο των αντιορών όσο και της τεχνικής, η οροτυποποίηση μπορεί να χαρακτηρίζεται από αναπαραγωγιμότητα και να εφαρμόζεται ευρέως υπό την έννοια μιας μοναδικής βάσης δεδομένων, η οποία μπορεί να χρησιμοποιείται από διαφορετικά εργαστήρια, διαφορετικούς αναλυτές, σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, με σκοπό την συγκέντρωση υψηλής ποιότητας δεδομένων για την συγκριτική αξιολόγηση τους (library typing method). Ωστόσο, η γενετική αστάθεια, η οριζόντια γονιδιακή μεταφορά και η φυσική σύγκλιση ή η σύγκλιση που προκύπτει από την εγγενή ανοσία λόγω εμβολιασμών, περιορίζουν την ισχύ της μεθόδου (A. van Belkum *et al.*, 2007).

Ένας από τους κύριους λοιμογόνους παράγοντες που σχετίζεται με την εξωτερική μεμβράνη της *Ps. aeruginosa*, είναι ο λιποπολυσακχαρίτης LPS, ο οποίος αποτελεί κύριο συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηρίων. Δρα ως ένα φυσικό προστατευτικό καθώς μεσολαβεί στις άμεσες αλληλεπιδράσεις με τα κύτταρα του ξενιστή και τα αντιβιοτικά και επιπλέον αποτελεί την ενδοτοξίνη των Gram αρνητικών βακτηρίων, οπότε και είναι ικανός να ενεργοποιεί σειρά γεγονότων που οδηγούν στην καταστροφή των ιστών του ξενιστή και την βακτηριαίμια (Jerry D. King *et al.*, 2009).

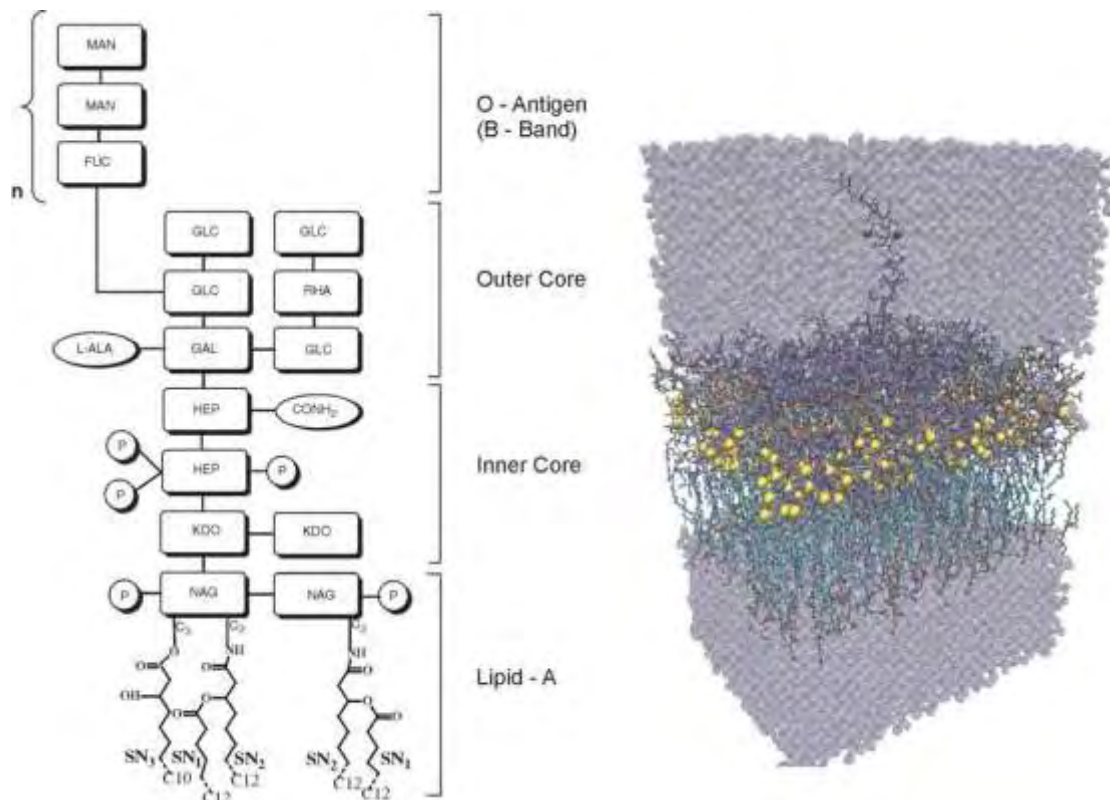
Το μόριο LPS αποτελείται από το λιπίδιο A, που ενσωματώνει το μόριο στο εξωτερικό στρώμα των λιπιδίων της εξωτερικής μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηρίων και ένα ομοιοπολικά συνδεδεμένο υδρόφιλο τμήμα πολυσακχαριτών (Thereza A. Soares *et al.*, 2008). Ο σκελετός του λιπιδίου A, που είναι το υδρόφοβο τμήμα του LPS, αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες δισακχαρίτη γλυκοζαμίνης, ενώ το πολυσακχαριδικό τμήμα αποτελείται από 9 ή 10 σάκχαρα, διακλαδιζόμενους ολιγοσακχαρίτες γνωστούς ως κεντρικός πολυσακχαρίτης (core) (Jerry D. King *et al.*, 2009). Ο κεντρικός πολυσακχαρίτης περιλαμβάνει ορισμένα μοναδικά στη φύση σάκχαρα, όπως την οκτόζη KDO (2-κετο-3-δεοξυοκτονικό οξύ) και την L-γλυκερο-D-μανοπόζη. Ο αριθμός των μορίων KDO συνήθως ποικίλει στα διάφορα βακτήρια, ενώ η δομή του κεντρικού ολιγοσακχαρίτη είναι όμοια σε στελέχη ενός συγκεκριμένου βακτηριακού είδους (Π. Α. Ξαπλαντέρη, 2008).

Ένα ποσοστό των μορίων LPS αποτελείται μόνο από αυτά τα δύο συστατικά και τα μόρια αυτά συχνά αναφέρονται ως lipid A-core (Jerry D. King *et al*, 2009). Το τρίτο συστατικό του LPS που είναι γνωστό ως σωματικό αντιγόνο O, αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες ολιγοσακχαριτών (τρισακχαριτών ή διακλαδιζόμενων τετρα- έως και επτασακχαριτών) που συνδέονται με τον κεντρικό πολυσακχαρίτη με ομοιοπολικό δεσμό (Π. Α. Ξαπλαντέρη, 2008). Τα κύτταρα της *Ps. aeruginosa* μπορούν να παράγουν ταυτόχρονα στο ίδιο κύτταρο δύο τύπους του O αντιγόνου, που διαφέρουν μεταξύ τους δομικά, ορολογικά και στους μηχανισμούς βιοσύνθεσης τους. Αυτοί οι τύποι ονομάζονται A-band και B-band O αντιγόνο ή O πολυσακχαρίτης.

Ο B-band O πολυσακχαρίτης αποτελεί την βάση της O οροτυποποίησης για την *Ps. aeruginosa* και για αυτό το λόγο ονομάζεται O-Αντιγόνο. Ο A-band O πολυσακχαρίτης έχει ονομαστεί κοινό πολυσακχαριδικό αντιγόνο (Common Polysaccharide Antigen) ή κοινός O πολυσακχαρίτης (Common O Polysaccharide) και έτσι διακρίνεται τόσο από τα O-Αντιγόνα, όσο και από τα κοινά πρωτεϊνικά αντιγόνα της εξωτερικής μεμβράνης. Το κοινό πολυσακχαριδικό αντιγόνο είναι ένα πολυμερές από D-ραμνόζη (D-Rha) που παράγεται από τα περισσότερα, αλλά όχι από όλα τα στελέχη της *Ps. aeruginosa* και προκαλεί μια συγκριτικά μικρή απόκριση αντισωμάτων. Το μήκος της αλυσίδας του πολυμερούς αυτού ποικίλλει, αλλά συνήθως αποτελείται από 70 σάκχαρα.

Το O-Αντιγόνο είναι ένα πολυμερές στο οποίο διαφορετικά σάκχαρα οργανώνονται σε επαναλαμβανόμενες μονάδες O και αντίθετα με το κοινό πολυσακχαριδικό αντιγόνο είναι εντόνως ανοσογενές, προκαλώντας τον σχηματισμό αντισωμάτων. Η φύση και ο αριθμός των σακχάρων στις επαναλαμβανόμενες μονάδες του O-Αντιγόνου ποικίλλει από στέλεχος σε στέλεχος και αυτές είναι οι δομές που αναγνωρίζονται από τα O-ειδικά αντισώματα.

Ο O- πολυσακχαρίτης και το lipid A-core συνθέτονται από διαφορετικά μονοπάτια βιοσύνθεσης και το λιπίδιο-A είναι υπεύθυνο για τις βιολογικές ιδιότητες του LPS που σχετίζονται με το εναλλακτικό του όνομα της ενδοτοξίνης (Jerry D. King *et al*, 2009).



Εικόνα 2.2 Σχηματική απεικόνιση ενός μορίου LPS (Thereza A. Soares et al, 2008)

Είναι γενικά παραδεκτό ότι, η έκφραση των Ο-αντιγόνων (που αποτελεί την βάση για την οροτυποποίηση) επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες που τροποποιούν την παραγωγή του λιποπολυσακχαρίτη, όπως είναι η έκθεση σε αντιβιοτικά ή η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών (Matthias Trautmann *et al*, 2005).

Δεν τυποποιούνται όλα τα στελέχη της *Ps. aeruginosa* με την οροτυποποίηση του Ο-Αντιγόνου, και αυτό είναι ιδιαίτερα σύνηθες σε απομονώσεις κλινικών στελεχών που έχουν χάσει την ικανότητα τους να παράγουν το Ο-Αντιγόνο. Τα βακτήρια που στερούνται του Ο-Αντιγόνου, είναι γνωστά ως rough στελέχη διότι, σε κάποια είδη, μεταλλάξεις που καταργούν την παραγωγή του Ο-Αντιγόνου οδηγούν σε rough μορφολογία των αποικιών, συγκριτικά με τις smooth αποικίες των στελεχών που παράγουν το Ο-Αντιγόνο. Η ορολογία αυτή (rough-smooth) χρησιμοποιείται για να αναφερθεί στα στελέχη Ο-polysaccharide⁻ ή Ο-polysaccharide⁺ χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η μορφολογία των αποικιών και συχνά μάλιστα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει το μόριο LPS, που μπορεί να περιέχει ή όχι Ο-πολυσακχαρίτη. Για παράδειγμα το μόριο lipid A-core μπορεί να ονομάζεται “rough-type” (R) LPS (Jerry D. King *et al*, 2009).

Απομονώσεις της *Ps. aeruginosa* από ασθενείς με κυστική ίνωση δεν τυποποιούνται με αυτή την μέθοδο εξαιτίας του rough φαινοτύπου τους. Έτσι, στελέχη από ασθενείς με κυστική ίνωση μπορούν να τυποποιηθούν αξιόπιστα μόνο με μοριακές μεθόδους (N.Renders *et al.*, 1996).

Τα rough στελέχη κατά την οροτυποποίηση δίνουν εικόνα κροκίδωσης πριν τη ρίψη του αντιορού, φαινόμενο που καλείται αυτοσυγκόλληση και θεωρείται ότι οφείλεται τόσο στα Η-αντιγόνα, που εντοπίζονται στο μαστίγιο, όσο και σε άλλα στοιχεία της κυτταρικής μεμβράνης.

Τα Η-αντιγόνα δεν μπορούν να τυποποιηθούν με το κλασικό αντιγονικό σύστημα που χρησιμοποιείται για το σωματικό αντιγόνο-Ο, ενώ παράλληλα πολλές είναι οι περιπτώσεις όπου το μαστίγιο υπερκαλύπτει το σώμα του βακτηρίου, δεν αποκαλύπτονται τα Ο-αντιγόνα και έτσι τα στελέχη δεν μπορούν να τυποποιηθούν (Arora K. *et al*, 2004).

Πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι τα στοιχεία της κυτταρικής μεμβράνης που δίνουν την εικόνα της συγκόλλησης, είναι οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης, οι οποίες προκαλούν την αντιγονική αντίδραση και καλούνται Μ-αντιγόνα. Τα στελέχη που έδωσαν το rough φαινότυπο βρέθηκε ότι διέθεταν υψηλότερη συγκέντρωση σε πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης και μικρότερη ή και καθόλου Ο-πολυσακχαριδική αλυσίδα. Έτσι, δεν έδωσαν αντίδραση συγκόλλησης με τους ορότυπους του Διεθνούς Αντιγονικού Συστήματος Τυποποίησης (International Antigenic Typing Scheme, IATS), αλλά φάνηκε να τυποποιούνται με μια άλλη ομάδα αντιορών, τους Μ-αντιορούς (Homma serotype M), με τους οποίους τα smooth στελέχη δεν μπορούσαν να τυποποιηθούν. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες αυτές πολλές φορές αντιδρούν μεταξύ τους δίνοντας εικόνα συγκόλλησης χωρίς όμως να έχει αντίδραση με κάποια αντίσωμα. Σε αυτή τη περίπτωση έχουμε την εικόνα της αυτοσυγκόλλησης με αποτέλεσμα και πάλι τα στελέχη του *Pseudomonas aeruginosa* να μην μπορούν να τυποποιηθούν. (Yokota Shin-Ichi, 1995).

Περισσότερο από το 80% των μορίων LPS που παράγονται από την *Ps. aeruginosa* στερούνται του Ο- Αντιγόνου. Η εναλλαγή μεταξύ του rough και του smooth τύπου συμβαίνει ανάλογα με τις αλλαγές στον τρόπο ζωής της *Ps. aeruginosa*. Η σύνθεση του Ο- Αντιγόνου αλλάζει ραγδαία όταν στελέχη που αρχικά αναπτύχθηκαν στο περιβάλλον του βιοφίλμ βρίσκονται ως ελεύθερα βακτήρια. Στις οξείες λοιμώξεις η *Ps. aeruginosa* συνήθως ζει ως ελεύθερο αιωρούμενο βακτήριο (planktonic), ενώ στις χρόνιες λοιμώξεις σχηματίζει βιοφίλμ. Αν και η μολυσματικότητα των Gram αρνητικών βακτηρίων σχετίζεται με τον smooth τύπο, τα στελέχη της *Ps. aeruginosa* που προκαλούν χρόνια λοίμωξη του πνεύμονα σε ασθενείς με κυστική ίνωση εκδηλώνουν τον rough τύπο. Η απώλεια του Ο- Αντιγόνου, το οποίο ουσιαστικά διεγείρει μια ανοσολογική απάντηση (αντισώματα και συμπλήρωμα), μπορεί να επιτρέπει σε αυτά τα βακτήρια να υπεκφεύγουν την άμυνα του ξενιστή. Επιπλέον, στελέχη *Ps. aeruginosa* που στερούνται του Ο- Αντιγόνου επιδεικνύουν μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα τόσο στις οξείες όσο και στις χρόνιες λοιμώξεις, καθώς και μεγαλύτερη ικανότητα προσκόλλησης στις επιφάνειες που αποτελεί και το πρώτο στάδιο για τον σχηματισμό του βιοφίλμ (Thereza A. Soares *et al*, 2008).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Αντιοροί της *Ps. aeruginosa* χρησιμοποιούνται για την οροτυποποίηση απομονώσεων *Ps. aeruginosa* βασιζόμενοι στην μέθοδο συγκόλλησης σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Τέτοιοι αντιοροί διατίθενται στο εμπόριο. Το kit που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στην International *Pseudomonas* Sub-Committee σύμφωνα με την οποία υπάρχουν 16 Ο-

Αντιγόνα, αριθμημένα από το 1 έως το 16. Προκειμένου να διευκολυνθεί η τυποποίηση διατίθενται 4 ομάδες αντιορών, τα οποία συμβολίζονται με τα ακρωνύμια PMA, PME, PMC και PMF, που έχουν την ακόλουθη σύσταση:

PMA: P1 + P3 + P4 + P6

PME: P2 + P5 + P15 + P16

PMC: P9 + P10 + P13 + P14

PMF: P7 + P8 + P11 + P12

Κάθε στέλεχος που επιβεβαιώθηκε ως *Ps. aeruginosa*, ανακαλλιεργείται σε μη εκλεκτικό θρεπτικό υλικό, Nutrient agar. Σε αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετείται σε μια σταγόνα φυσιολογικού ορού μια μεμονωμένη αποικία και αναμιγνύεται καλά μέχρι να δημιουργηθεί ένα ομοιογενές εναιώρημα. Σε περίπτωση που παρατηρηθεί συγκόλληση, το στέλεχος δεν μπορεί να εξεταστεί με τους αντιορούς διότι παρουσιάζει αυτοσυγκόλληση. Αν δεν παρατηρηθεί αυτοσυγκόλληση, προσθέτουμε σταδιακά σε αντίστοιχα εναιωρήματα του βακτηρίου με φυσιολογικό ορό έναν έναν τους πολυκλωνικούς αντιορούς μέχρι να παρατηρήσουμε συγκόλληση. Ένα θετικό αποτέλεσμα συγκόλλησης παρατηρείται μέσα σε 5 λεπτά το πολύ και είναι εύκολο να διακριθεί από τυχόν μη καλά ομογενοποιημένα κομμάτια της αποικίας. Στον πολυκλωνικό αντιορό που θα παρατηρηθεί η εικόνα της κροκίδωσης θα ακολουθήσουμε την ίδια διαδικασία με τους αντίστοιχους μονοκλωνικούς αντιορούς που περιέχει, προκειμένου να τυποποιήσουμε τελικά το στέλεχος.

Περίπου το 5% των στελεχών *Ps. aeruginosa* αυτοσυγκολλούνται, ενώ το 1% περίπου των στελεχών *Ps. aeruginosa* ανήκουν σε διαφορετικούς τύπους από τους 1-16, αλλά η τυποποίηση αυτών έχει περιορισμένη πρακτική αξία (BIO-RAD).

2.6.2 Μοριακές Μέθοδοι

Στις μοριακές μεθόδους μόρια DNA ή DNA κλάσματα μπορούν να διαχωριστούν με βάση το Μοριακό τους Βάρος με μια απλή ηλεκτροφόρηση, αποκτώντας πληροφορίες για το μήκος του γενετικού υλικού που έχουν προέλθει. Οι διαφορές αυτές στο μέγεθος μπορούν να αποτελέσουν εξαιρετικούς δείκτες για ταξινόμηση και τελική τυποποίηση βακτηριακών στελεχών (A. van Belkum *et al*, 2007).

Η μοριακή τυποποίηση κατέχει την σημαντικότερη θέση στην διευκρίνιση των οδών μετάδοσης των παθογόνων μικροβίων. Με την ανάλυση του γενετικού υλικού, μπορεί να διαπιστωθεί ποικιλομορφία σε βακτηριακό πληθυσμό του ίδιου είδους που μας οδηγεί στο συμπέρασμα αφενός της δυνατότητας του γενετικού υλικού να εξελίσσεται και αφετέρου στην ικανότητα προσαρμογής των βακτηρίων ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Αυτού του είδους οι πληροφορίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε κλινικό επίπεδο για να διακρίνουν μια επιδημική έξαρση κρουσμάτων από έναν αιτιολογικό παράγοντα, από μια τυχαία αύξηση του ποσοστού των κρουσμάτων (Nicole Renders *et al.*, 1996). Και αυτό διότι, με τις μοριακές τυποποιητικές μεθόδους καθορίζεται ο αριθμός των στελεχών που προκαλούν την αυξημένη επίπτωση της νόσου και τελικά διευκολύνεται η αναγνώριση των πηγών μόλυνσης και των οδών μετάδοσης των βακτηρίων. Ακόμη περισσότερο όμως η σωστή

εφαρμογή των μοριακών μεθόδων τυποποίησης μπορεί να βοηθήσει στην αποτελεσματικότητα των μέτρων ελέγχου της νόσου. Δυστυχώς όμως, η συσχέτιση της τυποποίησης με την στρατηγική ελέγχου νοσημάτων δεν έχει εκτιμηθεί (A. van Belkum *et al*, 2007).

Ειδικότερα για την τυποποίηση του βακτηρίου *Ps. aeruginosa*, οι μοριακές τεχνικές είναι πιο αξιόπιστες από τις φαινοτυπικές, λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας που παρουσιάζει ο μικροοργανισμός στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του, τόσο αν προέρχεται από διαφορετικούς ασθενείς όσο και αν απομονώνεται από το περιβάλλον. (Mahenthiralingam E. *et al*, 1996).

Σημαντικές μοριακές μέθοδοι για την τυποποίηση των μικροοργανισμών είναι η PFGE και η RAPD ανάλυση. Η PFGE θεωρείται η πλέον αξιόπιστη μοριακή μέθοδος στην επιδημιολογική τυποποίηση βακτηριακών στελεχών. Περιλαμβάνει σύγκριση του μοριακού προφίλ βακτηριακών στελεχών, που προέκυψαν από κατάτμηση του βακτηριακού DNA με ένζυμα περιορισμού, με σκοπό τη συσχέτιση των στελεχών και τον προσδιορισμό της κλωνικής συγγένειά τους. Η RAPD είναι μέθοδος αποτύπωσης (fingerprinting) με PCR στην οποία δεν είναι γνωστή η αλληλουχία που μεγεθύνεται. Σε αντίθεση με την κλασική PCR, χρησιμοποιείται μια αφετηρία (primer) μικρού μεγέθους (10 bp) τυχαία επιλεγμένη και η θερμοκρασία σύνδεσης της (annealing) είναι χαμηλή (25-40 °C). Στελέχη με όμοια ηλεκτροφορητικά φάσματα έχουν την ίδια κλωνική προέλευση. Η RAPD είναι χρήσιμη για επιδημιολογικούς σκοπούς (4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα 2006).

Τεχνικές όπως η PFGE και η RAPD ανάλυση έχουν χρησιμοποιηθεί για την συγκριτική μελέτη κλινικών και περιβαλλοντικών στελεχών *Ps. aeruginosa*. Τα αποτελέσματα μιας μοριακής τυποποιητικής μεθόδου ωστόσο, μπορούν να ερμηνευτούν μόνο σε σχέση με τα επιδημιολογικά δεδομένα, διότι διαφορετικά δεν μπορούμε να καταλήξουμε σε ασφαλές συμπέρασμα για την μετάδοση του μικροοργανισμού (Nicole Renders *et al.*, 1996).

2.6.2.1 Random Amplified Polymorphic DNA Ανάλυση

Η RAPD – PCR είναι μια Μοριακή Τυποποιητική μέθοδος, η οποία εκμεταλλεύεται τα χαρακτηριστικά του γενετικού υλικού με σκοπό την ταξινόμηση των βακτηριακών στελεχών σε RAPD –τύπους.

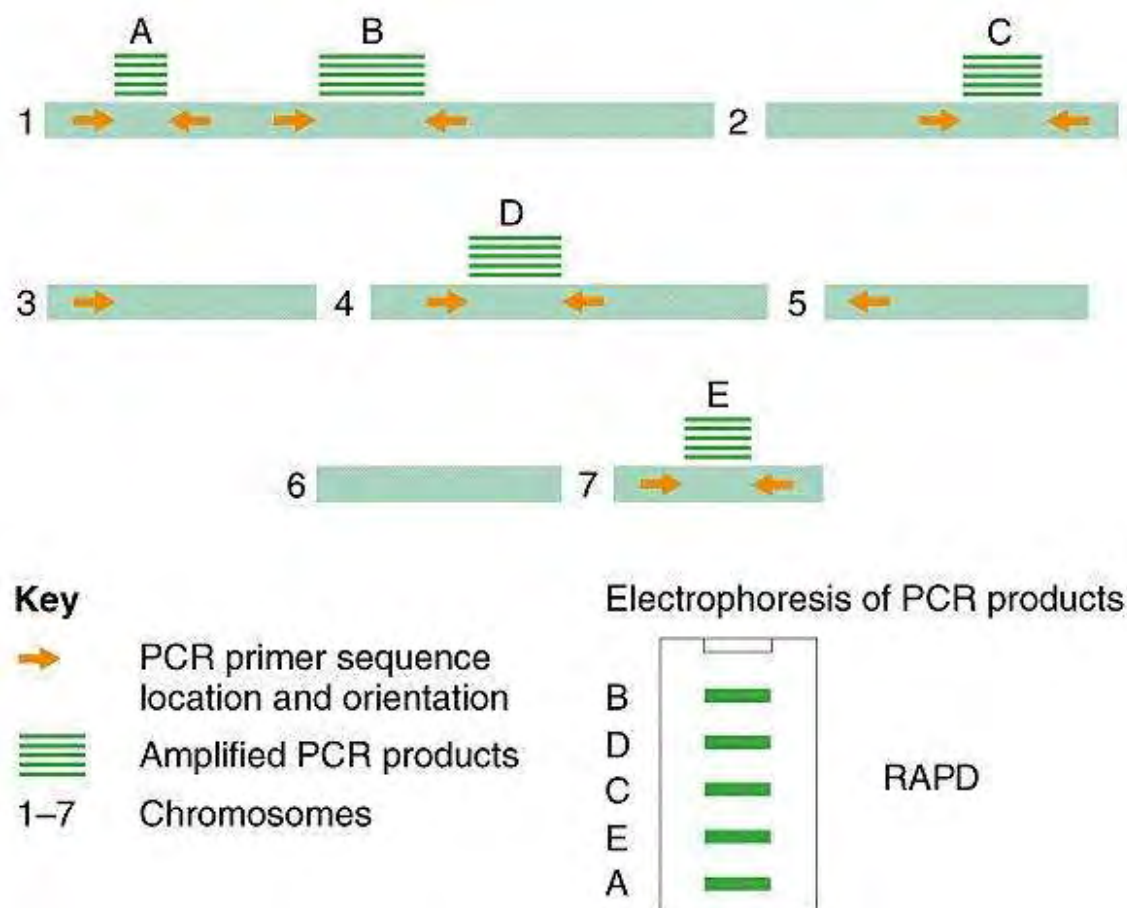
Οι Williams και οι συνεργάτες, το 1990 ήταν οι πρώτοι που χρησιμοποίησαν 10μερείς εκκινητές για την ενίσχυση τμημάτων DNA από καλαμπόκι, σόγια, βακτήρια και ανθρώπους. Κατέληξαν στο ότι, τα αποτυπώματα που πήραν από τη RAPD-PCR μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως αξιόπιστοι γενετικοί μάρτυρες με σκοπό τη γενετική αποτύπωση, αλλά και τη γρήγορη τυποποίηση βακτηριακών στελεχών (Williams, *et al*, 1990).

Η RAPD –PCR είναι μια παραλλαγή της μεθόδου PCR, στην οποία όμως δεν είναι γνωστή η αλληλουχία που μεγεθύνεται. Στην κλασσική PCR χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές ή primers) που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση. Αυτό σημαίνει ότι η αλληλουχία βάσεων των πλευρικών περιοχών του DNA στόχου θα πρέπει να είναι γνωστή, ώστε να κατασκευαστούν τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια αφετηρίες, ενώ η δομή της αλληλουχίας βάσεων του στόχου DNA είναι δυνατό να είναι άγνωστη. Αντίθετα, στην RAPD –PCR χρησιμοποιείται μια αφετηρία (primer) μικρού μεγέθους τυχαία επιλεγμένη. Στην συνέχεια με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης διαπιστώνεται αν επιτεύχθηκε πολλαπλασιασμός κάποιας αλληλουχίας στο DNA (<http://avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/project/archives/onions/rapd.html>).

Δεν είναι γνωστή η αλληλουχία στην οποία θα προσδεθούν οι εκκινητές και για αυτό θεωρείται μη ειδική μέθοδος. Για τον ίδιο λόγο χρησιμοποιείται χαμηλή θερμοκρασία υβριδισμού για να μην παραχθούν ειδικά προϊόντα. Γίνεται ανάλυση μικρού ποσοστού του γενετικού υλικού, καθώς πολλαπλασιάζονται τμήματα DNA έως 5000bp περίπου και δεν δίνονται πληροφορίες για την αλληλουχία μεταξύ των εκκινητών. Ανάλογα με τις θέσεις που υβριδίζουν οι εκκινητές και τη μεταξύ τους απόσταση προκύπτουν διαφορετικού πλήθους και μεγέθους τμήματα DNA από τα διαφορετικά στελέχη.

Για να είναι μια RAPD-PCR επιτυχής πρέπει οι εκκινητές:

- να έχουν ένα συγκεκριμένο προσανατολισμό (αντίθετη κατεύθυνση) και
- να βρίσκονται σε μια λογική απόσταση ο ένας από τον άλλο



Εικόνα 2.3 Αρχή μεθόδου της RAPD ανάλυσης (Σαζακλή Ε., 2005)

✚ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ

Παράγοντες που επηρεάζουν τον αριθμό, την ένταση και την επαναληψιμότητα των παραγόμενων αποτυπωμάτων είναι η θερμοκρασία, η συγκέντρωση των αλάτων στο ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, η συγκέντρωση του DNA, το μήκος, η συγκέντρωση και η αλληλουχία του εκκινητή, η DNA πολυμεράση και ο θερμικός κυκλοποιητής (συσκευή PCR).

Θερμοκρασία: Ένα από τα χαρακτηριστικά της μεθόδου είναι οι χαμηλές θερμοκρασίες υβριδισμού (25°-40°C) που επιτρέπουν την υβριδοποίηση του εκκινητή σε τυχαίες θέσεις δίνοντας ειδικά και μη-ειδικά προϊόντα. Έχειδειχθεί ότι υψηλότερες θερμοκρασίες εμποδίζουν τον εκκινητή να ενισχύσει τις αλληλουχίες του γενετικού υλικού.

Εκκινητής: Πρέπει να προσεχθούν η αλληλουχία του εκκινητή, το μήκος του και η συγκέντρωσή του.

Τα αποτυπώματα που θα αποκτηθούν εξαρτώνται από τον αριθμό και τη συχνότητα εμφάνισης των θέσεων υβριδισμού στο εκμαγείο. Καθώς οι θερμοκρασίες υβριδισμού είναι ιδιαίτερα χαμηλές είναι δύσκολο να προβλεφθούν τα αποτυπώματα, για αυτό είναι απαραίτητο να δοκιμαστούν αρκετοί τυχαίοι εκκινητές για την επιλογή του καταλληλότερου. Αρκετοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι η περιεκτικότητα σε γουανίνη –

κυτοσίνη (GC) παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα του υβριδισμού του εκκινητή (Σαζακλή Ε., 2005). Επιπλέον, όσον αφορά το μήκος του, το βέλτιστο μήκος του εκκινητή εξαρτάται από το εκμαγείο DNA. Έχει προταθεί ότι εκκινητές μεγαλύτεροι από 8 νουκλεοτίδια δεν αυξάνουν σημαντικά τη πληροφορία σε χαμηλές θερμοκρασίες υβριδισμού και για αυτό δεν θεωρούνται απαραίτητοι. Συγκεκριμένα για το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* έχει δείχθει ότι 10μερείς εκκινητές αυξάνουν τη διακριτική ικανότητα της μεθόδου (Barnini S. *et al*, 2004).

Τέλος, τα προϊόντα της μεθόδου μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τη συγκέντρωση του εκκινητή. Φαίνεται ότι η αντίδραση ενισχύει τη παραγωγή μικρότερων προϊόντων όσο μεγαλώνει η αναλογία εκκινητής/εκμαγείο DNA. Αυτό ίσως οφείλεται στο ότι οι εκκινητές σε υψηλότερη συγκέντρωση υβριδοποιούνται σε λιγότερο ειδικές περιοχές οδηγώντας σε περισσότερα και μικρότερα αποτυπώματα. Επιπλέον, περίσσεια του εκκινητή στο μίγμα μπορεί να οδηγήσει σε μη ειδική πρόσδεσή του στο εκμαγείο πριν καν αρχίσει η αντίδραση.

Αυτοί οι δύο σημαντικοί παράγοντες, όπως επίσης και η συγκέντρωση του εκμαγείου DNA, αλλά και η DNA-πολυμεράση που θα χρησιμοποιηθεί, πρέπει να προσεχθούν ιδιαίτερα έτσι ώστε να βελτιστοποιηθεί η μέθοδος. (Σαζακλή Ε., 2005)

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ- ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ RAPD-PCR

Η Random Amplified Polymorphic DNA PCR όπως και κάθε τυποποιητική μέθοδος έχει τόσο τα πλεονεκτήματα της όσο και τα μειονεκτήματα της. Όσον αφορά τα πλεονεκτήματα δεν απαιτείται προηγούμενη γνώση της αλληλουχίας του υπό μελέτη DNA και μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιονδήποτε μικροοργανισμό από τον οποίο μπορεί να απομονωθεί το DNA του ακόμα και σε ελάχιστες ποσότητες. Είναι μια γρήγορη, εύκολη, ασφαλής (δεν κάνει χρήση ραδιενεργών υλικών) και σχετικά φτηνή μέθοδος. Η RAPD ανιχνεύει την αλληλουχία DNA σε όλο το μήκος του γονιδιώματος και όχι μόνο σε μια ή λίγες θέσεις-στόχους.

Παρουσιάζει όμως και κάποιους περιορισμούς λόγω των τυχαίων εκκινητών που χρησιμοποιούνται. Το σημαντικότερο ίσως μειονέκτημα της μεθόδου είναι η χαμηλή επαναληψιμότητα με αποτέλεσμα να δίνεται διαφορετικό ηλεκτροφορητικό σχήμα κάθε φορά που πραγματοποιείται η RAPD ακόμη κι αν πρόκειται για τα ίδια στελέχη. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η μέθοδος είναι ευαίσθητη στις αλλαγές των συνθηκών της αντίδρασης, όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση του εκμαγείου, η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου κ. λ. π. Φυσικά και η κλασική PCR επηρεάζεται από όλες αυτές τις παραμέτρους, αλλά στην RAPD το φαινόμενο είναι πιο έντονο λόγω της χρήσης μικρού μήκους εκκινητών (Σαζακλή Ε., 2005).

2.6.2.2 Random Amplified Polymorphic DNA Ανάλυση και *Pseudomonas aeruginosa*

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η PFGE θεωρείται η πλέον αξιόπιστη μοριακή μέθοδος στην επιδημιολογική τυποποίηση βακτηριακών στελεχών. Ωστόσο, είναι πολύ σημαντική η διαπίστωση ότι, με την RAPD ανάλυση στελέχη που έχουν την ίδια κλωνική προέλευση

μπορούν να ομαδοποιηθούν το ίδιο αποτελεσματικά και αξιόπιστα όσο και με την PFGE, αν αγνοηθούν διαφορές κατά μια ζώνη. Συνεπώς, η RAPD μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια ως προκαταρκτική μέθοδος για τον χαρακτηρισμό των στελεχών *Ps. aeruginosa* για επιδημιολογικούς σκοπούς και η PFGE να χρησιμοποιηθεί σε δεύτερο στάδιο για να επιβεβαιώσει τα αποτελέσματα της RAPD ανάλυσης. Μάλιστα, κάποιοι εκκινητές αναγνωρίζουν πολυμορφισμό του DNA περισσότερο από όσο καθορίζουν τα επιδημιολογικά στοιχεία και η PFGE. Προφανώς, διαφορετικοί primers καθορίζουν διαφορετικά τη γενετική ποικιλομορφία (Nicole Renders *et al.*, 1996).

Συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων μοριακής τυποποίησης των ίδιων στελεχών *Ps. aeruginosa* με PFGE και RAPD ανάλυση, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η RAPD ανάλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρωταρχική τυποποιητική μέθοδος ανάλυσης στελεχών *Ps. aeruginosa*, εξαιτίας του ότι είναι μια γρήγορη και εύκολη στην εφαρμογή τεχνική και επιπλέον τα αποτελέσματα της συμπίπτουν με αυτά της PFGE (Dangeruta Kersulyte *et al.*, 1995). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και η μελέτη των Mahenthiralingam E. *et al.*, όπου η RAPD ανάλυση στελεχών *Ps. aeruginosa* ασθενών με κυστική ίνωση είχε την ίδια διακριτική ικανότητα με την PFGE και συστήνεται για την αρχική εξέταση μεγάλου αριθμού απομονώσεων εξαιτίας της αποδοτικότητας της (Mahenthiralingam E. *et al.*, 1996).

Επίσης, λόγω της γενετικής ποικιλομορφίας των στελεχών *Ps. aeruginosa* προτιμάται η RAPD μοριακή μέθοδος. Με δεδομένο ότι έχει διακριτική ικανότητα παρόμοια με αυτή της PFGE, προτείνεται για τυποποίηση μεγάλου αριθμού στελεχών, λόγω της αποδοτικότητας της. Μάλιστα σε μεγάλο ποσοστό τα RAPD αποτυπώματα παραμένουν σταθερά ακόμη και όταν παρατηρούνται αλλαγές στον φαινότυπο των βακτηριακών στελεχών (Mahenthiralingam E. *et al.*, 1996).

Η υψηλή αναπαραγωγιμότητα και διακριτική ικανότητα της μεθόδου στοιχειοθετείται και από την μελέτη των Maureen Campbell *et al.* (2000). Στην μελέτη αυτή 200 απομονώσεις *P. aeruginosa*, μεταξύ των οποίων 10 απομονώσεις από το περιβάλλον και 150 από ασθενείς με κυστική ίνωση (από 5 γεωγραφικά διακριτές περιοχές) εξετάστηκαν εις τριπλούν με την RAPD ανάλυση. Από τις 200 απομονώσεις, οι 197 παρήγαγαν τις ίδιες ηλεκτροφορητικές εικόνες και στα τρία δείγματα, ενώ οι τρεις στα δύο από τα τρία δείγματα που εξετάστηκαν. Σύμφωνα με την μελέτη αυτή, η RAPD ανάλυση είχε υψηλή αναπαραγωγιμότητα, με ποσοστό 98,5%. Στελέχη που σχετίζονταν επιδημιολογικά, για παράδειγμα πολλαπλές απομονώσεις από έναν ασθενή, αναγνωρίστηκαν ως όμοια από την RAPD ανάλυση. Στελέχη που δεν σχετίζονταν επιδημιολογικά, όπως τα στελέχη που προέρχονταν από το περιβάλλον άνηκαν το κάθε ένα σε έναν διαφορετικό RAPD τύπο. Η μέθοδος αυτή λοιπόν είχε υψηλό ποσοστό αναπαραγωγιμότητας και ήταν ικανή να διακρίνει στελέχη που δεν σχετίζονταν μεταξύ τους. Συμπερασματικά, η RAPD είναι μια αυτοδύναμη, απλή και με υψηλή αναπαραγωγιμότητα τυποποιητική μέθοδος που θα μπορούσε να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην διαλεύκανση της επιδημιολογίας της *P. aeruginosa* σε ασθενείς με κυστική ίνωση. Η RAPD ταιριάζει ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου μεγάλος αριθμός απομονώσεων πρέπει να εκτιμηθεί. Τα αποτελέσματα της RAPD μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με την περισσότερο χρονοβόρα PFGE, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η διαφορά ή η ομοιότητα σε μικρότερους αριθμούς απομονώσεων στην περίπτωση ενός ασαφούς αποτελέσματος της RAPD ανάλυσης (Maureen Campbell *et al.*, 2000).

Όμως, αν και χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό αναπαραγωγιμότητας εντός του ίδιου εργαστηρίου, μπορεί να παράγει διαφορετικά αποτελέσματα, όταν εφαρμόζεται σε διαφορετικά εργαστήρια (Nicole Renders *et al.*, 1996).

2.6.3 Απομόνωση Γενετικού Υλικού

Για την απομόνωση του DNA της *Ps. aeruginosa* από τα χλωριωμένα δείγματα νερού εφαρμόστηκαν τρία διαφορετικά πρωτόκολλα τα οποία και περιγράφονται στην συνέχεια.

2.6.3.1 Απομόνωση Γενετικού Υλικού με proteinase K (Da Silva Filho Luiz, 2001, Wilson T. *et al*, 2001)

Το πρωτόκολλο αυτό περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Ανακαλλιέργεια του στελέχους από τα φιαλίδια protect σε γενικό θρεπτικό υλικό, Nutrient broth και επώαση στους 37°C για 24h.
2. Μεταφορά 1.0 ml σε eppendorf
3. Φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 5 min
4. Απόρριψη του υπερκειμένου
5. Επαναδιάλυση του ιζήματος με 100λ Lysis Buffer και προσθήκη 1λ proteinase K
6. Επώαση στους 37 °C για 2 h ή στους 56 °C για 1 h
7. Βράσιμο για 10 min
8. Φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 5 min
9. Μεταφορά υπερκειμένου (περιέχει το DNA) σε καθαρό eppendorf
10. Φύλαξη του υπερκειμένου, που περιέχει το γενετικό υλικό στους -20 °C προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για RAPD PCR

2.6.3.2 Απομόνωση Γενετικού Υλικού με έτοιμο σετ απομόνωσης (Kit QIAGEN)

Τα στάδια εργασίας που απαιτούνται από το συγκεκριμένο έτοιμο extraction kit είναι τα ακόλουθα:

1. Ανακαλλιέργεια του στελέχους από τα φιαλίδια protect σε γενικό στερεό θρεπτικό υλικό, Nutrient agar και επώαση στους 37°C για 24h.
2. Μεταφορά μερικών αποικιών σε eppendorf που περιέχει 200μl water for injection και φυγοκέντρηση στις 5.000 rpm για 5 min
3. Προσθήκη 200μl AL Buffer και 15μl protease (περιέχονται στο kit)
4. Επώαση στους 56 °C για 15 min ή στους 70 °C για 30 min
5. Προσθήκη 200μl ethanol
6. Χρήση της στήλης που περιέχεται στο kit και φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 2 min
7. Μεταφορά του φίλτρου στους ειδικούς σωλήνες συλλογής και προσθήκη 500μl AW1 Buffer
8. Φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 2 min
9. Μεταφορά του φίλτρου επίσης και προσθήκη 500μl AW2 Buffer
10. Φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 6 min

11. Τοποθέτηση της στήλης σε erppendorf, προσθήκη 100μl AE Buffer και μετά από 1 min φυγοκέντρωση για 2 min
12. Φύλαξη του erppendorf, που περιέχει το γενετικό υλικό και απόρριψη του φίλτρου.

2.6.3.3 Απομόνωση Γενετικού Υλικού με lysozyme (Rademaker L. W. Jan *et al*, 2000)

Τέλος, εφαρμόστηκε ένα πρωτόκολλο απομόνωσης γενετικού υλικού, στο οποίο χρησιμοποιείται λυσοζύμη κατά το στάδιο της λύσης των κυττάρων, με στόχο την απομόνωση γενετικού υλικού υψηλής καθαρότητας και σε περισσότερη ποσότητα. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- 1.Ανακαλλιέργεια του στελέχους από τα φιαλίδια protect σε Nutrient broth και επώαση στους 37°C για 18h (αυστηρή τήρηση της ώρας)
- 2.Καλή ανακίνηση σε vortex και μεταφορά 1,5 ml από το ζωμό σε erppendorf
- 3.Φυγοκέντρωση για 2 min στις 10.000 στροφές. Απόρριψη του υπερκειμένου.
- 4.Ακολουθεί λύση των κυττάρων με προσθήκη 500λ από το Lysis buffer
- 5.Επώαση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2h
- 6.Προσθήκη 125λ SDS 10%
- 7.Επώαση σε υδατόλουτρο στους 65°C για 20 min
- 8.Προσθήκη 216λ οξικού καλίου (CH₃COOK) 5M και καλή ανάδευση
- 9.Τοποθέτηση του erppendorf σε πάγο για 30 min (διακρίνεται άσπρο ίζημα)
- 10.Φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 15 min και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο erppendorf
- 11.Φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 10 min και μεταφορά υπερκειμένου σε νέο erppendorf
- 12.Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης και καλή ανάδευση
- 13.Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min
- 14.Φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 20 min και απόρριψη του υπερκειμένου
- 15.Πλύσιμο του ιζήματος με 500λ αιθανόλης 70%
- 16.Φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 10 min και απόρριψη του υπερκειμένου
- 17.Πλύσιμο του ιζήματος με 500λ αιθανόλης 70%
- 18.Φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 10 min και απόρριψη του υπερκειμένου
- 19.Στέγνωμα στους 45°C για 2h
- 20.Προσθήκη 80λ νερό υψηλής καθαρότητας (water for injection)
- 21.Φύλαξη στους -20°C

Για την απομόνωση του γενετικού υλικού επιλέχθηκε η τρίτη μέθοδος , διότι έδινε περισσότερο και πιο καθαρό DNA.

2.6.4 Υλικά και συνθήκες της RAPD ανάλυσης

Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν 2 τυχαίοι εκκινητές:

- Primer 208 (Invitrogen)

Sequence (5' to 3') ACG GCC GAC C

Molecular Weight (μg/μmole) : 2999.0

- Primer 272 (Invitrogen)

Sequence (5' to 3') AGC GGG CCA A

Molecular Weight (μg/μmole) : 3063.0

Οι primers που επιλέχτηκαν ανήκουν στους 10μερείς εκκινητές τυχαίας αλληλουχίας που έχουν ελεγχθεί για την ικανότητα τους να διακρίνουν πολυμορφισμό στο DNA της *Ps. aeruginosa* και μάλιστα είναι δύο από τους 8 που έχει βρεθεί ότι παράγουν επαναλήψιμα αποτυπώματα DNA (Mahenthiralingam E. *et al*, 1996).

Ο αριθμός και το μέγεθος των DNA αποτυπωμάτων που παράγονται με την RAPD ανάλυση εξαρτώνται από τον εκκινητή που χρησιμοποιείται. Για παράδειγμα μπορούμε να αναφέρουμε την συγκριτική μελέτη των Renders *et al* κατά την οποία διαπιστώθηκε ότι όταν χρησιμοποιείται ο εκκινητής ERIC2 για την τυποποίηση της *Pseudomonas aeruginosa* παράγονται με την Taq πολυμεράση 8 έως 15 ζώνες DNA που ποικίλουν από 100 έως 2,500 bp, όταν χρησιμοποιείται ο εκκινητής RAPD1 σχηματίζονται περίπου 17 ζώνες, ενώ όταν χρησιμοποιείται ο εκκινητής 325 μπορούμε να δούμε μετά την ηλεκτροφόρηση 16 έως 19 ζώνες DNA. Αυτό εξηγείται διότι οι ζώνες που παράγονται εξαρτώνται από τον αριθμό και την συχνότητα των θέσεων σύνδεσης του εκκινητή στο DNA (Nicole Renders *et al.*, 1996).

Τα υλικά της ανάλυσης είναι:

- Buffer: 10 x (New England Biolabs)
- MgCl₂ (Amersham Life Science): 25 mM
- dNTPs (New England Biolabs): Mixture of 4 dNTP's, 10mM of each
- primer 208 ή 272 (ANTISEL): 10 pmol/ml
- Taq polymerase(New England Biolabs): 5u/ml

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στις εξής συνθήκες:

4 ΚΥΚΛΟΙ: ο κάθε κύκλος

5 min στους 94°C

5 min στους 36°C

5 min στους 72°C

30 ΚΥΚΛΟΙ: ο κάθε κύκλος

30 sec στους 94°C

1 min στους 36°C

2 min στους 72°C

10 min στους 72°C για την τελική επιμήκυνση

(Mahenthiralingam E. *et al*, 1996)

2.6.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα μόρια DNA που αποτελούν προϊόντα της RAPD PCR μπορούν να διαχωριστούν με βάση, το μέγεθος τους μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Με την σύγκριση του μεγέθους τους μπορεί να εκτιμηθεί η διαφορά στο μήκος τμημάτων DNA που ανήκουν σε διαφορετικά βακτηριακά στελέχη, υπό την έννοια της διαφοράς σε απόλυτο αριθμό των ηλεκτροφορητικών ζωνών (A. van Belkum *et al*, 2007).

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης πυκνότητας 2%, το οποίο βάφτηκε με Βρωμιούχο Αιθίδιο, μια φθορίζουσα χρωστική, με την οποία μπορεί κανείς να δει το διαχωρισμό του DNA επάνω στο πήκτωμα μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης. Παρόλο που το Βρωμιούχο Αιθίδιο μειώνει σημαντικά την ηλεκτροφορητική ικανότητα του DNA, είναι απαραίτητο καθώς παρεμβάλλεται ανάμεσα στις συσσωρευμένες βάσεις και επεκτείνει το μήκος τους έτσι ώστε να γίνει καλύτερα ο διαχωρισμός τους.

Η ηλεκτροφορητική ικανότητα του DNA εξαρτάται επίσης από τη σύσταση και την ιοντική δύναμη του buffer που χρησιμοποιείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή. Το Tris- borate electrophoresis buffer 0,5x (TBE) προτείνεται ως το καλύτερο καθώς σε χαμηλότερη συγκέντρωση το DNA “τρέχει” πολύ αργά ή και καθόλου, ενώ στην αντίθετη περίπτωση η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι πολύ υψηλή, το πήκτωμα υπερθερμαίνεται και το DNA αποδιατάσσεται. Η τάση στην οποία θα “τρέξει” το πήκτωμα στην ηλεκτροφορητική συσκευή είναι μια ακόμη παράμετρος που πρέπει να ληφθεί υπόψιν. Η ικανότητα διαχωρισμού του DNA μειώνεται όσο η τάση αυξάνεται, έτσι στις τυποποιητικές μεθόδους όπου απαιτείται αυξημένη ικανότητα διαχωρισμού χρησιμοποιείται χαμηλή τάση στη συσκευή, περίπου στα 75V.

Τέλος, τα PCR προϊόντα πριν “φορτωθούν” στο πήκτωμα βάφονται με μια χρωστική που καλείται gel loading dye και αποσκοπεί στα εξής:

- ✓Αυξάνει τη πυκνότητα του δείγματος, βεβαιώνοντας ότι το DNA έπεσε μέσα στο πηγαδάκι του gel
- ✓“Προσθέτουν” χρώμα στο δείγμα, κάνοντας τη διαδικασία πιο απλή
- ✓Περιέχουν ουσίες, οι οποίες “τρέχουν” προς την ίδια κατεύθυνση με το DNA βοηθώντας τον διαχωρισμό του σε κλάσματα. (Sambrook *et al*, 1989).

Σημειώνεται ότι μερικές φορές παρατηρείται “smearing” που οφείλεται στο ότι γίνονται ορατά πολλαπλά τμήματα DNA, τα οποία διαφέρουν ελάχιστα στο μήκος τους (NICOLE RENDERS *et al*, 1996).

Καλό θα είναι ένα στέλεχος αναφοράς να συμμετέχει σε όλη την διαδικασία παράλληλα με τα στελέχη που εξετάζονται. Με αυτό τον τρόπο και καθώς λαμβάνουμε τα αναμενόμενα αποτελέσματα με τον οργανισμό control επιβεβαιώνουμε ότι όλη η διαδικασία με όλα τα στάδια που αυτή περιλαμβάνει, λειτουργεί σωστά, ότι το gel και οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης είναι οι κατάλληλες καθώς επίσης ότι οι συνθήκες της όλης διαδικασίας είναι τέτοιες ώστε τα αποτελέσματα που λαμβάνονται είναι επαναλήψιμα και ότι συμφωνούν με αυτά που λαμβάνονται από άλλους ερευνητές για το ίδιο

στέλεχος. Στην προκειμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος αναφοράς το *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662 από το Health Protection Agency (HPA).

Τέλος, είναι χρήσιμο να “τρέχουν” στο πήκτωμα αγαρόζης και κυρίως στην εξωτερική μεριά DNA δείκτες γνωστού μοριακού μεγέθους (ladder) προκειμένου να παρέχεται κάποια κατεύθυνση ως προς το μέγεθος των τμημάτων DNA. Οι ladder είναι χρήσιμοι προκειμένου να εκτιμηθούν μικρές διαφορές οι οποίες μπορεί να προκύπτουν από ένα γενετικό φαινόμενο, όπως είναι διαγραφή, εισαγωγή ή μεταλλαγή (Fred C. Tenover *et al*, 1995) .

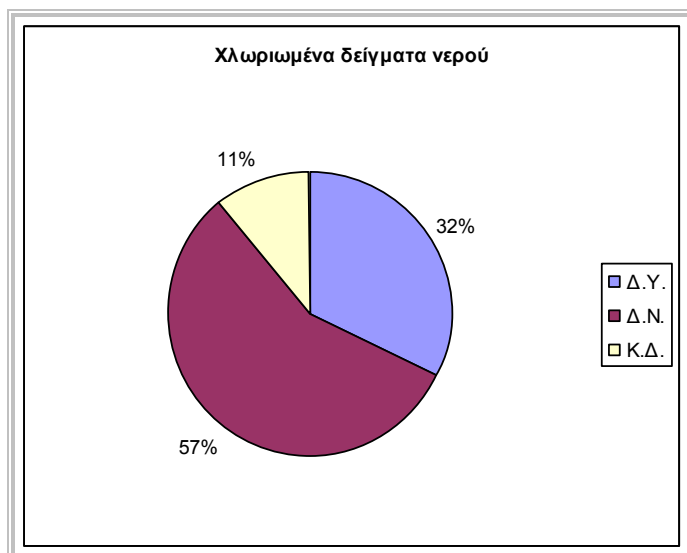
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Ταυτοποίηση αποικιών *Pseudomonas aeruginosa*

Για τους σκοπούς της εργασίας 671 χλωριωμένα δείγματα νερού διηθήθηκαν και εξετάστηκαν ως προς την παρουσία *Pseudomonas aeruginosa*.

Από την άποψη της δημόσιας υγείας η διαπίστωση της απουσίας *Ps. aeruginosa* στο νερό είναι ιδιαίτερα σημαντική, διότι εκτός του ότι η *Ps. aeruginosa* εμπλέκεται σε τροφιμογενή και υδατογενή νοσήματα, πολύ περισσότερο εμφανίζει εγγενή αντοχή σε πλήθος αντιμικροβιακών παραγόντων με αποτέλεσμα να υπάρχει ο κίνδυνος μετάδοσης της αντοχής αυτής σε άλλα παθογόνα βακτήρια που βρίσκονται στον άνθρωπο (Ε. Sazakli *et al*, 2005).

Από τα δείγματα αυτά, 216 προέρχονταν από το δίκτυο ύδρευσης κατοικιών, καταστημάτων κ.λ.π, 382 δείγματα προέρχονταν από το δίκτυο ύδρευσης νοσοκομείων και 73 δείγματα προέρχονταν από κολυμβητικές δεξαμενές.



Εικόνα 3.1.1 Ποσοστιαία απεικόνιση των 3 ειδών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση *Pseudomonas aeruginosa*

Από τα 216 δείγματα που προέρχονταν από το δίκτυο ύδρευσης

- 25 δείγματα περιείχαν αποικίες μπλε/ πράσινου χρώματος που θεωρούνται ως επιβεβαιωμένες αποικίες *Ps. aeruginosa*
- 25 δείγματα περιείχαν αποικίες που φθόριζαν ή ήταν καστανέρυθρες και απαιτούν επιβεβαίωση (ISO 16266:2006)
- 10 δείγματα περιείχαν και τυπικές μπλε/πράσινες αποικίες και αποικίες που φθόριζαν ή ήταν καστανέρυθρες

Από τις 35 αποικίες που απαιτούσαν επιβεβαίωση, επιβεβαιώθηκαν τελικά οι 4 (ποσοστό 11,4%) και έτσι είχαμε συνολικά μαζί με τις μπλε/πράσινες αποικίες 39 απομονώσεις *Ps. aeruginosa*.

Από τα 382 δείγματα που προέρχονταν από το δίκτυο ύδρευσης νοσοκομείων 25 δείγματα περιείχαν αποικίες μπλε/ πράσινου χρώματος που θεωρούνται ως επιβεβαιωμένες αποικίες *Ps. aeruginosa* και συνολικά είχαμε 26 απομονώσεις *Ps. aeruginosa* (από ένα δείγμα κρατήσαμε ως στέλεχος και μια δεύτερη αποικία).

Τέλος, από τα 73 δείγματα που προέρχονταν από κολυμβητικές δεξαμενές

- 14 δείγματα περιείχαν αποικίες μπλε/ πράσινου χρώματος που θεωρούνται ως επιβεβαιωμένες αποικίες *Ps. aeruginosa*
- 17 δείγματα περιείχαν αποικίες που φθόριζαν ή ήταν καστανέρυθρες και απαιτούν επιβεβαίωση (ISO 16266:2006)
- 2 δείγματα περιείχαν και τυπικές μπλε/πράσινες αποικίες και αποικίες που απαιτούν επιβεβαίωση

Από τις 19 αποικίες που απαιτούσαν επιβεβαίωση, επιβεβαιώθηκαν τελικά οι 2 (ποσοστό 10,5%) και έτσι είχαμε συνολικά μαζί με τις μπλε/πράσινες αποικίες 18 απομονώσεις *Ps. aeruginosa*.

Στον πίνακα που ακολουθεί Πίνακας 3.1.2 φαίνονται τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης του μικροοργανισμού με βάση το ISO 16266:2006 “Water quality-

Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*- Method by membrane filtration”, τα στάδια του οποίου συνοπτικά αναφέρθηκαν στον Πίνακα 2.2

Πίνακας 3.1.2 Απομονώσεις από τα δείγματα νερού και οι επιβεβαιωτικές τους δοκιμασίες όπου απαιτούνται

Αριθμός στελέχους	Αριθμός δείγματος	Είδος	Αριθμός αποικιών μπλε/πράσινου χρώματος- επιβεβαιωμένες αποικίες <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Αριθμός αποικιών που φθορίζουν χωρίς να παράγουν πυοκυανίνη- πιθανές αποικίες <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Αριθμός καστανέρυθρων αποικιών που δεν φθορίζουν - πιθανές αποικίες <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΠΙΘΑΝΕΣ ΑΠΟΙΚΙΕΣ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΘΗΚΑΝ ΩΣ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
						NA (OX)	Acetamide broth	King's broth	
	1922	Δ.Υ	0	25 ^b	0		–		ΌΧΙ
100B	1923	Δ.Υ	>100 ^a	0	0				
102B	1988	Δ.Υ	>100	0	0				
	1989	Δ.Υ	0	>100	0		–		ΌΧΙ
103B	1990	Δ.Υ	16	10	0		–		ΌΧΙ
104B	1991	Δ.Υ	2	25	0		–		ΌΧΙ
105B	2013	Κ.Δ	>100	0	0				
106B	2014	Κ.Δ	32	0	0				
114B	2015	Κ.Δ	43	0	0				
107B	2016	Κ.Δ	>100	0	0				
	2017	Κ.Δ	0	>100	0		–		ΌΧΙ

	2018	K.Δ	0	>100	0		–		OXI
	2048	Δ.Y	0	2	0		–		OXI
4	2059	Δ.Y	1	0	0				
	2060	Δ.Y	0	0	43	+	–	–	OXI
6	2066	K.Δ	1	3	0		–		OXI
	2067	K.Δ	0	0	2	+	–	–	OXI
13	2069 ^α	Δ.Y	>100	0					
14	2069 ^β	Δ.Y			2	+	+	+	NAI
15	2070	Δ.Y	25	11	0		–		OXI
17	2072 ^α	Δ.Y	3		0				
18	2072 ^β	Δ.Y		10			+		NAI
	2086	K.Δ	0	9	0		–		OXI
	2087	K.Δ	0	>100	0		–		OXI
118B	32	ΔN	7	0	0				
	183	Δ.Y	0	0	>100	+	–	–	OXI
	184	Δ.Y	0	0	12	+	–	–	OXI
34	196	Δ.Y	5	0	7	+	–	–	OXI
36	208	Δ.Y	>100	0	0				
	212	Δ.Y	0	36	0		–		OXI
37	258	Δ.Y	2	0	0				
38	266	Δ.Y	1	7	0		–		OXI
39	268	Δ.Y	1	0	0				
148B	293	ΔN	4	0	0				
149B	294	ΔN	2	0	0				
52	359	Δ.Y	1	0	0				
	360	Δ.Y	0	1	0		–		OXI
57	398	Δ.Y	>100	0	0				

61	406	$\Delta.Y$	2	3	0		-		OXI
	409	$\Delta.Y$	0	1	0		-		OXI
165B	446	$\Delta.N$	2	0	0				
164B	448	$\Delta.N$	82	0	0				
73	487 ^a	$\Delta.Y$	2		0				
74	487 ^b	$\Delta.Y$		25			+		NAI
170B	551	$\Delta.Y$	4	0	0				
77	577	$\Delta.Y$	2	0	0				
78	580	$K.\Delta$	1	0	0				
173B	612	$\Delta.N$	>100	0	0				
79	679	$\Delta.Y$	12	0	0				
	681	$\Delta.Y$	0	0	62	+	-	-	OXI
	682	$\Delta.Y$	0	0	4	+	-	-	OXI
	683	$\Delta.Y$	0	0	12	+	-	-	OXI
80	684	$\Delta.Y$	11	0	0				
	685	$\Delta.Y$	0	0	9	+	-	-	OXI
	686	$\Delta.Y$	0	0	34	+	-	-	OXI
81	687	$\Delta.Y$	>100	0	0				
	691	$\Delta.Y$	0	0	68	+	-	-	OXI
	692	$\Delta.Y$	0	0	5	+	-	-	OXI
97	693	$\Delta.Y$	0	1			+		NAI
					8	+	-	-	OXI
	695	$\Delta.Y$	0	0	6	+	-	-	OXI
82	719	$K.\Delta$	2	0	0				
83	720	$K.\Delta$	28	0	0				
89	755	$K.\Delta$	2	0	0				
	756	$K.\Delta$	0	0	42	+	-	-	OXI

90	759	K.Δ	2	0	0				
91	760	K.Δ	>100	0	0				
	766	Δ.Y	0	0	17	+	–	–	OXI
	767	Δ.Y	0	0	3	+	–	–	OXI
94	768	Δ.Y	34	0	0				
95	770	Δ.Y	>100	0	0				
98	794	Δ.Y	1	21	0		–		OXI
99	795	Δ.Y	5	0	0				
100	796	Δ.Y	1	0	0				
101	803	Δ.Y	2	0	0				
	805	K.Δ	0	0	28	+	–	–	OXI
	806	K.Δ	0	3	0		–		OXI
	807	K.Δ	0	0	1	+	–	–	OXI
102	808	K.Δ	1	0	0				
103	849	Δ.Y	8	0	0				
104	850	Δ.Y	>100	0	0				
179B	861	ΔN	2	0	0				
184B	931	ΔN	1	0	0				
204B	944	ΔN	>100	0	0				
186B	993	ΔN	60	0	0				
187B	999	ΔN	100	0	0				
188B	1008	ΔN	1	0	0				
105	1066	Δ.Y	78	0	0				
191B	1075	ΔN	>100	0	0				
192B	1078	ΔN	65	0	0				
193B	1081	ΔN	2	0	0				
194B	1115	ΔN	12	0	0				

108	1181	$\Delta.Y$	3	0	0				
	1182	$\Delta.Y$	0	0	1	+	-	-	OXI
109	1183	$\Delta.Y$	>100	0	0				
	1217	$\Delta.Y$	0	1			-		OXI
					10	+	-	-	OXI
	1308	$K.\Delta$	0	0	1	+	-	-	OXI
117	1318	$\Delta.Y$	1	0	0				
	1479	$K.\Delta$	0	0	1	+	-	-	OXI
	1482	$K.\Delta$	0	0	1	+	-	-	OXI
210B	1495	$\Delta.N$	82	0	0				
	1513	$K.\Delta$	0	1	0		-		OXI
120	1514	$K.\Delta$	10	0	0				
121	1516	$K.\Delta$	4	6	0		-		OXI
213B	1531	$\Delta.N$	36	0	0				
214B	1532	$\Delta.N$	8	0	0				
224B	1681	$\Delta.N$	5	0	0				
229B	8	$\Delta.N$	>100	0	0				
230B	14	$\Delta.N$	1	0	0				
231B	27	$\Delta.N$	9	0	0				
122	130	$\Delta.Y$	>100	0	0				
	138	$\Delta.Y$	0	0	>100	+	-	-	OXI
	139	$\Delta.Y$	0	0	>100	+	-	-	OXI
125	1	$K.\Delta$	0	0	16	+	+	+	NAI
126	2	$K.\Delta$	0	0	80	+	+	+	NAI
	3	$K.\Delta$	0	0	2	+	-	-	OXI
	4	$K.\Delta$	0	0	3	+	-	-	OXI
123	5	$K.\Delta$	80	0	0				

124	6	K.Δ	31	0	0				
241B	177	ΔN	56	0	0				
	273	Δ.Y	0	1			–		ΌΧΙ
					1	+	–	–	ΌΧΙ
253B	293 ^a	ΔN	2	0	0				
254B	293 ^b	ΔN							

a: πράσινο χρώμα, επιβεβαιωμένες αποικίες *Ps. aeruginosa*, δηλαδή αποικίες που παράγουν πυοκυανίνη (μπλε/πράσινο χρώμα)

b: κίτρινο χρώμα, αποικίες που χρειάζονται επιβεβαίωση

Ως στέλεχος αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662 από το Health Protection Agency (HPA). Τόσο το στέλεχος αναφοράς όσο και οι απομονώσεις *Ps. aeruginosa* από τα δείγματα κρατήθηκαν στα ειδικά φιαλίδια Protect, με αριθμούς οι οποίοι φαίνονται στην πρώτη στήλη του παραπάνω πίνακα.

Παρατηρείται ότι η συγκέντρωση της *Ps. aeruginosa* στα θετικά δείγματα νερού ποικίλλει από 1 έως >100 cfu/100ml. Το ποσοστό των δειγμάτων που περιέχουν περισσότερες από 100 αποικίες είναι 23% (18/79).

3.2 Οροτυποποίηση στελεχών *Pseudomonas aeruginosa*

Τα 83 στελέχη *Ps. aeruginosa* ανακαλλιεργήθηκαν σε Nutrient agar και τυποποιήθηκαν με τη χρήση των αντιορών. Τα αποτελέσματα της οροτυποποίησης φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 3.2.1 Αποτελέσματα οροτυποποίησης

			ΟΡΟΤΥΠΟΙ		
Αριθμός στελεχών	Αριθμός δείγματος	Είδος	POLYVALENT	MONOVALENT	ROUGH / NT ^a
100B	1923	Δ.Υ	A	-	
102B	1988	Δ.Υ	A	1	
103B	1990	Δ.Υ	-	-	ROUGH
104B	1991	Δ.Υ	-	-	NT
105B	2013	Κ.Δ	A	1	
106B	2014	Κ.Δ	F	11	
114B	2015	Κ.Δ	-	-	NT
107B	2016	Κ.Δ	-	-	ROUGH
4	2059	Δ.Υ	-	-	ROUGH
6	2066	Κ.Δ	-	-	NT
13	2069 ^a	Δ.Υ	-	-	NT
14	2069 ^b	Δ.Υ	A	1	
15	2070	Δ.Υ	-	-	NT
17	2072 ^a	Δ.Υ	-	-	NT
18	2072 ^b	Δ.Υ	-	-	NT
118B	32	ΔΝ	-	-	NT
34	196	Δ.Υ	A	1	
36	208	Δ.Υ	A	1	
37	258	Δ.Υ	E	-	
38	266	Δ.Υ	F	-	
39	268	Δ.Υ	A	1	

			ΟΡΟΤΥΠΟΙ		
Αριθμός στελέχους	Αριθμός δείγματος	Είδος	POLYVALENT	MONOVALENT	ROUGH / NT
148B	293	ΔN	A	-	
149B	294	ΔN	A	-	
52	359	Δ.Y	C	10	
57	398	Δ.Y	E	-	
61	406	Δ.Y	A	-	
165B	446	ΔN	-	-	ROUGH
164B	448	ΔN	F	11	
73	487 ^a	Δ.Y	C	-	
74	487 ^b	Δ.Y	-	-	NT
170B	551	Δ.Y	A	6	
77	577	Δ.Y	-	-	NT
78	580	K.Δ	-	-	NT
173B	612	ΔN	C	10	
79	679	Δ.Y	A	-	
80	684	Δ.Y	-	-	NT
81	687	Δ.Y	-	-	NT
97	693	Δ.Y	-	-	NT
82	719	K.Δ	E	-	
83	720	K.Δ	E	-	
89	755	K.Δ	-	-	NT
90	759	K.Δ	-	-	NT

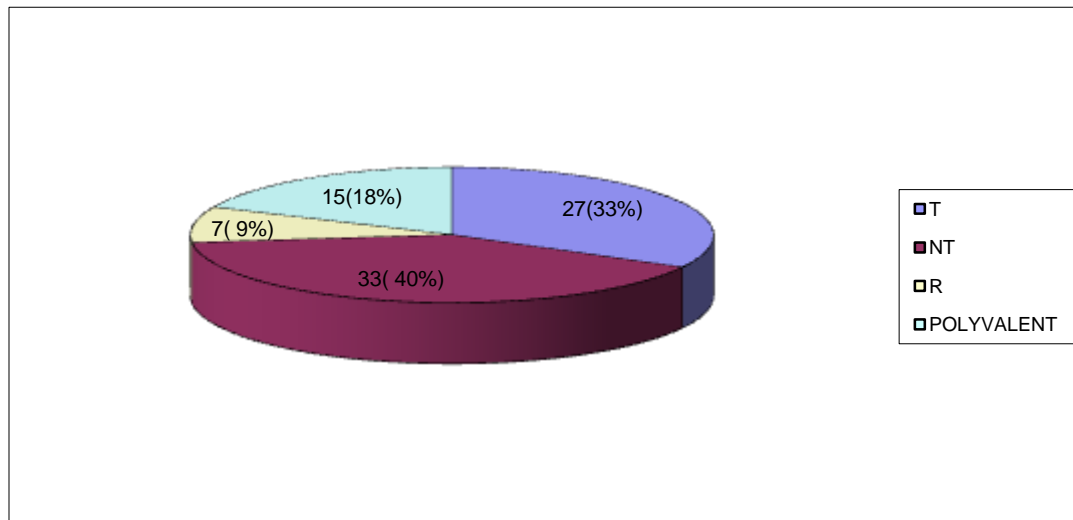
			ΟΡΟΤΥΠΟΙ		
Αριθμός στελέχους	Αριθμός δείγματος	Είδος	POLYVALENT	MONOVALENT	ROUGH / NT
91	760	K.Δ	-	-	NT
94	768	Δ.Y	-	-	NT
95	770	Δ.Y	-	-	NT
98	794	Δ.Y	-	-	NT
99	795	Δ.Y	C	9	
100	796	Δ.Y	C	10	
101	803	Δ.Y	-	-	NT
102	808	K.Δ	-	-	NT
103	849	Δ.Y	A	1	
104	850	Δ.Y	C	10	
179B	861	ΔN	A	-	
184B	931	ΔN	C	10	
204B	944	ΔN	C	9	
186B	993	ΔN	F	-	
187B	999	ΔN	A	1	
188B	1008	ΔN	-	-	NT
105	1066	Δ.Y	-	-	NT
191B	1075	ΔN	A	-	
192B	1078	ΔN	E	5	
193B	1081	ΔN	-	-	ROUGH
194B	1115	ΔN	-	-	NT

			ΟΡΟΤΥΠΟΙ		
Αριθμός στελέχους	Αριθμός δείγματος	Είδος	POLYVALENT	MONOVALENT	ROUGH / NT
108	1181	Δ.Y	-	-	NT
109	1183	Δ.Y	A	1	
117	1318	Δ.Y	-	-	NT
210B	1495	ΔN	-	-	ROUGH
120	1514	K.Δ	F	11	
121	1516	K.Δ	F	11	
213B	1531	ΔN	F	12	
214B	1532	ΔN	-	-	NT
224B	1681	ΔN	-	-	NT
229B	8	ΔN	-	-	NT
230B	14	ΔN	F	12	
231B	27	ΔN	-	-	NT
122	130	Δ.Y	-	-	NT
125	1	K.Δ	-	-	ROUGH
126	2	K.Δ	-	-	NT
123	5	K.Δ	F	11	
124	6	K.Δ	F	11	
241B	177	ΔN	-	-	NT
253B	293 ^a	ΔN	A	6	
254B	293 ^b	ΔN	A	-	

^a: Not typeable

Από τα 83 στελέχη *Ps. aeruginosa*

- 27 στελέχη τυποποιήθηκαν με τους αντιορούς (ποσοστό 33%)
- 34 στελέχη δεν έδωσαν αντίδραση συγκόλλησης (ποσοστό 40%)
- 7 στελέχη έδωσαν εικόνα αυτοσυγκόλλησης (rough) (ποσοστό 9%) και
- 15 στελέχη (ποσοστό 18%) έδωσαν αντίδραση συγκόλλησης με έναν από τους πολυδύναμους αντιορούς αλλά με κανέναν από τους αντίστοιχους μονοδύναμους.



Εικόνα 3.2.1 Ποσοστό στελεχών που τυποποιήθηκαν με την οροτυποποίηση (T), στελεχών που δεν τυποποιήθηκαν (NT), Rough στελεχών (R) και στελεχών που τυποποιήθηκαν μόνο με τους πολυδύναμους ορούς (POLYVALENT)

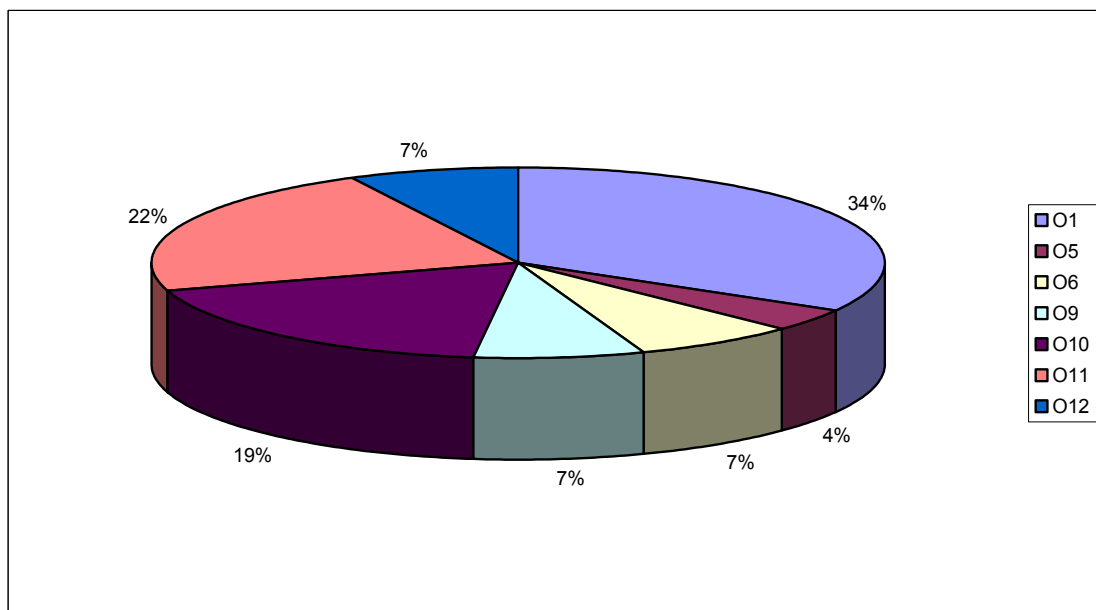
Τα στελέχη που τυποποιήθηκαν με οροσυγκόλληση, όπως φαίνεται και στον πίνακα 3.2.2 ταξινομούνται σε 7 ορότυπους. Ο ορότυπος που επικρατεί είναι ο O:1, ο οποίος αντιπροσωπεύει το 33,4% των στελεχών που τυποποιήθηκαν, ακολουθεί ο O:11 με ποσοστό 22,2% και τέλος ο O:10 με ποσοστό 19%.

Οι ορότυποι O:1 και O:11 φαίνεται να είναι οι ορότυποι που επικρατούν στα περιβαλλοντικά δείγματα (R. Vogt *et al*, 1982, De Vicente *et al*, 1990, G. B. Orsi *et al*, 1994, Jean-Paul Pirnay *et al*, 2003).

Στον O:1 περιλαμβάνονται κυρίως στελέχη του δικτύου ύδρευσης (7/9), ενώ ο O:11 περιέχει κυρίως στελέχη που απομονώθηκαν από κολυμβητικές δεξαμενές (5/6). Φαίνεται να υπάρχει μια συσχέτιση με τα επιδημιολογικά δεδομένα, καθώς τα στελέχη που έχουν απομονωθεί από το ίδιο είδος δείγματος, ομαδοποιούνται στον ίδιο ορότυπο. Αξιοσημείωτο είναι ότι σχεδόν όλα τα στελέχη των κολυμβητικών δεξαμενών που τυποποιήθηκαν (εκτός από ένα) περιλαμβάνονται στον O:11. Οι άλλοι ορότυποι εμφανίζουν μια ποικιλία στην κατανομή τους (Πίνακας 3.3.2, Εικόνα 3.2.2).

Πίνακας 3.2.2 Κατανομή των στελεχών *Ps. aeruginosa* ανά ορότυπο

Ορότυποι	Κωδικός στελέχους	Είδος δείγματος	Νο στελεχών	Ποσοστό (%)
1	102B	Δ.Υ	9	34
	105B	Κ.Δ		
	14	Δ.Υ		
	34	Δ.Υ		
	36	Δ.Υ		
	39	Δ.Υ		
	103	Δ.Υ		
	187B	Δ.Ν		
	109	Δ.Υ		
5	192B	Δ.Ν	1	4
6	170B	Δ.Υ	2	7
	253B	Δ.Ν		
9	99	Δ.Υ	2	7
	204B	Δ.Ν		
10	52	Δ.Υ	5	19
	173B	Δ.Ν		
	100	Δ.Υ		
	104	Δ.Υ		
	184B	Δ.Ν		
11	106B	Κ.Δ	6	22
	164B	Δ.Ν		
	120	Κ.Δ		
	121	Κ.Δ		
	123	Κ.Δ		
	124	Κ.Δ		
12	213B	Δ.Ν	2	7
	230B	Δ.Ν		
ΣΥΝΟΛΟ			27	100



Εικόνα 3.2.2 Κατάταξη των στελεχών στους διάφορους ορότυπους

Αξιοσημείωτο είναι το ποσοστό των στελεχών που συγκολλούνται μόνο με τους πολυδύναμους ορούς και όχι με τους αντίστοιχους μονοδύναμους (36%). Η κατανομή τους φαίνεται στον Πίνακα 3.2.3. Οι Charles D. Brokopp *et al* αναφέρουν το ίδιο φαινόμενο σε στελέχη *Ps. aeruginosa* που τυποποίησαν με την χρήση αντιορών σε πολύ μικρότερο ποσοστό όμως (Charles D. Brokopp *et al*, 1977, N J Legakis *et al*, 1982)

Πίνακας 3.2.3 Κατανομή των 15 στελεχών *Ps. aeruginosa* που τυποποιούνται μόνο με τους πολυδύναμους ορούς

Πολυδύναμοι αντιοροί	Αριθμός στελέχους	Είδος δείγματος	Αριθμός στελεχών	Ποσοστό (%)
Polyvalent A	100B	Δ.Y	8	53
	148B	Δ.N		
	149B	Δ.N		
	61	Δ.Y		
	79	Δ.Y		
	179B	Δ.N		
	191B	Δ.N		
	254B	Δ.N		
Polyvalent C	73	Δ.Y	1	7
Polyvalent E	37	Δ.Y	4	27
	57	Δ.Y		
	82	K.Δ		
	83	K.Δ		
Polyvalent F	38	Δ.Y	2	13
	186B	Δ.N		

Από τον πίνακα 3.2.3 παρατηρούμε ότι τα περισσότερα από αυτά τα στελέχη συγκολλούνται με τον πολυδύναμο ορό A (ποσοστό 53%), ο οποίος περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τον O:1, που είναι και ο επικρατέστερος. Εδώ όμως η πλειοψηφία των στελεχών που συγκαταλέγονται προέρχονται κυρίως από το δίκτυο ύδρευσης νοσοκομείων (5/8).

Από τον πίνακα που ακολουθεί (3.2.4) διαπιστώνουμε ότι τα 3 από τα 7 Rough στελέχη προέρχονται από το δίκτυο ύδρευσης νοσοκομείων Αττικής, ενώ τα δύο στελέχη του υπολοίπου δικτύου ύδρευσης προέρχονται επίσης από ίδια γεωγραφική περιοχή.

Πίνακας 3.2.4 Συσχέτιση Rough στελεχών με το είδος του δείγματος και την γεωγραφική προέλευση

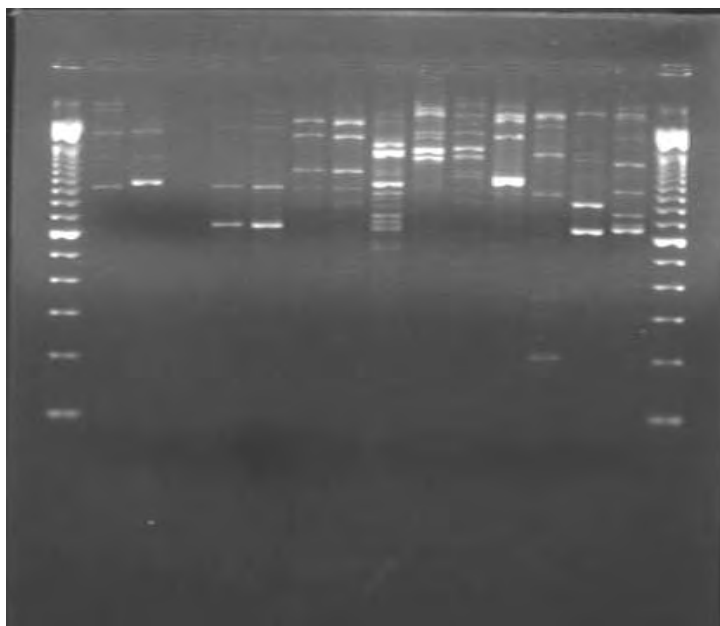
	Αριθμός στελέχους	Είδος δείγματος	Προέλευση
Rough στελέχη	103B	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ
	107B	Κ.Δ	Ν.Α ΘΕΣ/ΚΗΣ
	4	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ
	165B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ
	193B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ
	210B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ
	125	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ Α

Τα 33 στελέχη *Ps. aeruginosa* που χαρακτηρίστηκαν ως ατυποποίητα δεν φαίνεται να παρουσιάζουν κάποια ομοιομορφία, ως προς το είδος των δειγμάτων που περιλαμβάνουν και ως προς την γεωγραφική κατανομή.

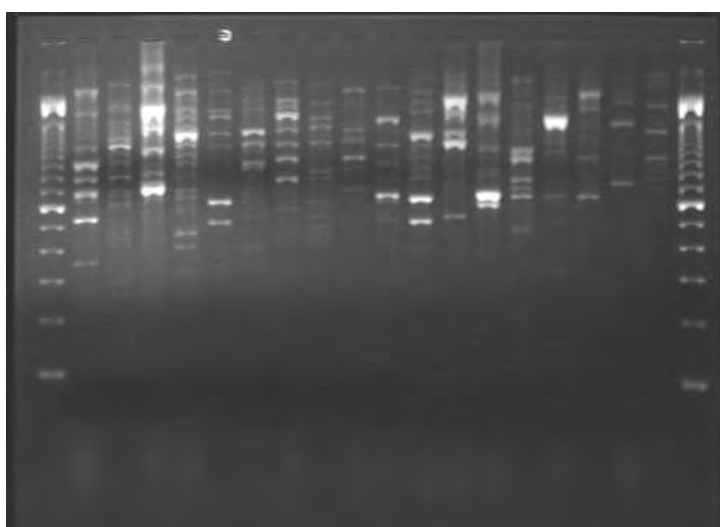
3.3 Μοριακή τυποποίηση των στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* με RAPD-PCR

Τα 83 στελέχη που ταυτοποιήθηκαν ως *Ps. aeruginosa*, αναλύθηκαν με την Μοριακή μέθοδο RAPD-PCR. Χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής 272, ο οποίος συγκριτικά με τον εκκινητή 208 έδινε περισσότερες ζώνες κατά την ηλεκτροφόρηση και εμφάνιζε μεγαλύτερη αναπαραγωγιμότητα.

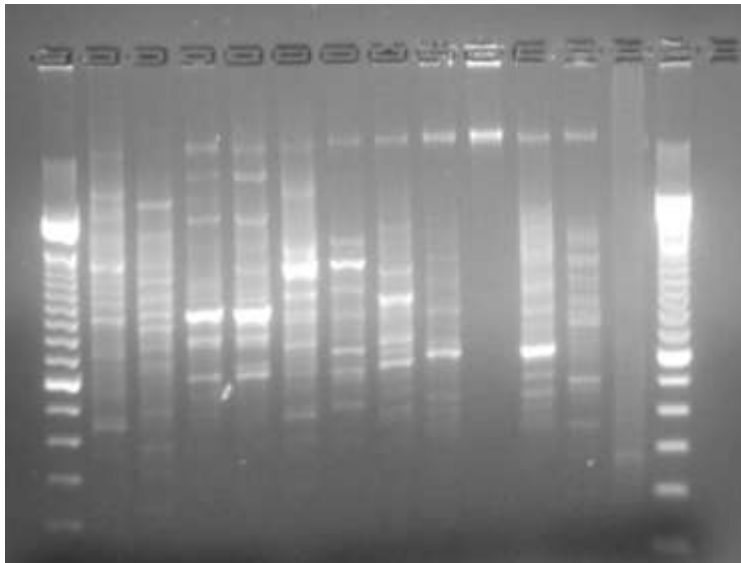
Οι ηλεκτροφορήσεις των προϊόντων της RAPD έγιναν σε πήκτωμα αгарόζης πυκνότητας 2%, σε ηλεκτροφορητική συσκευή χρησιμοποιώντας χαμηλή τάση, περίπου 75V (Εικόνες 3.3.1 έως 3.3.5).



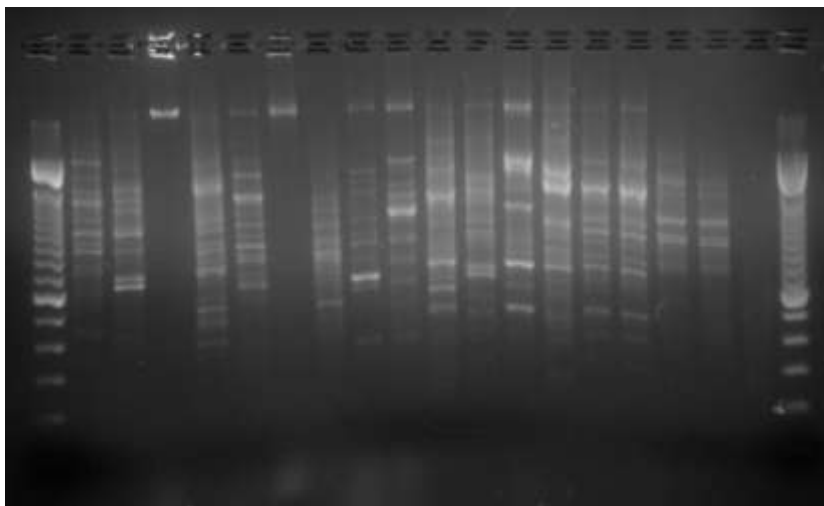
Εικόνα 3.3.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των στελεχών (από αριστερά): DNA ladder 100 bp, 104B, 105B, 230B, 184B, 194B, 17, 18, 102, 120, 37, 14, 36, 77, 79 και DNA ladder 100 bp



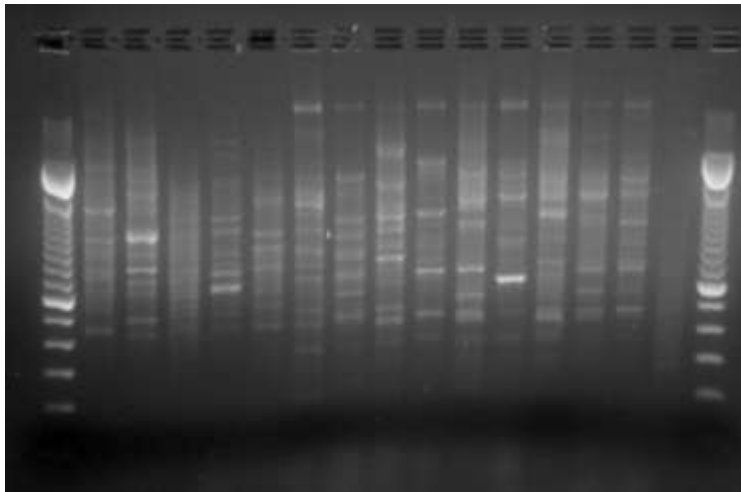
Εικόνα 3.3.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των στελεχών (από αριστερά): DNA ladder 100 bp, 109, 103B, 104, 15, 78, 39, 52, 57, 61, 102B, 107B, 106B, 114B, 170B, 91, 97, 213B, 80, DNA ladder 100 bp



Εικόνα 3.3.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των στελεχών (από αριστερά): DNA ladder 100 bp, Reference, 118B, 148B, 149B, 164B, 165B, 170B, 173B, 179B, 184B, 204B, H₂O, DNA ladder 100 bp



Εικόνα 3.3.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των στελεχών (από αριστερά): DNA ladder 100 bp, Reference, 186B, 187B, 188B, 191B, 192B, 193B, 194B, 210B, 213B, 214B, 224B, 122, 123, 124, 125, 126, H₂O, DNA ladder 100 bp

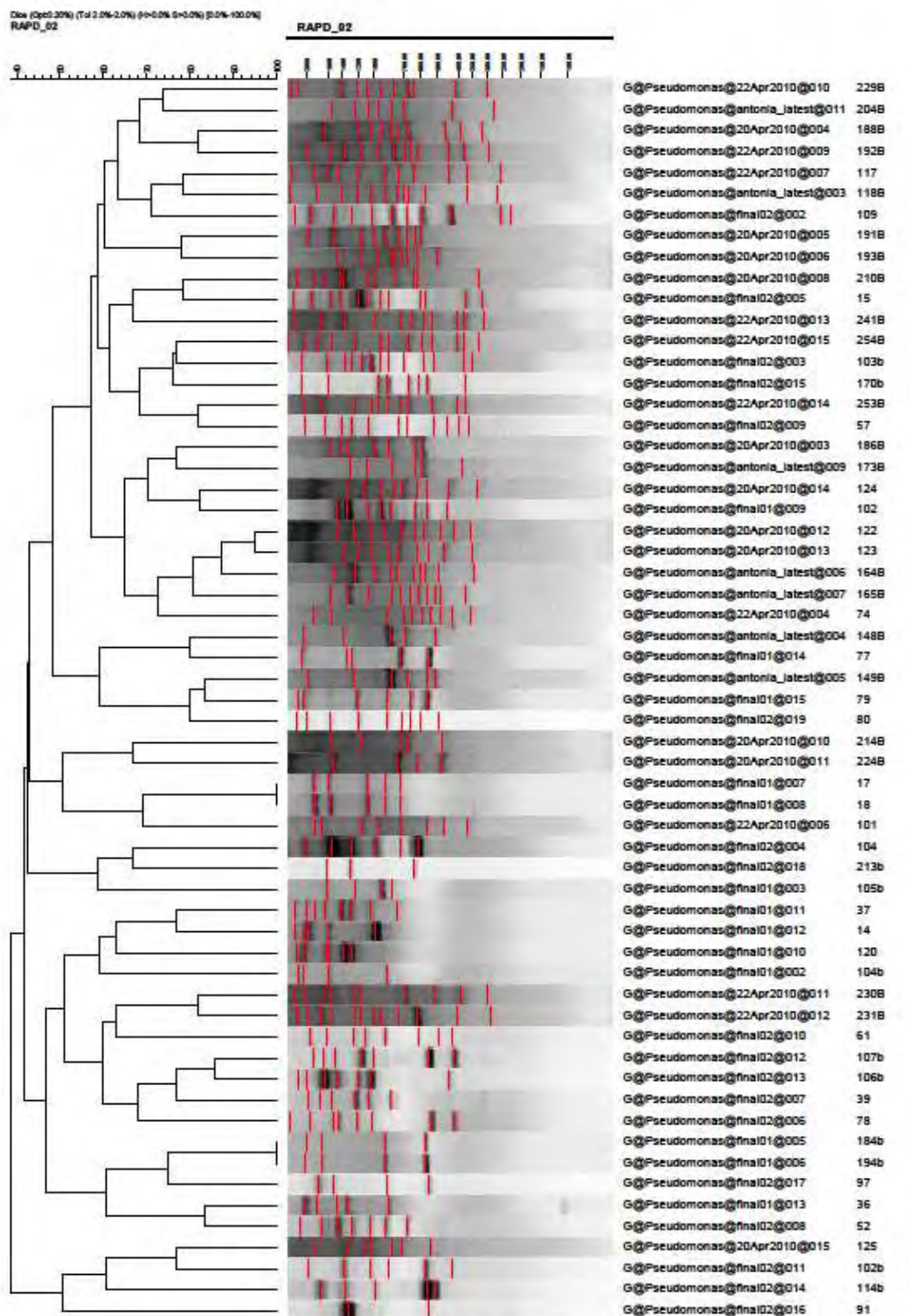


Εικόνα 3.3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των στελεχών (από αριστερά): DNA ladder 100 bp, Reference, 18, 74, 79, 101, 117, 187B, 192B, 229B, 230B, 231B, 241B, 253B, 254B, H₂O, DNA ladder 100 bp

Τα στελέχη αυτά τυποποιήθηκαν σε ποσοστό 71% και ομαδοποιήθηκαν σε RAPD τύπους (59/83), ενώ σε ποσοστό 29% δεν έδωσαν εικόνα κατά την ηλεκτροφόρηση τους (ατυποποίητα) (24/83).

Από τα 59 στελέχη που τυποποιήθηκαν τα 24 προέρχονταν από το δίκτυο ύδρευσης Νοσοκομείων, τα 22 από το υπόλοιπο δίκτυο ύδρευσης και τα 11 από Κολυμβητικές δεξαμενές. Από τα 24 στελέχη που δεν τυποποιήθηκαν τα 2 προέρχονταν από το δίκτυο ύδρευσης Νοσοκομείων, τα 17 από το υπόλοιπο δίκτυο ύδρευσης και τα 7 από Κολυμβητικές δεξαμενές.

Για την ομαδοποίηση των 59 στελεχών χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα Gel Compar Software, με το οποίο τα στελέχη μας ομαδοποιήθηκαν με βάση τις διαφορές στις ζώνες ηλεκτροφόρησης τους. Στελέχη που διαφέρουν έστω και κατά μια ζώνη ηλεκτροφόρησης, θεωρούνται διαφορετικά. Έτσι, με όριο ομοιότητας το 68 %, προέκυψαν 28 ομάδες. Το δενδρόγραμμα που προέκυψε φαίνεται στην Εικόνα 3.3.6



Εικόνα 3.3.6 Δενδρόγραμμα των 59 στελεχών *Ps. aeruginosa* που τυποποιήθηκαν με τη Μοριακή Τυποποιητική μέθοδο RAPD-PCR, το οποίο προέκυψε από την ανάλυση των ηλεκτροφορητικών εικόνων με το πρόγραμμα Gel Compar Software. Βάση της υπολογιστικής ανάλυσης τα 59 στελέχη ομαδοποιούνται σε 28 RAPD- τύπους. Τα ποσοστά ομοιότητας και τα Μοριακά Βάρη φαίνονται στο πάνω μέρος του δενδρογράμματος

Ενδιαφέρον έχει να δούμε αν τα στελέχη που ομαδοποιούνται στον ίδιο γονότυπο, συσχετίζονται με βάση τα επιδημιολογικά τους στοιχεία (είδος δείγματος, προέλευση κ.α) (Πίνακας 3.3.1)

Πίνακας 3.3.1 Κατανομή των στελεχών *Ps. aeruginosa* στους 28 RAPD- τύπους και συσχέτιση με βάση το είδος και την προέλευση τους

	ΣΤΕΛΕΧΗ	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ				ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ
		Είδος	Ημ/νια δειγμ/ψίας	Γεωγραφική περιοχή	Υπολ. χλώριο (mg/l)	
R1	229B	Δ.Ν	12/01/10	ΑΤΤΙΚΗΣ		Ο τύπος R1 περιέχει: 2 Νοσοκομεία Αττικής, με διαφορά δειγμ/ψίας 6 μήνες περίπου
	204B	Δ.Ν	22/06/09	ΑΤΤΙΚΗΣ		
R2	188B	Δ.Ν	29/06/09	ΑΤΤΙΚΗΣ		Ο τύπος R2 περιέχει: 2 Νοσοκομεία Αττικής, με διαφορά δειγμ/ψίας λίγων ημερών
	192B	Δ.Ν	07/07/09	ΑΤΤΙΚΗΣ		
R3	117	Δ.Υ	04/08/09	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	0,18	Ο τύπος R3 περιέχει: Νοσοκομείο και δίκτυα ύδρευσης ίδιας γεωγραφικής περιοχής διαφορετικών δημοτικών διαμερισμάτων και με διαφορά δειγμ/ψίας 20 ημέρες περίπου
	118B	Δ.Ν	19/01/09	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ		
	109	Δ.Υ	14/07/09	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	0,14	
R4	191B	Δ.Ν	07/07/09	ΑΤΤΙΚΗΣ		Ο τύπος R4 περιέχει 2 στελέχη που προέρχονται από το ίδιο Νοσοκομείο, την ίδια δειγμ/ψία αλλά διαφορετικά σημεία(κρουνό δεξαμενής, δωμάτιο κλινικής)
	193B	Δ.Ν	07/07/09	ΑΤΤΙΚΗΣ		
R5	210B	Δ.Ν	18/11/09	ΑΤΤΙΚΗΣ		Ο τύπος R5 περιέχει 2 Νοσοκομεία διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών με διαφορά δειγμ/ψίας 1 χρόνο περίπου
	15	Δ.Υ	15/12/08	Ν.Α ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ		
R6	241B	Δ.Ν	22/02/10	ΑΤΤΙΚΗΣ		Ο τύπος R6 περιέχει 1 Νοσοκομείο Αττικής

RAPD- ΤΥΠΟΙ	ΣΤΕΛΕΧΗ	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ				ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ
		Είδος	Ημ/νια δειγμ/ψίας	Γεωγραφική περιοχή	Υπολ. χλώριο (mg/l)	
R7	254B	Δ.Ν	24/03/10	ΑΤΤΙΚΗΣ		Ο τύπος R7 περιέχει: 1 Νοσοκομείο Αττικής (τα στελέχη 254B,253B προέρχονται από τον ίδιο ψύκτη) και 3 δίκτυα ύδρευσης διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών με διαφορά στον χρόνο δειγμ/ψίας τους 4 μήνες περίπου
	103B	Δ.Υ	02/12/08	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	0,32	
	170B	Δ.Υ	22/04/09	Ν.Α ΗΛΕΙΑΣ		
	253B	Δ.Ν	24/03/10	ΑΤΤΙΚΗΣ		
	57	Δ.Υ	18/03/09	Ν.Α ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ		
R8	186B	Δ.Ν	29/06/09	ΑΤΤΙΚΗΣ		Ο τύπος R8 περιέχει 2 Νοσοκομεία Αττικής και 2 κολυμβητικές δεξαμενές διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών.
	173B	Δ.Ν	11/05/09	ΑΤΤΙΚΗΣ		
	124	Κ.Δ	17/02/10	ΑΤΤΙΚΗΣ	0,6	
	102	Κ.Δ	02/06/09	Ν.Α ΠΕΙΡΑΙΑ/Δ.ΠΟΡΟΥ	1,57	
R9	122	Δ.Υ	09/02/10	Ν.Α ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ		Ο τύπος R9 περιέχει 1 Κ.Δ. Αττικής (άλλο στέλεχος της οποίας από διαφορετικό σημείο εντάχθηκε στον προηγούμενο τύπο) 1 Νοσοκομείο Αττικής (τα 164B,165B προέρχονται από διαφορετικά σημεία, αίθουσα χειρουργείου και θάλαμο) και 2 Δ.Υ διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών με διαφορά δειγμ/ψίας 10 μήνες
	123	Κ.Δ	17/02/10	ΑΤΤΙΚΗ	0,54	
	164B	Δ.Ν	31/03/09	ΑΤΤΙΚΗΣ		
	165B	Δ.Ν	31/03/09	ΑΤΤΙΚΗΣ		
	74	Δ.Υ	01/04/09	Ν.Α ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ		
R10	148B	Δ.Ν	23/02/09	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ		Ο τύπος R10 περιέχει 2 στελέχη διαφορετικής πηγής προέλευσης και με διαφορά δειγμ/ψίας 3 μήνες περίπου
	77	Δ.Υ	05/05/09	Ν.Α ΠΕΙΡΑΙΑ/ Ν. ΑΓΚΙΣΤΡΙ	0,16	

RAPD-TYPOI	ΣΤΕΛΕΧΗ	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ				ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ
		Είδος	Ημ/νια δειγμ/ψίας	Γεωγραφική περιοχή	Υπολ. χλώριο (mg/l)	
R11	149B	Δ.Ν	23/02/09	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ		Ο τύπος R11 περιέχει: 1 Νοσοκομείο και 2 Δ.Υ της ίδιας δειγμ/ψίας και διαφορετικών σημείων της ίδιας γεωγραφικής περιοχής
	79	Δ.Υ	19/05/09	Ν.Α ΠΕΙΡΑΙΑ/ Ν. ΚΥΘΗΡΩΝ	0,37	
	80	Δ.Υ	19/05/09	Ν.Α ΠΕΙΡΑΙΑ/ Ν. ΚΥΘΗΡΩΝ	0,9	
R12	214B	Δ.Ν	30/11/09	ΑΤΤΙΚΗΣ		Ο τύπος R12 περιέχει 1 Δ.Ν. Αττικής
R13	224B	Δ.Ν	21/12/09	ΑΤΤΙΚΗΣ		Ο τύπος R13 περιέχει 1 Δ.Ν. Αττικής
R14	17	Δ.Υ	16/12/08	Ν.Α ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ		Ο τύπος R14 περιέχει 2 στελέχη που προέρχονται από το ίδιο σημείο της ίδιας δειγμ/ψίας (Μαγνησία) και 1 Δ.Υ διαφορετικής γεωγρ. περιοχής και διαφορά δειγμ/ψίας 6 μήνες
	18	Δ.Υ	16/12/08	Ν.Α ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ		
	101	Δ.Υ	02/06/09	Ν.Α ΠΕΙΡΑΙΑ/Δ.ΠΟΡΟΥ	1,17	
R15	104	Δ.Υ	10/06/09	Ν.Α ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ		Ο τύπος R15 περιέχει 1 Δ.Υ.
R16	213B	Δ.Ν	30/11/09	ΑΤΤΙΚΗΣ		Ο τύπος R16 περιέχει 1 Δ.Ν.
R17	105B	Κ.Δ	04/12/08	ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	1,75	Ο τύπος R17 περιέχει 1 κολυμβητική δεξαμενή
R18	37	Δ.Υ	18/02/09	Ν.Α ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ		Ο τύπος R18 περιέχει 2 Δ.Υ διαφορετικής γεωγραφικής περιοχής με διαφορά δειγμ/ψίας 2 μήνες
	14	Δ.Υ	16/12/08	Ν.Α ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ		
R19	120	Κ.Δ	24/11/09	Ν.Α ΑΘΗΝΩΝ	3,85	Ο τύπος R19 περιέχει 1 κολυμβητική δεξαμενή
R20	104B	Δ.Υ	02/12/08	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	0,26	Ο τύπος R20 περιέχει 1 Δ.Υ
R21	230B	Δ.Ν	18/01/10	ΑΤΤΙΚΗΣ		Ο τύπος R21 περιέχει 2 Δ.Ν. Αττικής με δειγμ/ψια τον ίδιο μήνα
	231B	Δ.Ν	19/01/10	ΑΤΤΙΚΗΣ		
R22	61	Δ.Υ	18/03/09	Ν.Α ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ		Ο τύπος R22 περιέχει 1 Δ.Υ.

RAPD- ΤΥΠΟΙ	ΣΤΕΛΕΧΗ	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ				ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ
		Είδος	Ημ/νια δειγμ/ψίας	Γεωγραφική περιοχή	Υπολ. χλώριο (mg/l)	
R23	107B	Κ.Δ	04/12/08	ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	0,97	Ο τύπος R23 περιέχει: 3 Κ.Δ (τα στελέχη 107B,106B προέρχονται από τη μικρή και μεγάλη Κ.Δ της ίδιας κτιριακής εγκατάστασης)και 1 Δ.Υ. διαφορετικής γεωγραφικής περιοχής
	106B	Κ.Δ	04/12/08	ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	0,28	
	39	Δ.Υ	18/02/09	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	0,3	
	78	Κ.Δ	05/05/09	Ν.Α ΠΕΙΡΑΙΑ/ Ν. ΑΓΚΙΣΤΡΙ		
R24	184B	Δ.Ν	22/06/09	ΑΤΤΙΚΗΣ		Ο τύπος R24 περιέχει 1 Νοσοκομείο Αττικής, με δύο στελέχη που προέρχονται από την ίδια βρύση της ΜΕΘ σε δειγμ/ψια 15 ημέρες περίπου μετά και 1 Δ.Υ διαφορετικής γεωγραφικής περιοχής με διαφορά δειγμ/ψιας 1 μήνα περίπου
	194B	Δ.Ν	08/07/09	ΑΤΤΙΚΗΣ		
	97	Δ.Υ	19/05/09	Ν.Α ΣΑΜΟΥ		
R25	36	Δ.Υ	16/02/09	Ν.Α ΑΘΗΝΩΝ		Ο τύπος R25 περιέχει 2 Δ.Υ διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών με διαφορά δειγμ/ψιας 1 μήνα περίπου
	52	Δ.Υ	10/03/09	Ν.Α ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ		
R26	125	Κ.Δ	17/02/10	ΑΤΤΙΚΗΣ	0,9	Ο τύπος R26 περιέχει 1 Κ.Δ. και 1 Δ.Υ. διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών
	102B	Δ.Υ	02/12/08	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	0,16	
R27	114B	Κ.Δ	04/12/08	ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ	0,25	Ο τύπος R27 περιέχει 1 κολυμβητική δεξαμενή
R28	91	Κ.Δ	27/05/09	ΑΤΤΙΚΗ	0,08	Ο τύπος R28 περιέχει 1 κολυμβητική δεξαμενή

Οι γονότυποι 3, 7, 8, 9, 14, 23 και 24 περιλαμβάνουν περισσότερα από 3 στελέχη ο καθένας, ενώ οι υπόλοιποι γονότυποι περιλαμβάνουν από 1 έως 2 στελέχη. Ωστόσο το μεγαλύτερο ποσοστό των στελεχών (18/59) κατανέμεται στους γονότυπους 7, 8, 9 και 23. Τα στελέχη που περιλαμβάνονται σε αυτούς τους γονότυπους δεν εμφανίζουν κάποια συσχέτιση μεταξύ τους, ούτε ως προς το είδος των δειγμάτων ούτε ως προς την γεωγραφική τους προέλευση.

Αρχική μας επιδίωξη ήταν και η συσχέτιση των αποτελεσμάτων της τυποποίησης με την συγκέντρωση του χλωρίου στα δείγματα, αλλά δυστυχώς ήταν πολύ δύσκολο να έχουμε

ακριβείς πληροφορίες για την μέτρηση του χλωρίου σε όλα τα δείγματα. Η μη συστηματική χλωρίωση και η απουσία συνέπειας στην ποσότητα και στη συχνότητα χλωρίωσης, αποτελεί σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας.

Το γεγονός ότι, τα στελέχη που ανήκουν σε έναν τύπο (για παράδειγμα στον τύπο 9) απέχουν χρονικά (οι ημερομηνίες δειγματοληψίας τους) αρκετούς μήνες, κάνει μάλλον απίθανη την περίπτωση να σχετίζονται είτε επιδημιολογικά, είτε γενετικά. Αυτό αποτελεί ίσως ένα παράδειγμα των περιορισμών των Μοριακών μεθόδων και ειδικά της RAPD-PCR ανάλυσης, όταν δηλαδή η μελέτη πραγματοποιείται για μεγάλο χρονικό διάστημα, με μεγάλο αριθμό απομονώσεων (Han Spreijer *et al*, 1999).

3.4 Σύγκριση των δυο τυποποιητικών μεθόδων

Από τα 83 στελέχη που ταυτοποιήθηκαν ως *Ps. aeruginosa* μόνο το 36% (30/83) τυποποιήθηκε και με τις δυο μεθόδους (σημειώτεον ότι συμπεριλήφθηκαν και τα στελέχη τα οποία συγκολλούνταν μόνο με τους πολυδύναμους ορούς και όχι με τους αντίστοιχους μονοδύναμους). Από τα υπόλοιπα στελέχη

- 12 τυποποιήθηκαν μόνο με οροτυποποίηση (ποσοστό 14,5%)
- 29 τυποποιήθηκαν μόνο με RAPD-PCR ανάλυση (ποσοστό 35%) και
- 12 δεν τυποποιήθηκαν με καμία από τις δύο μεθόδους (ποσοστό 14,5%)

Τα στοιχεία αυτά φαίνονται τόσο στον πίνακα 3.4.1 όσο και στην εικόνα 3.4.1.

Πίνακας 3.4.1 Συγκεντρωτικός πίνακας των 83 στελεχών που μελετήθηκαν και η κατάταξη τους στους αντίστοιχους ορότυπους και RAPD- τύπους

RAPD- τύποι	Αριθμός στελεχών	Είδος δείγματος	Προέλευση δείγματος	Ορότυποι
R1	229B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	NT ^a
	204B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	O:9
R2	188B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	NT
	192B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	O:5
R3	117	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	NT
	118B	Δ.Ν	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	NT
	109	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	O:1

RAPD- τύποι	Αριθμός στελεχών	Είδος δείγματος	Προέλευση δείγματος	Ορότυποι
R4	191B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	PMA ^β
	193B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	ROUGH
R5	210B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	ROUGH
	15	Δ.Υ	N.A ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	NT
R6	241B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	NT
R7	254B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	PMA
	103B	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	ROUGH
	170B	Δ.Υ	N.A ΗΛΕΙΑΣ	O:6
	253B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	O:6
	57	Δ.Υ	N.A ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	PME ^γ
R8	186B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	PMF
	173B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	O:10
	124	Κ.Δ	ΑΤΤΙΚΗ	O:11
	102	Κ.Δ	N.A ΠΕΙΡΑΙΑ/Δ.ΠΟΡΟΥ	NT
R9	122	Δ.Υ	N.A ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	NT
	123	Κ.Δ	ΑΤΤΙΚΗ	O:11
	164B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	O:11
	165B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	ROUGH
				NT
	74	Δ.Υ	N.A ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	

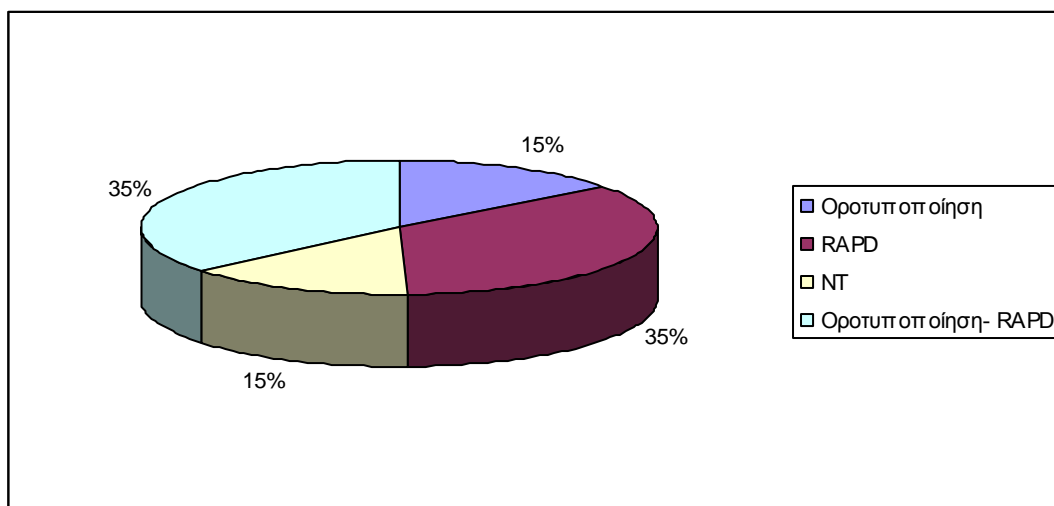
RAPD- τύποι	Αριθμός στελεχούς	Είδος δείγματος	Προέλευση δείγματος	Ορότυποι
R10	148B	Δ.Ν	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ	PMA NT
	77	Δ.Υ	N.A ΠΕΙΡΑΙΑ/ N. ΑΓΚΙΣΤΡΙ	
R11	149B	Δ.Ν	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ	PMA
	79	Δ.Υ	N.A ΠΕΙΡΑΙΑ/ N. ΚΥΘΗΡΩΝ	PMA
	80	Δ.Υ	N.A ΠΕΙΡΑΙΑ/ N. ΚΥΘΗΡΩΝ	NT
R12	214B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	NT
R13	224B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	NT
R14	17	Δ.Υ	N.A ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	NT
	18	Δ.Υ	N.A ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	NT
	101	Δ.Υ	N.A ΠΕΙΡΑΙΑ/Δ.ΠΟΡΟΥ	NT
R15	104	Δ.Υ	N.A ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	O:10
R16	213B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	O:12
R17	105B	Κ.Δ	ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	O:1
R18	37	Δ.Υ	N.A ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	PME
	14	Δ.Υ	N.A ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	O:1
R19	120	Κ.Δ	N.A ΑΘΗΝΩΝ	O:11
R20	104B	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	NT
R21	230B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	O:12
	231B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	NT
R22	61	Δ.Υ	N.A ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	PMA

RAPD- τύποι	Αριθμός στελεγχούς	Είδος δείγματος	Προέλευση δείγματος	Ορότυποι
R23	107B	Κ.Δ	ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	ROUGH
	106B	Κ.Δ	ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ	O:11
	39	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	O:1
	78	Κ.Δ	N.A ΠΕΙΡΑΙΑ/ N. ΑΓΚΙΣΤΡΙ	NT
R24	184B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	O:10
	194B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	NT
	97	Δ.Υ	N.A ΣΑΜΟΥ	NT
R25	36	Δ.Υ	N.A ΑΘΗΝΩΝ	O:1
	52	Δ.Υ	N.A ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	O:10
R26	125	Κ.Δ	ΑΤΤΙΚΗΣ	ROUGH
	102B	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	O:1
R27	114B	Κ.Δ	ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ	NT
R28	91	Κ.Δ	ΑΤΤΙΚΗ	NT
NT	100B	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	PMA
NT	4	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	ROUGH
NT	6	Κ.Δ	N.A ΑΘΗΝΩΝ	NT
NT	13	Δ.Υ	N.A ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	NT
NT	34	Δ.Υ	N.A. ΕΥΒΟΙΑΣ	O:1
NT	38	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	PMF
NT	73	Δ.Υ	N.A ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ	PMC

RAPD- τύποι	Αριθμός στελεγχούς	Είδος δείγματος	Προέλευση δείγματος	Ορότυποι
NT	81	Δ.Υ	N.A ΠΕΙΡΑΙΑ	NT
NT	82	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ ΑΤΤΙΚΗΣ	PME
NT	83	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ ΑΤΤΙΚΗΣ	PME
NT	89	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ ΑΤΤΙΚΗΣ	NT
NT	90	Κ.Δ	ΞΕΝ/ΧΕΙΟ ΑΤΤΙΚΗΣ	NT
NT	94	Δ.Υ	N.A. ΦΘΙΩΤΙΔΑΣ	NT
NT	95	Δ.Υ	N.A. ΦΘΙΩΤΙΔΑΣ	NT
NT	98	Δ.Υ	N.A ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	NT
NT	99	Δ.Υ	N.A ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	O:9
NT	100	Δ.Υ	N.A ΑΙΤΩΛ/ΝΙΑΣ	O:10
NT	103	Δ.Υ	N.A. ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	O:1
NT	179B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	PMA
NT	187B	Δ.Ν	ΑΤΤΙΚΗΣ	PMA
NT	105	Δ.Υ	N.A ΠΕΙΡΑΙΑ	NT
NT	121	Κ.Δ	N.A ΑΘΗΝΩΝ	O:11
NT	126	Κ.Δ	ΑΤΤΙΚΗΣ	NT
NT	108	Δ.Υ	ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΩΝ	NT

^a: Not Typeable, ^b: Συγκόλληση μόνο με τον πολυδύναμο ορό A, ^γ: Συγκόλληση μόνο με τον πολυδύναμο ορό E

Στην εικόνα 3.4.1 φαίνονται τα ποσοστά των στελεχών *Ps. aeruginosa* που τυποποιήθηκαν και με τις δυο μεθόδους, με μια από τις δυο ή με καμμία από τις δυο.



Εικόνα 3.4.1 Ποσοστά στελεχών *Ps. aeruginosa* που τυποποιήθηκαν και με τις δυο μεθόδους (Οροτυποποίηση- RAPD), μόνο με οροτυποποίηση, μόνο με RAPD ή με καμία από τις δυο (NT)

Πίνακας 3.4.2 Κατάταξη των στελεχών που τυποποιούνται μόνο με τους πολυδύναμους ορούς σε RAPD-τύπους

Πολυδύναμοι αντιοροί	Αριθμός στελέχους	Είδος δείγματος	RAPD-τύποι
Polyvalent A	100B	Δ.Y	NT
	148B	Δ.N	R10
	149B	Δ.N	R11
	61	Δ.Y	R22
	79	Δ.Y	R11
	179B	Δ.N	NT
	191B	Δ.N	R4
	254B	Δ.N	R7
Polyvalent C	73	Δ.Y	NT
Polyvalent E	37	Δ.Y	R18
	57	Δ.Y	R7
	82	K.Δ	NT
	83	K.Δ	NT
Polyvalent F	38	Δ.Y	NT
	186B	Δ.N	R8

Από τα 15 αυτά στελέχη 6 δεν τυποποιούνται με την RAPD ανάλυση (ποσοστό 40%). Τα υπόλοιπα στελέχη κατανέμονται το κάθε ένα σχεδόν σε διαφορετικό RAPD τύπο (με εξαίρεση 4 στελέχη, που ανά 2 κατανέμονται στους ίδιους τύπους 7 και 11).

Πίνακας 3.4.3 Κατάταξη των Rough στελεχών σε RAPD-τύπους

	Αριθμός στελέχους	Είδος δείγματος	RAPD-τύποι
Rough στελέχη	103B	Δ.Υ	R7
	107B	Κ.Δ	R23
	4	Δ.Υ	NT
	165B	Δ.Ν	R9
	193B	Δ.Ν	R4
	210B	Δ.Ν	R5
	125	Κ.Δ	R26

Από τα 7 rough στελέχη μόνο 1 δεν τυποποιήθηκε με την RAPD ανάλυση. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό διότι δεδομένου ότι τα στελέχη αυτά δεν μπορούν να τυποποιηθούν με την ορολογική μέθοδο, φαίνεται να είναι δυνατή η τυποποίηση τους με την μοριακή μέθοδο.

Είναι φανερό ότι το ποσοστό των στελεχών *Ps. aeruginosa* που τυποποιούνται με την μοριακή μέθοδο (59/83: 71%) είναι μεγαλύτερο από αυτό (42/83:51%) των στελεχών που τυποποιούνται με την φαινοτυπική μέθοδο (οροτυποποίηση).

Ιδιαίτερα σημαντικό είναι επίσης ότι, με την μοριακή μέθοδο είναι δυνατή η τυποποίηση τόσο των Rough στελεχών, όσο και 23 από τα 34 στελέχη που δεν τυποποιούνται με την ορολογική μέθοδο. Δηλαδή η RAPD ανάλυση κατάφερε να τυποποιήσει σε υψηλό ποσοστό (71%) τα στελέχη που δεν ήταν δυνατόν να τυποποιηθούν με την ορολογική μέθοδο.

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι, η μοριακή τυποποίηση είναι απαραίτητη όταν μελετώνται περιβαλλοντικά στελέχη, διότι μόνο με τα αποτελέσματα της φαινοτυπικής μεθόδου και συγκεκριμένα της οροτυποποίησης δεν θα έχουμε πλήρη εικόνα της ταυτότητας των βακτηρίων.

Πίνακας 3.4.4 Συσχέτιση RAPD-τύπων και οροτύπων στελεχών *Ps. aeruginosa*

RAPD- τύποι	Ορότυποι
R1	O:9
R2	O:5
R3	O:1
R4	PMA
R5	-
R6	-
R7	PMA, O:6, PME
R8	PMF, O:11, O:10
R9	O:11
R10	PMA
R11	PMA
R12	-
R13	-
R14	-
R15	O:10
R16	O:12
R17	O:1
R18	PME, O:1
R19	O:11
R20	-
R21	O:12
R22	PMA
R23	O:1, O:11
R24	O:10
R25	O:1, O:10
R26	O:1
R27	-
R28	-

Από τον πίνακα 3.4.4 φαίνεται ότι για παράδειγμα ο ορότυπος O:1 αντιστοιχεί σε 6 διαφορετικούς RAPD τύπους. Αυτό σημαίνει ότι η μοριακή μέθοδος έχει υψηλότερη διακριτική ικανότητα συγκριτικά με την οροτυποποίηση. Έτσι, στελέχη που ανήκουν σε αυτόν τον ορότυπο μπορεί να είναι ή να μην είναι όμοια γενετικά.

Παρατηρούμε επίσης ότι, ενώ ένας γονότυπος θα έπρεπε να αντιστοιχεί σε έναν ορότυπο, ωστόσο για παράδειγμα ο R8 αντιστοιχεί σε περισσότερους ορότυπους. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται και στην μελέτη των Matthias Trautmann *et al*, 2006 όπου μεμονωμένοι γονότυποι φαίνεται να εκφράζουν περισσότερα από 4 διαφορετικά O-αντιγόνα. Αυτό δηλώνει ότι, τα στελέχη περιέχουν γονίδια για την σύνθεση διαφορετικών O-αντιγόνων, τα οποία και εκφράζονται αναλόγως με τις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (Matthias Trautmann *et al*, 2006).

Στην εργασία μας αντιμετωπίστηκε το πρόβλημα της ύπαρξης ενός σημαντικού αριθμού ατυποποίητων στελεχών, είτε και με τις δύο μεθόδους, είτε με μια από τις δυο. Αυτό αποδίδεται αφενός στο ότι τα στελέχη μας είναι περιβαλλοντικά και αφετέρου στους

περιορισμούς των μεθόδων. Ωστόσο, όπως πολύ εύκολα μπορούμε να διαπιστώσουμε από την βιβλιογραφία οι μέθοδοι αυτοί εφαρμόζονται σε κλινικά στελέχη με υψηλά ποσοστά τυποποίησης. Παραδείγματα τέτοιων μελετών παρατίθενται στην συνέχεια.

Στην μελέτη των Mahenthiralingam E. *et al*, εφαρμόστηκε RAPD PCR ανάλυση προκειμένου να εκτιμηθεί εάν οι μεταβολές στον φαινότυπο της *Ps. aeruginosa* (αλλαγή στην κινητικότητα, μετατροπή από τον smooth στον rough φαινότυπο) που παρατηρούνταν σε ασθενείς με κυστική ίνωση σχετίζονταν με αλλαγές στον γονότυπο του βακτηρίου. Για τον σκοπό αυτό αναλύθηκαν με RAPD 385 απομονώσεις *Ps. aeruginosa*, στελεχών που προκάλεσαν αρχικά την ασθένεια και αυτών που απομονώθηκαν μετέπειτα με διαφορετικό φαινότυπο, κατά την διάρκεια του χρόνιου αποικισμού. Χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής 272 και από τα αποτελέσματα της RAPD ανάλυσης διαπιστώθηκε ότι παρά την μεταβολή του φαινοτύπου, το μοριακό προφίλ των διαδοχικών δειγμάτων παρέμενε σταθερό. Στην μελέτη αυτή η RAPD ανάλυση φάνηκε ιδιαίτερα χρήσιμη για την τυποποίηση των στελεχών *Ps. aeruginosa* από ασθενείς με κυστική ίνωση και τα αποτελέσματα της επιβεβαιώθηκαν από την Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) (Mahenthiralingam E. *et al*, 1996).

Στην μελέτη των Nicole Renders *et al*, 87 στελέχη *Ps. aeruginosa* από ασθενείς με κυστική ίνωση τυποποιήθηκαν επιτυχώς με RAPD PCR ανάλυση και PFGE. Τα αποτελέσματα της τυποποίησης μάλιστα απέδειξαν την αξιοπιστία της RAPD PCR ανάλυσης, συγκριτικά με την PFGE (Nicole Renders *et al*, 1996).

Στην μελέτη των Hasan Nazik *et al*, 49 στελέχη *Ps. aeruginosa* απομονώθηκαν από 16 ασθενείς με κυστική ίνωση, στην διάρκεια ενός έτους. Όλα τα στελέχη τυποποιήθηκαν με RAPD- PCR ανάλυση, από την οποία και προέκυψαν 21 διαφορετικοί γονότυποι (Hasan Nazik *et al*, 2007).

Στην μελέτη των Jacomina A. A. Hoogkamp- Korstanje *et al*, μελετήθηκε ο κίνδυνος διασταυρούμενης μετάδοσης και μόλυνσης από *Ps. aeruginosa* μεταξύ ασθενών με κυστική ίνωση σε καλοκαιρινή κατασκήνωση. Για τον σκοπό αυτό 91 στελέχη *Ps. aeruginosa* τυποποιήθηκαν περαιτέρω. Τα στελέχη *Ps. aeruginosa* ήταν ορολογικά ατυποποίητα σε ποσοστό 47% (43/91). Όλα τα στελέχη όμως τυποποιήθηκαν με την RAPD-PCR ανάλυση. Βλέπουμε ότι αν και η φαινοτυπική μέθοδος δεν έδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, το πρόβλημα έλυσε η εφαρμογή της RAPD-PCR ανάλυσης. (Jacomina A. A. Hoogkamp- Korstanje *et al*, 1995).

Για τα περιβαλλοντικά στελέχη όμως, υπάρχει πολύ μικρή πληροφόρηση όσον αφορά την τυποποίηση στελεχών *Ps. aeruginosa* και έτσι δεν είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων μας με βιβλιογραφικά δεδομένα.

Στην μελέτη των E. Sazakli *et al*, η RAPD-PCR ανάλυση κατάφερε να τυποποιήσει και τα 160 στελέχη που είχαν απομονωθεί από δείγματα νερού δικτύου ύδρευσης, εμφιαλωμένων νερών, επιφανειακών νερών και κολυμβητικών δεξαμενών του Ελλαδικού χώρου, στην διάρκεια 5 ετών (E. Sazakli *et al*, 2005).

Στην μελέτη όμως των Pappa O. *et al*, αντιμετωπίζεται όπως και στην δική μας εργασία το πρόβλημα ατυποποίητων στελεχών από περιβαλλοντικά δείγματα. Στην μελέτη αυτή, εξετάστηκαν 48 περιβαλλοντικά δείγματα για απομόνωση στελεχών *Ps. aeruginosa*. 31

δείγματα νερού προέρχονταν επίσης από το Κεντρικό Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας, ενώ τα υπόλοιπα 17 ήταν δείγματα λυμάτων. Από τα δείγματα αυτά απομονώθηκαν 70 στελέχη *Ps. aeruginosa* που τυποποιήθηκαν με οροτυποποίηση και RAPD-PCR ανάλυση. Μόνο 27 από τα 70 στελέχη (39%) τυποποιήθηκαν με την οροτυποποίηση και ομαδοποιήθηκαν σε 10 διαφορετικούς ορότυπους, με τους ορότυπους O:11 και O:1 να επικρατούν. Η τυποποιητική ικανότητα της RAPD-PCR ανάλυσης ήταν αρκετά υψηλότερη (49/70, 70%). Ωστόσο, το 68,6% των στελεχών δεν τυποποιήθηκε με τη μια, ή την άλλη μέθοδο ή και με τις δυο (Pappa O. *et al*, 2009).

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Έχοντας ολοκληρώσει την ανάλυση των αποτελεσμάτων μας μπορούμε να συμπεράνουμε τα εξής:

1. *Ps. aeruginosa* ανιχνεύθηκε σε 79 από τα 671 χλωριωμένα δείγματα νερού που διηθήθηκαν (ποσοστό 12%). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η *Ps. aeruginosa* είναι ικανή να επιβιώνει σε χλωριωμένα συστήματα νερού.
2. Η *Ps. aeruginosa* εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στα δείγματα νερού που προέρχονται από κολυμβητικές δεξαμενές (18/73, 24,6%) και ακολουθούν τα δείγματα από το δίκτυο ύδρευσης καταστημάτων και κατοικιών (16,6%) και τέλος τα δείγματα από το δίκτυο ύδρευσης Νοσοκομείων (ποσοστό 6,5%).
3. Παρατηρείται ότι κατά την μέθοδο ανίχνευσης της *Ps. aeruginosa*, με τη χρήση εκλεκτικού θρεπτικού υλικού οι περισσότερες αποικίες που αναπτύχθηκαν ήταν τυπικές και θεωρήθηκαν ως *Ps. aeruginosa*, με βάση το ISO 16266:2006 “Water quality- Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*- Method by membrane filtration”. Από τις 54 αποικίες ωστόσο που απαιτούσαν επιβεβαίωση, ταυτοποιήθηκαν ως *Ps. aeruginosa* μόνο οι 6 (ποσοστό 11,11%). Οι υπόλοιπες προφανώς άνηκαν σε διαφορετικά είδη *Pseudomonas*. Αυτό δείχνει ότι απαιτούνται πάντα οι επιβεβαιωτικές δοκιμασίες, πριν αποφανθούμε για την μικροβιολογική ποιότητα του νερού.
4. Με την ταυτοποίηση επιτυγχάνεται η αρχική αναγνώριση των περιβαλλοντικών στελεχών *Ps. aeruginosa*. Για την απόκτηση ωστόσο επιπλέον πληροφοριών για τον χαρακτηρισμό του μικροοργανισμού στο οικοσύστημα, η εφαρμογή και κάποιας άλλης φαινοτυπικής αλλά και μοριακής μεθόδου κρίνεται απαραίτητη.
5. Από τα 83 στελέχη που ταυτοποιήθηκαν ως *Ps. aeruginosa* μόνο το 36% (30/83) τυποποιήθηκε και με τις δυο τυποποιητικές μεθόδους. Το υπόλοιπο 64% δεν τυποποιήθηκε με τη μία ή την άλλη μέθοδο ή και με τις δυο.
6. 42 από τα 83 στελέχη *Ps. aeruginosa* τυποποιήθηκαν με τους αντιορούς βάση σωματικού Ο-αντιγόνου (51%). Η τυποποιητική ικανότητα της μεθόδου θεωρείται ικανοποιητική.

7. Τα στελέχη που τυποποιήθηκαν με οροσυγκόλληση ταξινομούνται σε 7 ορότυπους. Ο επικρατέστερος ορότυπος είναι ο O:1, ο οποίος αντιπροσωπεύει το 33,4% των στελεχών που τυποποιήθηκαν και ακολουθεί ο O:11 με ποσοστό 22,2%. Ο ορότυπος O:1 φαίνεται να είναι και αυτός που επικρατεί στα περιβαλλοντικά δείγματα. Αξιοσημείωτο είναι ότι σχεδόν όλα τα στελέχη των κολυμβητικών δεξαμενών ανήκουν στον O:11.
8. Ενδιαφέρον είναι ότι από τα 42 στελέχη που τυποποιήθηκαν με την χρήση των αντιορών, τα 15 (36%) συγκολλούνται μόνο με τους πολυδύναμους ορούς και όχι με τους αντίστοιχους μονοδύναμους.
9. 59 από τα 83 στελέχη που ταυτοποιήθηκαν ως *Ps. aeruginosa*, τυποποιήθηκαν με την Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) ανάλυση (71%) και κατανεμήθηκαν σε 28 γονότυπους. Η τυποποιητική ικανότητα της μεθόδου θεωρείται αρκετά υψηλή δεδομένης και της φύσης των περιβαλλοντικών στελεχών.
10. Το μεγαλύτερο ποσοστό των στελεχών (18/59) που τυποποιήθηκαν με την RAPD-PCR ανάλυση κατανέμεται στους RAPD τύπους R7, R8, R9 και R23. Ωστόσο, τα στελέχη που περιλαμβάνονται σε αυτούς τους γονότυπους δεν φαίνεται να εμφανίζουν κάποια συσχέτιση, ούτε ως προς το είδος των δειγμάτων, ούτε ως προς την γεωγραφική προέλευση.
11. Με την RAPD-PCR ανάλυση τυποποιήθηκε ένα σημαντικό ποσοστό (71%) τόσο στελεχών Rough, όσο και στελεχών που ήταν ατυποποίητα με την οροτυποποίηση. Οδηγούμαστε λοιπόν στο συμπέρασμα ότι, η μοριακή τυποποίηση προσφέρει μια πιο ολοκληρωμένη αναγνώριση των περιβαλλοντικών στελεχών, σε σχέση με την φαινοτυπική μέθοδο.
12. Παρατηρήθηκε ότι κάποιοι ορότυποι αντιστοιχούν σε περισσότερους από έναν RAPD τύπους. Αυτό αποδεικνύει υψηλότερη διακριτική ικανότητα της μοριακής μεθόδου σε σχέση με την φαινοτυπική, οροτυποποίηση. Έτσι, στελέχη που ανήκουν στον ίδιο ορότυπο μπορεί να είναι ή όχι όμοια γενετικά.
13. Κάποιοι RAPD τύποι αντιστοιχούν σε περισσότερους από έναν ορότυπους. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι, τα στελέχη περιέχουν γονίδια για την σύνθεση διαφορετικών O- αντιγόνων, τα οποία και εκφράζουν ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες.
14. Γενικά, παρατηρείται μια μεγάλη ποικιλομορφία των στελεχών *Ps. aeruginosa* που συναντώνται στο χλωριωμένο περιβάλλον του νερού. Αυτή είναι ίσως και η ιδιαιτερότητα των περιβαλλοντικών στελεχών. Πολύ συχνά βρίσκονται σε δυσμενές περιβάλλον και η προσαρμογή τους προκειμένου να επιβιώσουν, μεταβάλλει σε μεγάλο βαθμό τα φαινοτυπικά και γενετικά χαρακτηριστικά τους.
15. Από την παρατήρηση των επιδημιολογικών στοιχείων φαίνεται ότι δεν υπάρχει μεγάλη συσχέτιση των στελεχών που ομαδοποιούνται στους ίδιους ορότυπους και γονότυπους με βάση το είδος του δείγματος από το οποίο προέρχονται (αν δηλαδή είναι δίκτυο ύδρευσης ή κολυμβητική δεξαμενή), την γεωγραφική προέλευση ή τον χρόνο δειγματοληψίας.

16. Δεδομένου ότι, η *Ps. aeruginosa* αφενός αποτελεί ένα δυνητικό κίνδυνο για ευπαθείς ομάδες (ανοσοκατεσταλμένα άτομα) και αφετέρου επιζεί στο χλώριο θα έπρεπε ίσως να συμπεριληφθεί στις μικροβιολογικές παραμέτρους που ελέγχονται στο νερό ανθρώπινης κατανάλωσης και στις κολυμβητικές δεξαμενές.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ✓ Καλογεροπούλου Ε. «*Η Δημιουργία της βιομεμβράνης και ο ρόλος της στη μικροβιακή αντοχή*» **Εφαρμοσμένη Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωστική** Περίοδος Β', Τόμος 13, Τεύχος 2, σελ. 79-85, 2008
- ✓ **Καραούλη Βασιλική Ευθ.**, Πρ/μένη Τμήματος Υδάτων & Αποβλήτων Υπ.Υγείας και Κοιν. Αλληλεγγύης . Παρουσίαση Power Point με θέμα «*Απολύμανση του πόσιμου νερού με χλωρίωση - Άλλες τεχνικές* »
- ✓ **Λαγουμιντζής Σ. Γεώργιος**, Μελέτη της δράσης της *Pseudomonas aeruginosa* στη μετάδοση του σήματος ενεργοποίησης σε ανθρώπινα μακροφάγα, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2004
- ✓ **Μελαμπιανάκη Ζ.,** Ε. Βελονάκης, Α. Βατόπουλος «*Βιομεμβράνες- Άνθρωπος- Περιβάλλον*» **ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**,24(5):411-43, 2007
- ✓ **Ξαπλαντέρη Παναγιώτα Α.,** Μελέτη του ρόλου των υποδοχέων Φυσικής Ανοσίας στην αλληλεπίδραση της *Ps. aeruginosa* με ανθρώπινα μονοκύτταρα, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2008
- ✓ **Παπαπετροπούλου Μ., Α. Μαυρίδου** **ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**, Εκδ. ΤΡΑΥΛΟΣ, Αθήνα, 1995
- ✓ **Σαζακλή Ε.,** Ταυτοποίηση *Pseudomonas spp* που απομονώνονται από το υδάτινο περιβάλλον με βιοχημικές, ηλεκτροφορητικές και μοριακές τεχνικές, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2005
- ✓ Υγειονομική Διάταξη ΚΥΑ Υ2/2600/2001 «Ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης»
- ✓ Υ.Μ. 5673/ 4.12.57 Υγειονομική Διάταξη για την απολύμανση του ύδατος των υδρεύσεων
- ✓ Υγειονομική διάταξη Γ1/ 443/ 73 «Περί κολυμβητικών δεξαμενών μετά οδηγίων κατασκευής και λειτουργίας αυτών»
- ✓ 4^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ, ΚΛΙΝΙΚΟ ΦΡΟΝΤΙΣΤΗΡΙΟ 3, «*ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ*», ΑΘΗΝΑ, 2006
- ✓ **Arora K. Shiwani,** Wolfgang C. Mathew “*Sequence Polymorphism in the Glycosylation Island and Flagellins of Pseudomonas aeruginosa*” **Journal of Bacteriology**, 186:2115-2122, 2004

- ✓ **Banning Natasha**, Simon Toze and Brian J. Mee “*Persistence of biofilm-associated Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa in groundwater and treated effluent in a laboratory model system*” **Microbiology**, 149, 47-55, 2003
- ✓ **Barnini S.**, Dodi C., “*Enhanced resolution of random amplified polymorphic DNA genotyping of Pseudomonas aeruginosa*”, **Letters in Applied Microbiology**, 39:274-277, 2004
- ✓ **Belkum A. van**, P.T.Tassios, L. Dijkshoorn, S. Haeggman, B. Cookson, N. K. Fry, V. Fussing, J. Green, E. Feil, P. Gerner-Smidt, S. Brisse, M. Struelens “*Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology*”, **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 13:1-46, 2007
- ✓ **Bressler D.**, M. Balzer, A. Dannehl, H.-C. Flemming and J. Wingender “*Persistence of Pseudomonas aeruginosa in drinking-water biofilms*”, Water Science & Technology: Water Supply- WSTWS/9.1/2009
- ✓ **Brokopp Charles D.**, Rafael Gomez-Lus, J. J. Farmer III “*Serological Typing of Pseudomonas aeruginosa: Use of Commercial Antisera and Live Antigens*” **Journal of Clinical Microbiology**, Vol. 5, No. 6, p. 640-649, June 1977
- ✓ **Campbell Maureen**, Eshwar Mahenthiralingam, AND David P. Speert “*Evaluation of Random Amplified Polymorphic DNA Typing of Pseudomonas aeruginosa*” **Journal of Clinical Microbiology**, Vol. 38, No. 12, p. 4614-4615, Dec.2000
- ✓ **Filho Luiz Da Silva** “*Molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa infections in a cystic fibrosis outpatient clinic*” 50:261-267, 2001
- ✓ **Jacomina A. A. Hoogkamp- Korstanje**, Jacques F. G. M. Meis, Johan Kissing, Johannes van der Laag, Willem J. G. Melchers “*Risk of Cross-Colonization and Infection by Pseudomonas aeruginosa in a Holiday Camp for Cystic Fibrosis Patients*” **Journal of Clinical Microbiology**, Vol. 33, No. 3, p. 572-575, Mar. 1995
- ✓ **Kersulyte Dangeruta**, Marc J. Struelens, Ariane Deplano, Douglas E. Berg, “*Comparison of Arbitrarily Primed PCR and Macrorestriction (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) Typing of Pseudomonas aeruginosa Strains from Cystic Fibrosis Patients*”, **Journal of Clinical Microbiology**, Vol.33, No.8, p. 2216-2219, Aug. 1995
- ✓ **King Jerry D.**, Dana Kocincova, Erin L. Westman, Joseph S. Lam “*Lipopolysaccharide biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa*” **Innate Immunity**, 15(5), 261-312, SAGE Publications 2009
- ✓ **Legakis N J**, M. Aliferopoulou, J. Papavassiliou, M. Papapetropoulou “*Serotypes of Pseudomonas aeruginosa in clinical specimens in relation to antibiotic susceptibility*” **J. Clin. Microbiol.** 16(3): 458-463 September 1982

- ✓ **Mahenthiralingam Eshwar**, Maureen E. Campbell, Jennifer Foster, Joseph S. Lam, David P. Speert “*Random Amplified Polymorphic DNA Typing of Pseudomonas aeruginosa Isolates Recovered from Patients with Cystic Fibrosis*”, **Journal of Clinical Microbiology**, Vol.34, No.5, p. 1129-1135, May 1996
- ✓ **Marmur J.** “*Procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms*” **J. Mol. BIOL.** 3, 208-218, 1961
- ✓ **Marmur J., P. Doty** “*Procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms*” **J. Mol. BIOL.** 3, 585, 1961
- ✓ **Mavridou A.,** Vagiona A., Boufa P., Vantarakis A., Roussia V., Papapetropoulou M. “*Assesment of the quality of pool water in Greece using microbial indicators*” Pool and spa conference, Budapest, 10-11 March, 2005
- ✓ **Mavridou A.,** Kamma J., Mandilara G., Delaportas P., Komioti F. “*Microbial risk assessment of dental unit water systems in general dental practice in Greece*” **Water Science and Technology**, 54: 269-273, 2006
- ✓ **Mena KD, Gerba CP.** “*Risk assessment of Pseudomonas aeruginosa in water*” **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, 201:71-115, 2009
- ✓ **Nazik Hasan,** Betigul Ongen, Zayre Erturan, Melek Salcioglu “*Genotype and Antibiotic Susceptibility Patterns of Pseudomonas aeruginosa and Stenotrophomonas maltophilia Isolated from Cystic Fibrosis Patients*” **Jpn. J. Infect. Dis.**, 60, 82-86, 2007
- ✓ **Orsi O. P., A. Mansi, P. Tomao, F. Chiarni, P. Visca** “*Lack of association between clinical and environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa in hospital wards*” **Journal of Hospital Infections**, Vol. 27, Issue 1, p. 49-60, May 1994
- ✓ **Pappa O.,** Mandilara G., Karagouni A., Vatopoulos A., Mavridou A. “*Typing of environmental strains of Pseudomonas aeruginosa by Serotyping and Random Amplified Polymorphic DNA*” Βιβλίο συνεδρίου 15th International Symposium on Health – Related Water Microbiology, Naxos, p. 79, Greece, 2009
- ✓ **Peix Alvaro,** Martha-Helena Ramirez-Bahena, Encarna Velazquez “*Historical evolution and current status of the taxonomy of genus Pseudomonas*” **Infection, Genetics and Evolution** 9 1132-1147, 2009
- ✓ **Pirnay Jean-Paul, Daniel De Vos, Christel Cochez, Florence Bilocq, Jean Pirson, Marc Struelens, Luc Duinslaeger, Pierre Cornelis, Martin Zizi, Alain Vanderkelen** “*Molecular Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa Colonization in a Burn Unit: Persistence of a Multidrug-Resistant Clone and a Silver Sulfadiazine-Resistant Clone*” **Journal of Clinical Microbiology**, Vol. 41, No.3, p. 1192-1202, March 2003

- ✓ **Rademaker L. W. Jan**, Hoste Bart, Frank J. Louws, Karel Kersters, Jean Swings, Luc Vauterin, Paul Vauterin and Frans J. de Bruijn “*Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: Xanthomonas as a model system*” **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 50:665-677, 2000
- ✓ **Renders Nicole**, Ute Romling, Henri Verbrugh, Alex Van Belkum “*Comparative Typing of Pseudomonas aeruginosa by Random Amplification of Polymorphic DNA or Pulsed-Field Gel Electrophoresis of DNA Macrorestriction Fragments*” **Journal of Clinical Microbiology**, Vol.34, No.12, p. 3190-3195, Dec. 1996
- ✓ **Richards Michael J.**, MBBS, FRACP, Jonathan R. Edwards, MS, David H. Culver, PhD, Robert P. Gaynes, MD, the National Nosocomial Infections Surveillance System “*Nosocomial Infections in combined Medical – Surgical Intensive Care Units in the United States*” **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Vol. 21, No. 8, August 2000
- ✓ **Sambrook**, Fritsch, Maniatis *Molecular Cloning, A laboratory manual*, Second edition, Chapter 6: Gel electrophoresis of DNA, 1989
- ✓ **Sazakli E.**, M. Leotsinidis, A. Vantarakis, M. Papapetropoulou “*Comparative typing of Pseudomonas species isolated from the aquatic environment in Greece by SDS-PAGE and RAPD analysis*” **Journal of Applied Microbiology**, 99, 1191-1203, 2005
- ✓ **Shrivastava Richa**, R.K. Upreti, S.R. Jain, K.N. Prasad, P.K. Seth, U.C. Chaturvedi “*Suboptimal chlorine treatment of drinking water leads to selection of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa*” **Exotoxicology and Environmental Safety**, Volume 58, Issue 2, 277-283, 2004
- ✓ **Soares Thereza A.**, T. P. Straatsma, Roberto D. Lins “*Influence of the B-band O-antigen chain in the structure and electrostatics of the lipopolysaccharide membrane of Pseudomonas aeruginosa*” **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol.19, No.2, 312-320, 2008
- ✓ **Speijer Han**, Paul H. M. Savelkoul Marc J. Bonten, Ellen E. Stobberingh, Jeroen H. T. Tjhie “*Application of Different Genotyping Methods for Pseudomonas aeruginosa in a setting of Endemicity in an Intensive Care Unit*” **Journal of Clinical Microbiology**, Vol. 37, No. 11, p. 3654-3661, Nov. 1999
- ✓ **Susanne Grobe**, Jost Wingender, Hans-Curt Flemming “*Capability of mucoid Pseudomonas aeruginosa to survive in chlorinated water*” **International Journal of Hygiene and Environmental Health** 204, 139-142, 2001
- ✓ **Tenover Fred C.**, Robert D. Arbeit, Richard V. Goering, Patricia A. Mickelsen, Barbara E. Murray, David H. Persing, and Bala Swaminathan “*Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed- Field Gel*

Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing” Journal of Clinical Microbiology, Vol.33, No.9, p. 2233-2239, Sept. 1995

- ✓ **Todar K.**, *Pseudomonas aeruginosa* . In: Todar’s Online Textbook of Bacteriology. <http://textbookofbacteriology.net>, 2008
- ✓ **Trautmann Matthias, MD**, Philipp M. Lepper, MD, and Mathias Haller, MD “*Ecology of Pseudomonas aeruginosa in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism*” **Am. J. Infection Control**, Vol. 33, No. 5, Supplement I, 2005
- ✓ **Trautmann Matthias**, Cindy Bauer, Christian Schumann, Philipp Hahn, Martin Hoher, Mathias Haller, Philipp M. Lepper “*Common RAPD pattern of Pseudomonas aeruginosa from patients and tap water in a medical intensive care unit*” **International Journal of Hygiene and Environmental Health** 209, 325-331, 2006
- ✓ **Trautmann Matthias, MD**, Simone Halder, MD, Josef Hoegel, PhD, Hilde Royer, RN, Mathias Haller, MD “*Point-of-use water filtration reduces endemic Pseudomonas aeruginosa infections on a surgical intensive care unit*” **Am J Infect Control**, 36: 421-9, 2008
- ✓ **De Vicente, J. C. Codina**, E. Martinez-Manzanares, M. Aviles, J. J. Borrego, P. Romero “*Serotypes and pyocin types of Pseudomonas aeruginosa isolated from natural waters*” *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 10, Issue 2, p. 77-80, Febr. 1990
- ✓ **Vogt R., D. Larue**, M. F. Parry, C. D. Brokopp, D. Klaucke, J. Allen “*Pseudomonas aeruginosa Skin Infections in Persons using a Whirlpool in Vermont*” **Journal of Clinical Microbiology**, Vol. 15, No.4, p. 571-574, Apr. 1982
- ✓ **Williams, J.G.K.**, Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., “*DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*”, **Nucleic Acids Research**, 18:6531-6535, 1990
- ✓ **Wilson T.**, Carson J. “*Rapid, high-throughput extraction of bacterial genomic DNA from selective enrichment culture media*” **Letters in Applied Microbiology**, 32:326-330, 2001
- ✓ **Yokota Shin-Ichi** “*Identification of outer membrane protein as target antigens of Pseudomonas aeruginosa Homma Serotype M*” **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 2:747-752, 1995
- ✓ **Marie Eliza Zamberlan da Silva**, Ivens Camargo Filho, Eliana Harue Endo, Celso Vataru Nakamura, Ta^nia Ueda-Nakamura, Benedito Prado Dias Filho “*Characterisation of potential virulence markers in Pseudomonas aeruginosa isolated from drinking water*” , **Antonie van Leeuwenhoek**, 93:323–334, 2008

- ✓ International Standard **ISO 16266:2006**
- ✓ International Standard **ISO 8199:2005** “Water quality- General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture”
- ✓ Oxoid Manual, 1998
- ✓ National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. **Am J Infect Control**, 32: 470-85, 2004
- ✓ www.medicalnewstoday.com
- ✓ <http://avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/project/archives/onions/rapd.html>
- ✓ www.ellinikietairia.gr/media/pdf/Gkikas.pdf
- ✓ [www. cdc.gov/ safewater/ publications_ pages/ chlorineresidual.pdf](http://www.cdc.gov/safewater/publications_pages/chlorineresidual.pdf)
- ✓ www.arvanitakis.com
- ✓ [www. Chemistry.upatras.gr](http://www.Chemistry.upatras.gr)
- ✓ [www.edye.gr/ seminaria/ apolymantika.htm](http://www.edye.gr/seminaria/apolymantika.htm)
- ✓ www.emlab.com
- ✓ www.cdc.gov
- ✓ www.hpa.org.com
- ✓ www.emedicine.medscape.com
- ✓ www.waterandhealth.org