



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* απομονωμένων από δείγματα κολυμβητικών δεξαμενών



ΦΟΙΤΗΤΗΣ:

ΣΙΑΚΑΜΠΕΝΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ (12097)

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ:

ΜΠΕΛΟΥΚΑΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ

ΔΙΟΛΗ ΧΡΥΣΟΥΛΑ

ΑΘΗΝΑ 2024



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF HEALTH AND CARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES
MEDICAL LABORATORIES SCIENCE DIVISION

**Molecular identification of *Pseudomonas aeruginosa* strains
isolated from swim tanks samples**



STUDENT:

SIAKAMPENIS DIMITRIOS (12097)

SUPERVISING PROFESSORS:

BELOUKAS APOSTOLOS

DIOLI CHRYSOULA

ATHENS 2024

ΜΕΛΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Απόστολος Μπελούκας

Χρυσάνθη Βογιατζάκη

Χρυσούλα Διολή

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Δημήτριος Σιακαμπένης του Αλεξάνδρου, με αριθμό μητρώου 12097, φοιτητής του Τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής (πρώην Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθηνών), δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του ιδρύματος. Παραβίαση της ανωτέρου ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για ανάκληση του πτυχίου μου».

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με τίτλο «Μοριακή ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* απομονωμένων από δείγματα κολυμβητικών δεξαμενών» εκπονήθηκε στο ερευνητικό Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσοβιολογίας (EMMA), του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών. Θερμές ευχαριστίες σε όλους όσους βοήθησαν στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Στον καθηγητή μου, Δρ. Μπελούκα Απόστολο, καθώς και στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής υπ. διδάκτωρ Διολή Χρυσούλα και στην Δρ. Βογιατζάκη Χρυσάνθη, εκφράζω τις ευχαριστίες μου τόσο για την εμπιστοσύνη τους όσο και για την ουσιαστική βοήθειά τους σε όλα τα στάδια της εργασίας, στο πειραματικό και στο συγγραφικό μέρος.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και τους Δρ. Παππά Όλγα, υπ. διδάκτωρ Κεφάλια Αναστασία και υπ. διδάκτωρ Δημητρίου Μάριο για την πολύτιμη συμβολή τους στη παρούσα πτυχιακή εργασία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αγάπη, τη στήριξη που μου παρείχαν κι τις πολύτιμες συμβουλές τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, όπως και σε κάθε βήμα μου.

Περίληψη

Η κολύμβηση και άλλες δραστηριότητες που λαμβάνουν χώρα σε νερά αναψυχής, όπως οι κολυμβητικές δεξαμενές, προσφέρουν ψυχική και σωματική υγεία. Ωστόσο, υπάρχουν και αρκετοί κίνδυνοι. Οι κολυμβητικές δεξαμενές αποτελούν πηγή ποικίλων παθογόνων μικροοργανισμών και σε ετήσια βάση καταγράφονται αρκετά περιστατικά λοιμώξεων που σχετίζονται με τη χρήση τους. Ένα από τα βακτήρια που εντοπίζεται συχνά σε αυτά τα περιβάλλοντα και ευθύνεται για πλήθος λοιμώξεων είναι η *Pseudomonas aeruginosa*. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) η *P. aeruginosa* προτείνεται ως δείκτης μικροβιολογικής ποιότητας των κολυμβητικών δεξαμενών ενώ κρίνεται σημαντική η μελέτη των μηχανισμών αντοχής της. Επομένως, σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η μοριακή ταυτοποίηση και ο έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά των στελεχών *P. aeruginosa* που ανακτήθηκαν από δείγματα νερού κολυμβητικών δεξαμενών. Δέκα οχτώ ύποπτα στελέχη *P. aeruginosa* που είχαν απομονωθεί από δείγματα νερού διαφόρων κολυμβητικών δεξαμενών και είχαν φυλαχθεί σε κατάλληλες συνθήκες στο αρχείο βιολογικών δειγμάτων του Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, υποβλήθηκαν α) σε ταυτοποίηση εφαρμόζοντας τη μοριακή μέθοδο της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου της 16S ριβοσωμικής υπομονάδας και β) σε έλεγχο μικροβιακής ευαισθησίας σε 11 ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ (Kirby Bauer). Τα αποτελέσματα της 16S PCR έδειξαν πως 15 από τα 18 (83%) στελέχη ανήκαν στο γένος *Pseudomonas* εκ των οποίων 9 (9/15, 60%) ανήκαν στο είδος *P. aeruginosa*. Τα υπόλοιπα τρία στελέχη αποκλείστηκαν από την μελέτη. Βάσει των επιδημιολογικών ορίων (EUCAST/ECOFF) 11 από τα 15 (73%) στελέχη *Pseudomonas* spp, συμπεριλαμβανομένων των *P. aeruginosa*, χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά. Από τα 11 ανθεκτικά στελέχη τα 5 (45%) εμφάνισαν συνδυαστική αντοχή σε κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς, μονοπακτάμες και καρβαπενέμες. Συμπερασματικά, η ανίχνευση στελεχών *P. aeruginosa* στα υπό μελέτη δείγματα νερού κολύμβησης είναι ανησυχητική, καθώς η παρουσία τους αποτελεί ένδειξη επιμόλυνσης των συγκεκριμένων υδάτων. Παράλληλα, η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών *P. aeruginosa* ακόμα και σε καρβαπενέμες, που είναι τα πιο ισχυρά αντιβιοτικά που διαθέτουμε μέχρι στιγμής, υπογραμμίζει τον κίνδυνο ανάπτυξης ανιάτων λοιμώξεων ειδικά για τους χρήστες κολυμβητικών δεξαμενών που ανήκουν σε ευπαθείς ομάδες.

Λέξεις Κλειδιά

Κολυμβητικές δεξαμενές, *Pseudomonas aeruginosa*, μοριακή ταυτοποίηση, αντιμικροβιακή αντοχή

Abstract

Swimming and other water-based activities that take place in swimming pools are fun and healthy ways to be physically active. However, there are potential risks involved. Swimming pools are a reservoir of various pathogenic microorganisms and on an annual basis several treated recreational water swimming-related illness outbreaks were reported. *Pseudomonas aeruginosa* is a common type of bacteria that can grow and multiply easily in swimming pools and is responsible for several infections. According to the World Health Organization (WHO), *P. aeruginosa* is recommended as an indicator of the microbiological quality of swimming pools water, while the examination of its resistance mechanisms is considered very important. The purpose of that thesis was a) to confirm the identity of suspected *P. aeruginosa* isolates, which were recovered from swimming pool water samples, using molecular methods, and b) to assess the antimicrobial resistance patterns of those isolates. Eighteen suspected *P. aeruginosa* isolates were collected from water samples of swimming pools water and analyzed by the Research Lab of the Department of Biomedical Sciences, University of West Attica. All isolates were subjected to molecular identification targeting the 16S ribosomal DNA (rDNA) gene and were tested for their antimicrobial susceptibility via by disk diffusion assays (Kirby-Bauer method) in 11 commonly used antibiotics. The results of 16S PCR showed that 15 of the 18 (83%) strains belonged to the genus *Pseudomonas* of which 9 (9/15, 60%) belonged to *P. aeruginosa* species, while the remaining three isolates were excluded from that study. According to ECOFF breakpoints and to other published guidelines (EUCAST/ECOFF) 11 out of 15 (73%) isolates of *Pseudomonas* spp, including *P. aeruginosa*, were characterized as resistant. Of the 11 resistant isolates, 5 (45%) presented combined resistance to 3rd generation cephalosporins, monobactams and carbapenems. The findings of this study indicate that *P. aeruginosa* strains in swimming pools can be resistant which creates a hazard especially for individuals at high risk for infections.

Key Words

Swimming pool, *Pseudomonas aeruginosa*, molecular identification, antimicrobial resistance

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη	II
Abstract.....	III
1. Θεωρητικό Μέρος	
Εισαγωγή	2
1.1 Χαρακτηριστικά της <i>P. aeruginosa</i>	3
1.1.α Βιοχημικά χαρακτηριστικά της <i>P. aeruginosa</i>	3
1.1.β Γενετικά χαρακτηριστικά της <i>P. aeruginosa</i>	5
1.1.γ Ανθεκτικότητα της <i>P. aeruginosa</i> στα αντιβιοτικά.....	6
1.1.δ Εντοπισμός της <i>P. aeruginosa</i>	8
1.1.ε Λοιμώδη νοσήματα που σχετίζονται με την <i>P. aeruginosa</i>	9
1.2 Κολυμβητικές δεξαμενές	10
1.2.α Ορισμός και κατηγορίες κολυμβητικών δεξαμενών	10
1.2.β Μικροβιολογικοί δείκτες και έλεγχος ποιότητας νερού κολυμβητικών δεξαμενών.....	11
1.2.γ Σημαντικά παθογόνα που εντοπίζονται στις κολυμβητικές δεξαμενές.....	13
2. Πειραματικό Μέρος: Υλικά & Μέθοδοι	15
Σκοπός.....	16
2. Υλικά και Μέθοδοι	17
2.1 Υλικά.....	17
2.2 Μέθοδοι.....	18
2.2.α Συλλογή δειγμάτων και στοιχεία των υπό μελέτη στελεχών	18
2.2.β Βιοχημική ταυτοποίηση	19
2.2.γ Απομόνωση ολικού DNA	20
2.2.δ Μοριακή ταυτοποίηση	20
2.2.ε Gel purification	22
2.2.στ Έλεγχος μικροβιακής ευαισθησίας στα αντιβιοτικά	22
3. Πειραματικό Μέρος: Αποτελέσματα.....	23
3. Αποτελέσματα	24
3.1 Βιοχημική ταυτοποίηση	24
3.2 Μοριακή ταυτοποίηση	25
3.3 Έλεγχος μικροβιακής ευαισθησίας στα αντιβιοτικά	27
4. Συζήτηση	31
Βιβλιογραφία	33

1. Θεωρητικό Μέρος

Εισαγωγή

Η αναψυχή έχει ουσιαστικό ρόλο στη ζωή των ανθρώπων και όταν επιλέγουν το μέσο ψυχαγωγίας τους τείνουν να το συνδυάσουν με το νερό. Ιδίως τα τελευταία χρόνια, η χρήση κολυμβητικών δεξαμενών για ψυχαγωγία, άθληση αλλά και για θεραπευτικούς σκοπούς και αποκατάσταση, προσελκύει ολοένα και περισσότερους ανθρώπους όλων των ηλικιών και όλων των ομάδων (ευπαθών και μη) [1, 2].

Στον αντίποδα, ωστόσο, των προσφερόμενων ωφελειών βρίσκονται οι μικροβιολογικοί κίνδυνοι που απειλούν τους χρήστες των κολυμβητικών δεξαμενών [3]. Σε αυτά τα περιβάλλοντα συχνά εντοπίζονται ευκαιριακά παθογόνοι ή/και παθογόνοι μικροοργανισμοί θέτοντας σε κίνδυνο την υγεία των ατόμων [3]. Ετησίως καταγράφονται πολυάριθμα περιστατικά ανάπτυξης λοιμώξεων και επιδημικές εκρήξεις που σχετίζονται με χρήση νερών αναψυχής, όπως οι πισίνες [3, 4].

Επομένως, η ποιότητα και η ασφάλεια του νερού των κολυμβητικών δεξαμενών είναι μέγιστης σημασίας για την δημόσια υγεία και για αυτό έχουν θεσπιστεί αυστηρές νομοθεσίες και έχουν σχεδιαστεί συγκεκριμένα πρωτοκολλά που αφορούν τον μικροβιολογικό και το χημικό έλεγχο των νερών αυτών [1, 5]. Αναφορικά με την ανάλυση της μικροβιολογικής ποιότητας των νερών αναψυχής διενεργείται με μικροοργανισμούς «δείκτες», δηλαδή αλλόχθονες μικροοργανισμούς, οι οποίοι προέρχονται είτε από τους ίδιους τους λουόμενους είτε από άλλες πηγές (πχ χώμα, αέρα, ζώα-πτηνά) και καταλήγουν στο υδάτινο σώμα [6].

Σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία, κατά τον μικροβιολογικό έλεγχο των κολυμβητικών δεξαμενών εξετάζεται ο συνολικός αριθμός α) κολοβακτηριοειδών (ενδεικτική παράμετρος), β) *Escherichia coli* (καθιερωμένος δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης) και γ) βακτηρίων ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (OMX, ένδειξη επιμόλυνσης) [5].

Ένα βακτήριο που απομονώνεται πολύ συχνά από το νερό και τις επιφάνειες των κολυμβητικών δεξαμενών είναι η *Pseudomonas aeruginosa*. Το βακτήριο αυτό μεταδίδεται μέσω της επαφής και κατανάλωσης μολυσμένου νερού, συνιστά ένδειξη πιθανής επιμόλυνσης και σχηματισμού βιομεμβρανών στο νερό. Η ικανότητα του να προσκολλάται σε επιφάνειες και να σχηματίζει βιομεμβράνες το καθιστά ανθεκτικό σε απολυμαντικές χημικές ουσίες συμπεριλαμβανομένου του χλωρίου [2, 3, 7, 8]. Επιπρόσθετα, η *P. aeruginosa* διαθέτει τόσο εγγενείς όσο και επίκτητους μηχανισμούς αντοχής στα αντιβιοτικά [2, 9, 10, 11]. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί πολυάριθμα περιστατικά λοιμώξεων σχετιζόμενων με χρήση κολυμβητικών δεξαμενών που οφείλονται σε πολυανθεκτικά στελέχη *P. aeruginosa*, θέτοντας έτσι σε ακόμα μεγαλύτερο κίνδυνο την υγεία των λουόμενων [2, 12].

Για όλους τους παραπάνω λόγους, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) προτείνει το βακτηριακό είδος *P. aeruginosa* να συμπεριληφθεί στους μικροοργανισμούς για τους οποίους είναι απαραίτητο να πραγματοποιείται έλεγχος κατά τη μικροβιολογική εξέταση δειγμάτων νερού από κολυμβητικές δεξαμενές [1]. Παρόλα αυτά, η συγκεκριμένη μικροβιολογική παράμετρος, δεν έχει ενταχθεί ακόμα στην αντίστοιχη ελληνική υγειονομική διάταξη.

1.1 Χαρακτηριστικά της *P. aeruginosa*

1.1.α Βιοχημικά χαρακτηριστικά της *P. aeruginosa*

Η *P. aeruginosa* είναι Gram-αρνητικό μη σπορογόνο, μη ελυτροφόρο βακτήριο μήκους 1.5-5 μm και διαμέτρου 0.5-1 μm, ικανό να κινείται χάρει στα πολικά μαστίγια που διαθέτει. Τα βακτήρια διατάσσονται ως μεμονωμένα κύτταρα, σε ζεύγη ή σε μικρές αλυσίδες. Πρόκειται για να ένα υποχρεωτικά αερόβιο βακτήριο, ωστόσο, υπό συνθήκες έλλειψης οξυγόνου δύναται να χρησιμοποιεί τα νιτρικά ως εναλλακτικό δέκτη ηλεκτρονίων [13, 14]. Οι μεταβολικές διαδικασίες της *P. aeruginosa* χαρακτηρίζονται από μεγάλη προσαρμοστικότητα με έχει χαμηλές διατροφικές απαιτήσεις, καθώς δεν απαιτούνται ιδιαίτεροι παράγοντες ανάπτυξης, ενώ μπορεί να αποικοδομήσει περισσότερα από εβδομήντα πέντε οργανικά συστατικά [13, 14, 15]. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης της είναι στους 37 °C. Εντούτοις, είναι το μόνο είδος του γένους που μπορεί να αναπτυχθεί και στους 42 °C. Επιπλέον έχει την ικανότητα να χρησιμοποιεί το ατμοσφαιρικό CO₂ ως μόνη πηγή άνθρακα και το αμμώνιο ως πηγή αζώτου [13, 14, 15]. Είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό βακτήριο σε διάφορες στρεσογόνες φυσικές συνθήκες συμπεριλαμβανομένης και της θερμοκρασίας ενώ παράλληλα εμφανίζει ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων και χρωστικών, σε ασθενή αντισηπτικά, αλλά και στα περισσότερα κοινά αντιβιοτικά [14, 15, 16]. Παράγει καταλάση και οξειδάση, δεν ζυμώνει τη λακτόζη ή άλλους υδατάνθρακες αλλά οξειδώνει τη γλυκόζη και την ξυλόζη [16]. Παράγει τη χρωστική πυοβερντίνη, η οποία φθορίζει κάτω από υπεριώδες φως και τη χαρακτηριστική κυανή υδατοδιαλυτή χρωστική πυοκυανίνη [13, 14, 15]. Οι αποικίες του βακτηρίου *P. aeruginosa* σε στερεά θρεπτικά υλικά είναι συνήθως βλενωδείς με χαρακτηριστικό μπλε-πράσινο χρώμα, λόγω της πυοκυανίνης, και αναδύουν ευχάριστη οσμή «γιασεμιού». Τα χαρακτηριστικά που προαναφέρθηκαν σε συνδυασμό με άλλες βιοχημικές δοκιμασίες (Πίνακας 1.1) συμβάλλουν στην ταυτοποίηση και στην διαφοροποίηση της *P. aeruginosa* από άλλα βακτήρια του γένους [13, 14, 15, 16].

Πίνακας 1.1 Βιοχημικά Χαρακτηριστικά του βακτηρίου P. aeruginosa [16]

Βιοχημικές δοκιμασίες	<i>P. aeruginosa</i>
Καταλάση	Θετική (+)
Οξειδάση	Θετική (+)
Κιτρικά	Θετική (+)
Ουρεάση	Αρνητική (-)
Παραγωγή H ₂ S	Αρνητική (-)
Κινητικότητα	Θετική (+)
Αναγωγή Νιτρικών	Θετική (+)
Παραγωγή Χρώσης	Θετική (+) (Πράσινó/μπλε)
Παραγωγή Ινδόλης	Αρνητική (-)
Κετριμίδη	Θετική (+)
Ζύμωση Γλυκόζης	Θετική (+)
Ζύμωση Λακτόζης	Αρνητική (-)
Αξιοποίηση ακεταμιδίου	Θετική (+)

1.1.β Γενετικά χαρακτηριστικά της *P. aeruginosa*

Η γενετική ποικιλομορφία του βακτηρίου *P. aeruginosa* αντανακλά την μεταβολική της ευελιξία. Το γονιδίωμα της *P. aeruginosa* είναι πολύ μεγάλο, περίπου 6,3 Mbp (περιεκτικότητα G + C 66,6%), και κωδικοποιεί 5700 γονίδια [16, 17]. Εκτιμάται ότι 150 από τα γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης που σχετίζονται με την προσκόλληση, την κίνηση, την αντοχή στα αντιβιοτικά και την παραγωγή λοιμογόνων παραγόντων (Εικόνα 1.1). Το γονιδίωμα της ταξινομείται στο γονιδίωμα του πυρήνα (core genome) και στο βοηθητικό γονιδίωμα (accessory genome) [17].

Το γονιδίωμα του πυρήνα ορίζεται ως η γενετική περιοχή που είναι κοινή για όλα σχεδόν τα στελέχη του είδους *P. aeruginosa*. Αυτή η περιοχή αντιπροσωπεύει περίπου το 90% του συνολικού γονιδιώματος της *P. aeruginosa*, εμφανίζει χαμηλά επίπεδα γενετικής ποικιλομορφίας (0,5–0,7%), φέρει την πλειονότητα των γονιδίων των βασικών μεταβολικών λειτουργιών (housekeeping genes) και είναι συντηρημένη (δηλαδή μεταλλάσσεται με πολύ αργούς ρυθμούς) [17].

Το βοηθητικό γονιδίωμα της *P. aeruginosa* αποτελείται από μη συντηρημένες, αλληλουχίες DNA μεταβλητού μήκους, που εντοπίζονται κυρίως σε εξωχρωμοσωμικά στοιχεία. Αυτά τα τμήματα DNA δεν κατανέμονται διάσπαρτα αλλά έχουν την τάση να συγκεντρώνονται σε ορισμένους γενετικούς τόπους, που αναφέρονται ως γονιδιωματικές νησίδες (genomic islands) [17]. Αυτό το τμήμα του γονιδιώματος σχετίζεται με τη παθογονικότητα και με την αντοχή στα αντιβιοτικά, καθώς φιλοξενεί γονίδια που κωδικοποιούν λοιμογόνους παράγοντες και γονίδια αντοχής, αντίστοιχα. Οι εγγενείς μηχανισμοί αντοχής στα αντιβιοτικά, όπως τα γονίδια που εκφράζουν αντλίες εκροής και ένζυμα β-λακταμασών, βρίσκονται στο γονιδίωμα του πυρήνα. Ωστόσο, τα επίκτητα γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά υπάρχουν στο βοηθητικό γονιδίωμα [17].

Προϊόν	Εντόπιση	Μηχανισμός δράσης	Πιθανή συμβολή στην παθογονικότητα
Ινίδια	Πολικά	Προσκόλληση	Σχηματισμός βιομεμβράνης
Μαστίγιο	Πολικά	Κινητικότητα	Εξάπλωση και έναρξη φυσικής ανοσολογικής απόκρισης
Σιδηροφόρα (πυοβερντίνη και πυοχελίνη)	Εκκρινόμενα	Σιδηροδεσμευτικές πρωτεΐνες	Πρόσληψη σιδήρου
Πυοκυανίνη	Εκκρινόμενη	Δημιουργεί ρίζες ενεργού οξυγόνου	Βλάβη στους ιστούς
Εξωτοξίνη Α	Εκκρινόμενη	ADP-ριβοζυλίωση του παράγοντα επιμήκυνσης EF-2	Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης κυττάρων-ξενιστών
Εξωένζυμα: ExoS, ExoU, ExoT, ExoY	Εκκρινόμενα από εκκριτικό σύστημα τύπου III	Αλληλεπίδραση με τα συστατικά του κυτταροσκελετού του κυττάρου-ξενιστή	Κυτταροτοξικότητα, βλάβη στους ιστούς, αποφυγή φαγοκυτταρικής δράσης
Ελαστάση	Εκκρινόμενη	Πρωτεόλυση πρωτεϊνών όπως ελαστίνης, κολλαγόνου, ανοσοσφαιρινών, συστατικών του συμπληρώματος	Βλάβη στους ιστούς
Πρωτεάσες	Εκκρινόμενες	Πρωτεόλυση	Βλάβη στους ιστούς
Φωσφολιπάσες	Εκκρινόμενες	Υδρόλυση των φωσφολιπιδίων, ειδικά σε ευκαρυωτικές μεμβράνες	Βλάβη στους ιστούς
Ραμνολιπίδια	Εκκρινόμενα	Επιφανειοδραστική ουσία	Αιμολυσίνη, διάσπαση βιομεμβρανών (βιοϋμενίων)
Αλγινικό οξύ	Συνδέεται με το κυτταρικό τοίχωμα	Προσκόλληση, προστασία από αφυδάτωση και αποφυγή ανοσοποιητικού	Σχηματισμός βιομεμβράνης (βιοϋμενίου) Αποφυγή φαγοκυττάρωσης
Άλλοι πολυσακχαρίτες	Συνδέονται με το κυτταρικό τοίχωμα	Προσκόλληση	Σχηματισμός βιομεμβράνης
Λιποπολυσακχαρίτης (ΛΠΣ)	Εξωτερική μεμβράνη	Το λιπίδιο Α είναι ενδοτοξικό, ο πυρήνας του ΛΠΣ αντιδρά με τον CFTR· το αντιγόνο Ο προστατεύει από το βακτηριοκτόνο σύστημα του ορού	Σήψη, εσωτερίκευση, αντοχή στο βακτηριοκτόνο σύστημα του ορού

Εικόνα 1.1 Σημαντικοί λοιμογόνοι παράγοντες της *Pseudomonas aeruginosa* [26]

1.1.γ Ανθεκτικότητα της *P. aeruginosa* στα αντιβιοτικά

Το βακτήριο *P. aeruginosa* εμφανίζει εγγενή (φυσική) αντοχή σε μια ποικιλία αντιβιοτικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων της αμικιλίνης, της αμοξικιλίνης, των κεφαλοσπορινών 1ης και 2^{ης} γενιάς, των κινολονών 1ης γενιάς (όπως το ναλιδιξικό οξύ), της χλωραμφενικόλης, των μακρολιδών και της τριμεθοπρίμης. Η εγγενής αντοχή που παρουσιάζει σχετίζεται με γενετικά χαρακτηριστικά που εδράζονται στο βασικό βακτηριακό χρωμόσωμα και είναι κοινή σε όλα τα στελέχη του είδους. Η εγγενής αντοχή της *P. aeruginosa* οφείλεται σε τρεις βασικούς μηχανισμούς [18, 19]:

α) Στην μειωμένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Η διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης της *P. aeruginosa* είναι εξαιρετικά χαμηλή, περίπου 12 έως 100 φορές χαμηλότερη από αυτή του *E. coli* [18, 20, 21].

β) Στην έκφραση αντλιών εκροής, που απομακρύνουν τα αντιβιοτικά εκτός του κυττάρου, όπως για παράδειγμα η αντλία εκροής τύπου MexAB-OpzM που ευθύνεται για την αποβολή των β-λακταμικών αντιβιοτικών και των κινολονών [18, 19, 20].

γ) Στην παραγωγή ενζύμων, που εκφράζονται από χρωμοσωμικά γονίδια, τα οποία αποδομούν κάποιες κατηγορίες αντιβιοτικών. Παράδειγμα αποτελούν οι χρωμοσωμικές β-λακταμάσες τύπου AmpC που υδρολύουν β-λακταμικά αντιβιοτικά, όπως τις βενζυλοπενικιλίνες και τις στενού φάσματος κεφαλοσπορίνες [18, 19, 20].

Η *P. aeruginosa*, εκτός από τη φυσική αντοχή, που είναι γνωστή και προκαθορισμένη, συχνά παρουσιάζει ανθεκτικότητα και σε επιπλέον κατηγορίες αντιβιοτικών, όπως σε 3ης και 4ης γενιάς κεφαλοσπορίνες, μονομπακτάμες, καρβαπενέμες και φθουοροκινολόνες. Αυτό οφείλεται σε επίκτητους μηχανισμούς αντοχής. Η επίκτητη αντοχή του βακτηρίου *P. aeruginosa* συμβαίνει είτε μέσω μεταλλάξεων προυπάρχοντων γονιδίων ή/ και ρυθμιστικών στοιχείων είτε μέσω της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων αντοχής [18, 19, 20,21].

Χαρακτηριστικά παραδείγματα επίκτητων μηχανισμών αντοχής που σχετίζονται με μεταλλάξεις που επηρεάζουν υπάρχοντα γενετικά στοιχεία είναι:

α) Η απώλεια ή η μειωμένη έκφραση του γονιδίου της πορίνης OprD, που συνδέεται με υψηλά επίπεδα αντοχής στις καρβαπενέμες [18, 19, 20,21].

β) Η υπερέκφραση των γονιδίων αντλιών εκροής, γεγονός που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα αντοχής σε αμινογλυκοσίδες, β-λακτάμες και φθουοροκινολόνες [18, 19, 20,21].

Όπως προαναφέρθηκε, η επίκτητη αντοχή μπορεί να οφείλεται και στην οριζόντια μεταφορά κινητών γενετικών στοιχείων, όπως τα πλασμίδια, τα οποία φέρουν γονίδια αντοχής. Παραδείγματα τέτοιων πλασμιδιακών γονιδίων, που εντοπίζονται συχνά σε στελέχη *P. aeruginosa*, είναι αυτά που εκφράζουν για ένζυμα: α) εκτεταμένου φάσματος β-λακταμασών (extended-spectrum β-lactamase, ESBL), που καταστρέφουν τις κεφαλοσπορίνες ευρέως φάσματος και τις μονοβακτάμες, και β) καρβαπενεμασών, που υδρολύουν σχεδόν όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών. Επιπρόσθετα, πολύ συχνά απομονώνονται στελέχη που διαθέτουν συνδυασμό επίκτητων μηχανισμών, γεγονός που αυξάνει ακόμα περισσότερο τα επίπεδα ανθεκτικότητας [18, 19].

Ένας τρίτος μηχανισμός αντοχής της *P. aeruginosa* στα αντιβιοτικά είναι αυτός που μεσολαβεί από τον σχηματισμό βιοϋμενίων (biofilm-mediated resistance). Τα βιοϋμένια είναι κοινότητες βακτηρίων προσκολλημένων σε επιφάνειες που περιβάλλονται από μια αυτοπαραγόμενη εξωκυττάρια ουσία και χαρακτηρίζονται από αντοχή σε διάφορα αντισηπτικά και αντιμικροβιακά φάρμακα. Γενικά, τα βακτήρια ενός ώριμου βιοϋμενίου είναι ανθεκτικά στις συγκεντρώσεις αντιβιοτικών 10 – 1.000 φορές περισσότερο από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις που απαιτούνται για την καταστροφή των πλανκτονικών (ελεύθερων) βακτηρίων [18, 19, 21]. Μέσα από έρευνες που μελετούν μοντέλα βιοϋμενίων της *Pseudomonas*, έχει διαπιστωθεί ότι ένα ποσοστό των κυττάρων του βιοφιλμ παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση και δεν επηρεάζεται από την παρουσία αντιβιοτικών [21].

Αυτό οφείλεται στη χαμηλή μεταβολική τους δραστηριότητα. Με τη μείωση των επιπέδων των αντιβιοτικών, τα ανθεκτικά αυτά κύτταρα ενεργοποιούνται, πολλαπλασιάζονται και επανασχηματίζουν την εξοκυτάρια ουσία/μεμβράνη. Επιπρόσθετα, τα βακτήρια *P. aeruginosa* κατά τη διάρκεια του σχηματισμού βιοφίλμ μεταβάλλουν την έκφραση κάποιων γονιδίων τους ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Παράδειγμα αποτελεί η υπερέκφραση του γονιδίου *tssC1* που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα της *P. aeruginosa* σε αντιβιοτικά όπως τομπραμυκίνη, γενταμικίνη και σιπροφλοξασίνη [18, 19, 20, 21].

Συμπερασματικά, οι φυσικοί αλλά και οι επίκτητοι μηχανισμοί ανοχής (που μπορεί να αποκτήσει) της *P. aeruginosa* σε συνδυασμό με την ικανότητα της να σχηματίζει βιοϋμένια, την καθιστούν πολυανθεκτική γεγονός που δυσχεραίνει την αντιμετώπιση της [19].

1.1.δ Εντοπισμός της *P. aeruginosa*

Η *P. aeruginosa* είναι ένα βακτήριο που απαντάται σε ποικίλα περιβαλλοντικά ενδιαιτήματα γεγονός που οφείλεται στις ελάχιστες διατροφικές απαιτήσεις και στην ικανότητά του να επιβιώνει κάτω από ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες [9, 13, 14]. Στη φύση ζει ως ελεύθερο, μονοκύτταρο βακτήριο είτε υπό μορφή βιοϋμενίων, τα οποία σχηματίζονται σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με το νερό. Βρίσκεται σε αφθονία στο χώμα, σε φυσικά νερά (όπως λίμνες, ποτάμια, θάλασσα), στα λύματα, στα φυτά και στα ζώα, ωστόσο προτιμά περισσότερο τα περιβάλλοντα με υψηλά ποσοστά υγρασίας [9, 14].

Η *P. aeruginosa* συχνά απομονώνεται από το νερό, τις επιφάνειες και τα φίλτρα των κολυμβητικών δεξαμενών και των spa (υδρομασάζ), όπου μπορεί να συσσωρευτεί υπό μορφή βιοϋμενίων, καθιστώντας τις παραδοσιακές τεχνικές απολύμανσης μη αποτελεσματικές [9, 13, 14, 15, 22, 23]. Η εμφάνισή της στο πόσιμο νερό είναι πιο σπάνια και κυρίως σχετίζεται με την ικανότητά αποικισμού και δημιουργίας βιομεμβρανών στις υδραυλικές εγκαταστάσεις (όπως βρύσες, ντουζιέρες, κτλ). Ακόμα μπορεί να εντοπιστεί σε απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό κάτι που αποτελεί απόδειξη των χαμηλών διατροφικών απαιτήσεων της [13, 14, 15, 22, 23].

Παρόλο που η *P. aeruginosa* δεν ανήκει στη φυσιολογική χλωρίδα του δέρματος και της ρινικής κοιλότητας του ανθρώπου, ενίοτε αποικίζει το δέρμα, το έξω αυτί, την άνω αναπνευστική οδό και το παχύ έντερο υγιών φορέων. Για αυτό η ανίχνευση της σε δείγματα κοπράνων ή στον ρινοφάρυγγα και στο δέρμα δεν είναι καθόλου σπάνια [22, 23, 24].

Επιπρόσθετα, εκτός από το περιβάλλον η *P. aeruginosa* ανευρίσκεται συνεχώς και στο ενδονοσοκομειακό χώρο. Μπορεί να απομονωθεί από διάφορες πηγές εντός του νοσοκομείου όπως σε αντσηπτικά, απολυμαντικά, σαπούνια και διαλύματα καθαρισμού χώρων, κολλύρια, νεροχύτες, ιατρικό εξοπλισμό (συσκευές αιμοδιάλυσης, ενδοσκοπία, αναπνευστήρες), οι οποίες λειτουργούν ως εστίες μόλυνσης από το βακτήριο [15, 22, 23, 24].

1.1.ε Λοιμώδη νοσήματα που σχετίζονται με την *P. aeruginosa*

Το βακτήριο *P. aeruginosa* είναι ένας ευκαιριακά παθογόνος μικροοργανισμός, που δύναται να προκαλέσει θανατηφόρες λοιμώξεις σε άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, σε ασθενείς με σοβαρά εγκαύματα και δερματικές βλάβες καθώς και σε ασθενείς που πάσχουν από κυστική ίνωση [9, 13, 22, 25].

Η πλειοψηφία των λοιμώξεων από *P. aeruginosa* είναι ενδονοσοκομειακές και περιλαμβάνουν: α) λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού, που σχετίζονται κυρίως με τη χρήση μολυσμένων αναπνευστήρων και μπορεί να εξελιχθούν σε νεκρωτική πνευμονία, β) λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, που παρατηρούνται κυρίως σε ασθενείς με ουροκαθετήρα, γ) λοιμώξεις του κυκλοφορικού συστήματος που μπορεί να οδηγήσουν σε θανατηφόρο σηψαιμία, δ) μηνιγγίτιδα όταν εισαχθεί ιατρογενώς στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό κατά την οσφυονωτιαία παρακέντηση, ε) δερματικές λοιμώξεις στα σημεία εγκαυμάτων και χειρουργικών τραυμάτων [26, 27, 28]. Οι νοσηλεύόμενοι ασθενείς μπορεί να προσβληθούν από το βακτήριο είτε κατά την εισαγωγή τους ή κατά τη διάρκεια παραμονής τους στο νοσοκομείο [13, 25, 26, 28].

Ωστόσο, λοιμώξεις από *P. aeruginosa* καταγράφονται και στην κοινότητα, οι οποίες συχνά σχετίζονται με χρήση νερών αναψυχής, συμπεριλαμβανομένων των κολυμβητικών δεξαμενών και των δεξαμενών υδρομάλαξης [9, 13, 25, 26, 27]. Οι λοιμώξεις από *P. aeruginosa* που συνδέονται με χρήση κολυμβητικών δεξαμενών περιλαμβάνουν α) θυλακίτιδα και ανάπτυξη φλυκταινώδους εξανθήματος β) ωτίτιδες, όπως η ήπια εξωτερική ωτίτιδα των κολυμβητών που μπορεί να οδηγήσει σε κακοήθη εξωτερική ωτίτιδα σε διαβητικούς ασθενείς, γ) μολύνσεις των ποδιών και το σύνδρομο του πράσινου νυχιού, δ) λοιμώξεις των οφθαλμών, που μπορεί να εξελιχθεί σε έλκος κερατοειδούς [23, 25, 26, 27, 28].

1.2 Κολυμβητικές δεξαμενές

1.2.α Ορισμός και κατηγορίες κολυμβητικών δεξαμενών

Σύμφωνα με την Υπουργική απόφαση: **Γ1/443/1973 (ΦΕΚ 87/Β/24-1-73)** «Περί κολυμβητικών δεξαμενών μετά οδηγίων κατασκευής και λειτουργίας αυτών», ως κολυμβητική δεξαμενή ή κολυμβητήριο καλείται κάθε μερικώς ή πλήρως τεχνητή δεξαμενή η οποία τροφοδοτείται από νερό κατάλληλης πηγής υδροληψίας που πληροί τα πρότυπα ποιότητας και η οποία χρησιμοποιείται για ομαδική κολύμβηση και αναψυχή.

Οι κολυμβητικές δεξαμενές χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τη χρήση και την ποιότητα του νερού, όπως:

1. Κολυμβητική δεξαμενή δημόσιας χρήσης καλείται η δεξαμενή που χρησιμοποιείται από το κοινό ή από ομάδες πληθυσμού όπως μέλη συλλόγων, μέλη εκπαιδευτικών ιδρυμάτων, ενοίκους ξενοδοχείων, ενοίκους πολυκατοικίας κτλ., ανεξαρτήτως ιδιοκτησίας.
2. Αθλητική κολυμβητική δεξαμενή καλείται η δεξαμενή η οποία χρησιμοποιείται κυρίως από αθλητικά σωματεία για προπόνηση και αγωνίσματα.
3. Εσωτερική κολυμβητική δεξαμενή καλείται η δεξαμενή η οποία βρίσκεται σε κλειστό στεγασμένο χώρο.
4. Εξωτερική κολυμβητική δεξαμενή ή υπαίθρια καλείται η δεξαμενή η οποία βρίσκεται σε υπαίθριο περιφραγμένο χώρο.
5. Ιδιωτική κολυμβητική δεξαμενή καλείται η δεξαμενή που χρησιμοποιείται αποκλειστικά από τα μέλη μιας οικογένειας και συγγενείς ή φιλικά πρόσωπά τους.

Επιπροσθέτως, βάσει της παραγράφου 1 του Άρθρου 46 του νόμου **Ν. 4688/2020 (ΦΕΚ 101/Α/24 5-2020)** «Ειδικές μορφές τουρισμού, διατάξεις για την τουριστική ανάπτυξη και άλλες διατάξεις», στην έννοια των κολυμβητικών δεξαμενών περιλαμβάνονται επίσης και οι δεξαμενές υδρομάλαξης ή/και μηχανισμού παραγωγής κυμάτων (όπως spa, whirlpool spas, jacuzzis) όπου ο χρήστης παραμένει αδρανής και επιδρά επάνω τους το υπό πίεση νερό και οι φυσαλίδες αέρα.

1.2.β Μικροβιολογικοί δείκτες και έλεγχος ποιότητας νερού κολυμβητικών δεξαμενών

Ο σκοπός των μικροβιολογικών αναλύσεων του νερού είναι η ανίχνευση και η ταυτοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών που μπορεί να περιέχει. Η μικροβιολογική ποιότητα του νερού και η επακόλουθη μετάδοση υδατογενών νοσημάτων προσδιορίζεται με τη χρήση μικροοργανισμών «δεικτών» [1]. Οι μικροβιολογικοί δείκτες είναι αλλόχθονες μικροοργανισμοί, συνήθως κοπρανώδους προέλευσης, που εντοπίζονται προσωρινά στο νερό [2, 5, 6]. Η παρουσία των δεικτών σε πισίνες ή δεξαμενές υδρομάλαξης αποτελεί ένδειξη πιθανής αναποτελεσματικής απολύμανσης, ανεπαρκούς ανανέωσης του νερού και κακής συντήρησης των εγκαταστάσεων [1, 2, 5, 6].

Οι πιο κοινοί μικροβιακοί δείκτες που χρησιμοποιούνται είναι τα ολικά κολοβακτηριοειδή, τα κολοβακτηρίδια κοπρανώδους προέλευσης (*Escherichia coli*), οι εντερόκοκκοι/στρεπτόκοκκοι, η *P. aeruginosa*, τα θειαναγωγικά κλωστρίδια (*Clostridium perfringens*) και η ολική μεσόφιλη χλωρίδα [1, 5]. Η ολική μεσόφιλη χλωρίδα και τα ολικά κολοβακτηριοειδή αποτελούν ενδεικτική παράμετρο και καταδεικνύουν την ικανότητα της διαδικασίας χλωρίωσης του νερού, ενώ το *E. coli* και οι εντερόκοκκοι λειτουργούν ως δείκτες πρόσφατης και παλαιάς κοπρανώδους μόλυνσης του νερού, αντίστοιχα [1, 5].

Εκτός από τις κατηγορίες που αναφέρονται παραπάνω, ο ΠΟΥ συνιστά να ελέγχονται και άλλα βακτηριακά είδη, όπως ο *Staphylococcus aureus* και η *P. aeruginosa* [1]. Η *P. aeruginosa* είναι ένα παθογόνο που μεταδίδεται μέσω της επαφής και κατανάλωσης μολυσμένου νερού, και υποδεικνύει την πιθανή ανάπτυξη μικροβιακών αποικιών και τον σχηματισμό βιομεμβρανών στο νερό [9]. Ο *S. aureus* είναι ευκαιριακό παθογόνο και δείκτης ανθρωπογενούς μόλυνσης των υδάτων [1, 5].

Μια σημαντική διαφορά μεταξύ των κατευθυντηρίων οδηγιών του ΠΟΥ σχετικά με τον μικροβιολογικό έλεγχο δειγμάτων νερού των κολυμβητικών δεξαμενών και της αντίστοιχης ελληνικής νομοθεσίας (Εικόνα 1.2), είναι ότι ο ΠΟΥ δεν απαιτεί μετρήσεις για τα ολικά κολοβακτηριοειδή, αλλά μετρήσεις για την *P. aeruginosa* (<1 cfu/100 ml), την *Legionella* spp. (<1 cfu/100 ml) και τον *S. aureus* (<100 cfu/100 ml) [1].

Εντούτοις, στην ελληνική νομοθεσία, οι μικροβιολογικοί έλεγχοι για *Legionella* spp. και *P. aeruginosa* διεξάγονται κατά την ανάλυση δειγμάτων νερού από θερμαινόμενες δεξαμενές υδρομάλαξης.

Parameter	Highest Acceptable Value (cfu)	
	Greek Legislation	WHO Guidelines
Total Viable Count at 37°C	<200 per ml	<200 per ml
Total Coliforms	<15 per 100ml	Thermotolerant coliforms <1 per 100ml
<i>E.coli</i>	0/100ml	<1 per 100ml
<i>Staphylococcus spp.</i>	Not required	<i>S.aereus</i> for investigation <100 per 100ml
<i>P.aeruginosa</i>	Not required	<1 per 100ml (hot tubs)
<i>Legionella spp.</i>	<1 per 100ml (for hot tubs)	<1 per 100ml (for hot tubs)

Εικόνα 1.2 Οι διαφορές μεταξύ των κατευθυντηρίων οδηγιών του ΠΟΥ και της αντίστοιχης ελληνικής νομοθεσίας σχετικά με τις μικροβιολογικές παραμέτρους που ελέγχονται κατά την ανάλυση της ποιότητας του νερού των κολυμβητικών δεξαμενών

1.2.γ Σημαντικά παθογόνα που εντοπίζονται στις κολυμβητικές δεξαμενές

Οι κολυμβητικές δεξαμενές είναι χώροι άθλησης, αναψυχής, χαλάρωσης και κοινωνικοποίησης ωστόσο, η χρήση τους μπορεί να εκθέσει τους κολυμβητές σε διάφορους φυσικούς, χημικούς και μικροβιολογικούς κινδύνους [29].

Το νερό των κολυμβητικών δεξαμενών μπορεί να επιμολυνθεί από βακτήρια, ιούς, μύκητες και παράσιτα. Ως βασική πηγή μόλυνσης μιας πισίνας θεωρείται η κοπρανώδης μόλυνση του νερού, λόγω της ακούσιας απελευθέρωσης υπολειμμάτων κοπράνων που μπορεί να παραμένουν στο δέρμα των κολυμβητών [1, 2, 3, 29]. Άλλη μία πιθανή πηγή παθογόνων μικροοργανισμών αποτελεί και η μη κοπρανώδης αποβολή από τον άνθρωπο, όπου η μόλυνση πραγματοποιείται από εκκρίσεις και στερεές ουσίες (όπως ούρα, βλέννα, σάλιο και ιδρώτας) [1, 2, 3, 29, 30]. Γενικά, από το δέρμα του κάθε κολυμβητή, κατά τη διάρκεια της καταβύθισης του στο νερό, απελευθερώνονται περίπου 2×10^8 μικροοργανισμοί, εκ των οποίων οι περισσότεροι είναι βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*. Ειδικά, στην περίπτωση των εξωτερικών κολυμβητικών δεξαμενών, μια άλλη πιθανή πηγή μόλυνσης από παθογόνα που προέρχονται είναι τα μολυσμένα ζώα (πτηνά, τρωκτικά, κατοικίδια), τα οποία μπορούν να έχουν πρόσβαση στη πισίνα ή στον περιβάλλοντα χώρο [1, 2, 3, 29, 30, 31]. Τέλος, η ανίχνευση μικροβίων στο νερό των κολυμβητικών δεξαμενών συχνά οφείλεται και στη πηγή προέλευσης του νερού ή στην ανεπαρκή χλωρίωση του, στην επιμόλυνση του νερού παροχής ή του αέρα για τις πισίνες κλειστού τύπου [1, 2, 3, 29, 30, 31]. Στα υδατογενή νοσήματα που απειλούν την υγεία των κολυμβητών συγκαταλέγονται οι λοιμώξεις του αναπνευστικού και του γαστρεντερικού συστήματος (ήπιες έως απειλητικές για τη ζωή του ατόμου), λοιμώξεις των οφθαλμών, των αυτιών και του δέρματος, γενικευμένες λοιμώξεις και ηπατίτιδες Α και Ε. Τα πιο κοινά συμπτώματα που εκδηλώνονται στους χρήστες κολυμβητικών δεξαμενών είναι ο πυρετός, η διάρροια, η ναυτία, ο εμετός, τα δερματικά εξανθήματα, ο άλγος στα αυτιά και στα μάτια, ο βήχας και αναπνευστικά προβλήματα [1, 3, 29, 30, 31].

Στα κυριότερα παθογόνα κοπρανώδους προέλευσης ανήκουν:

α) Τα βακτήρια *E. coli* O157:H7 και *Shigella* spp (όπως *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*) που προκαλούν εντερίτιδες, δυσεντερίες και αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS), λόγω της τοξίνης Shiga που παράγουν [1, 2, 3, 32].

β) Τα πρωτόζωα *Cryptosporidium* (κυρίως τα είδη *C. hominis* και *C. parvum*) και *Giardia lamblia* τα οποία αποτελούν τις κυριότερες αιτίες διαρροϊκών ασθενειών που σχετίζονται με μολυσμένα ύδατα αναψυχής και πόσιμα ύδατα [1, 2, 3, 29, 30, 33]

γ) Ο Ανθρώπινος Αδενοϊός (HAdV), οι Νοροϊοί, οι Εντεροϊοί και ο ιός της ηπατίτιδας Α [1, 29, 33, 34].

Στα κυριότερα παθογόνα μη κοπρανώδους προέλευσης περιλαμβάνονται:

α) Το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* που αναφέρεται ως η βασική αιτία πρόκλησης εξανθήματος στα υδρομασάζ (Hot tub rash, Hot-foot syndrome) και εξωτερικής ωτίτιδας (γνωστό και ως αντί του

κολυμβητή, swimmer's ear) σε τεχνητές υδάτινες δεξαμενές, καθώς συσσωρεύεται υπό την μορφή βιοφίλμ [1, 2, 3, 9, 29, 30].

β) Το βακτήριο *Legionella* spp., το οποίο απαντάται σε οποιαδήποτε υδάτινη πηγή, συμπεριλαμβανομένων των υδάτινων δεξαμενών spa, jacuzzi, πισίνες φυσικοθεραπείας, και συστήματα ύδρευσης ζεστού και κρύου νερού. Η λοίμωξη από λεγεωνέλλες μπορεί να εκδηλωθεί με δύο κλινικές μορφές, τη Νόσο των λεγεωναρίων (οξεία βακτηριακή λοίμωξη του αναπνευστικού και εκδηλώνεται με τη μορφή βαριάς και θανατηφόρου πνευμονίας) και Πυρετός Pontiac [1, 2, 3, 29, 33].

γ) Το βακτήριο *S. aureus*, το οποίο μπορεί να ανευρεθεί σε νερά κολυμβητικών δεξαμενών, καθώς απελευθερώνεται από τους κολυμβητές και μολύνει τα επιφανειακά φιλμ του νερού της πισίνας [1, 2, 3, 33].

δ) Τα πρωτόζωα *Naegleria fowleri* και *Acanthamoeba* τα οποία έχει αποδειχθεί ότι ανευρίσκονται και σε νερά αναψυχής όπως οι πισίνες που υπολείπονται χλωρίωσης ή δεν συντηρούνται σωστά. Η *Naegleria* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της πρωτοπαθούς αμοιβαδικής μηνιγγοεγκεφαλίτιδας, η οποία μπορεί να εξελιχθεί σε θανατηφόρο λοίμωξη. Η *Acanthamoeba* (κυρίως τα είδη *A. castellanii*, η *A. astronyxis*, η *A. culbertsoni*, η *A. polyphaga* και η *A. rhysodes*) ευθύνονται για κερατίτιδα του οφθαλμού και κοκκιωματώδη αμοιβαδική εγκεφαλίτιδα [1, 2, 3, 33].

2. Πειραματικό Μέρος

Υλικά & Μέθοδοι

Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η βιοχημική και μοριακή ταυτοποίηση, καθώς και ο έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά των περιβαλλοντικών στελεχών *P. aeruginosa*. Για την επίτευξη αυτού χρησιμοποιήθηκε συλλογή 18 στελεχών του γένους *Pseudomonas* που είχαν ανακτηθεί από δείγματα νερού κολυμβητικών δεξαμενών, τα οποία διατηρούνταν σε κατάλληλες συνθήκες στην τράπεζα βιολογικών δειγμάτων του Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσοβιολογίας (EMMA), του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών. Για την ταυτοποίηση των στελεχών εφαρμόστηκε η PCR-based μέθοδος για την ανίχνευση του γονιδίου 16S rDNA, με χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών. Η συγκεκριμένη μέθοδος θεωρείται “gold standard” για την φυλογένεση των βακτηριακών ειδών, διότι η αλληλουχία του συγκεκριμένου γονιδίου είναι πολύ καλά συντηρημένη (δηλαδή μεταλλάσσετε με πολύ αργούς ρυθμούς). Για τον έλεγχο της μικροβιακής ευαισθησίας, χρησιμοποιήθηκαν 11 κοινά αντιβιοτικά, 6 διαφορετικών τάξεων, εφαρμόζοντας την μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ (μέθοδος Kirby Bauer).

2. Υλικά και Μέθοδοι

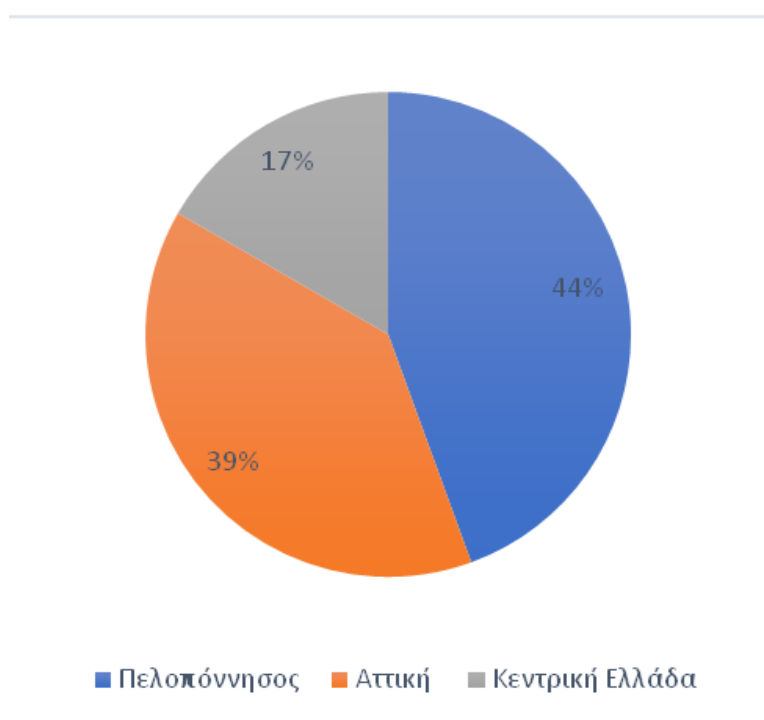
2.1 Υλικά

- **Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα *Pseudomonas agar base/CN-agar* (CM0559, OXOID; 117).** Περιέχει (g/L): gelatin peptone 16.0, υδρόλυμα κασεΐνης 10.0, άνυδρο θειικό κάλιο (K_2SO_4) 10.0, άνυδρο χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$) 1.4, άγαρ 11.0-18.0. Διάλυση 48.4g σε 1000 ml απιονισμένου νερού και προσθήκη πριν την αποστείρωση 10 ml γλυκερόλης. Αποστείρωση στους 121 °C για 15 min και στη συνέχεια όταν το υπόστρωμα φτάσει σε θερμοκρασία 45°C-50°C προστίθεται το CN Supplement, το οποίο περιέχει σε (g/L) hexadecyltrimethyl ammonium bromide (cetrimide) 0.2 και nalidixic acid 0.015.
- **Γενικό θρεπτικό υπόστρωμα για ανακαλλιέργειες - *Nutrient agar* (CM0003, OXOID; 117).** Περιέχει (g/L): πεπτόνη 5.0, εκχύλισμα κρέατος 1.0, εκχύλισμα ζύμης 2.0, χλωριούχο νάτριο 5.0, άγαρ 15.0. Διάλυση 28.0 gr σε 1.000 ml απιονισμένου νερού, ρύθμιση του pH στο 7.4±0.2 πριν την αποστείρωση και στη συνέχεια αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.
- **King's B Medium (244820, B-DIFCO;117).** Περιέχει (g/L): πεπτόνη 20.0, όξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4) 1.5, ένυδρο θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 1.5, άγαρ 15.0. Διάλυση 33 gr σε 990 ml απιονισμένου νερού, ρύθμιση του pH στο 7.2, προσθήκη 10ml γλυκερόλης και μοίρασμα του υλικού σε δοκιμαστικούς σωλήνες (5 ml). Αποστείρωση στους 121°C για 15 min.
- **Acetamide broth (00185, SIGMA-ALDRICH, 117).** Περιέχει (g/L): Διάλυμα Α: δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4) 1.0, άνυδρο θειικό μαγνήσιο (Mg_2SO_4) 0.2, acetamide 2.0 και χλωριούχο νάτριο (NaCl) 0.2. Διάλυμα Β: sodium molybdate 0.5, θειικός σίδηρος 0.05. Διάλυση 2.56 g σε 1000 ml απιονισμένου νερού, μοίρασμα του υλικού σε δοκιμαστικούς σωλήνες (5 ml). Αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.
- **Αντιδραστήριο Nessler (345148, SIGMA-ALDRICH, 117).** Περιέχει (g/L): χλωριούχος υδράργυρος ($HgCl_2$) 10.0, ιωδιούχο κάλιο (KI) 7.0, υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) 16.0.
- **Αμπούλες οξειδάσης (Oxidase Reagent Droppers; **BD BBL™**).** Περιέχει (g/L): 0,5 ml 1% υδατικού διαλύματος N,N,N',N' -tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride. Χρησιμοποιούνται αμπούλες που κυκλοφορούν στο εμπόριο με την ονομασία Oxidase Reagent Droppers.
- **Θρεπτικό υπόστρωμα φύλαξης στελεχών στους -80°C, *Brain Heart + 20% glycerol* (CM1135, OXOID).** Περιέχει (g/L): brain heart infusion solids 17.5, γλυκόζη 10.0, χλωριούχο νάτριο (NaCl) 5.0 και όξινο φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4) 2.5. Διάλυση 37.0 g σε 1000 ml απιονισμένου νερού και αποστείρωση στους 121 °C για 15 min. Μετά την αποστείρωση προστίθεται 20% γλυκερόλη.

2.2 Μέθοδοι

2.2.α Συλλογή δειγμάτων και στοιχεία των υπό μελέτη στελεχών

Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής χρησιμοποιήθηκε συλλογή ύποπτων στελεχών *P. aeruginosa* που φυλάσσονταν σε βαθεία κατάψυξη (-80°C), σε θρεπτικό υπόστρωμα Brain Heart Infusion + 20% glycerol στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσοβιολογίας, του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν 18 στελέχη, τα οποία είχαν ανακτηθεί από νερό κολυμβητικών δεξαμενών σύμφωνα με το ISO 16266: 2006 Water quality- Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*-Method by membrane filtration [35]. Τα παραπάνω στελέχη συλλέχθηκαν από περιοχές της Αττικής, της Πελοποννήσου και της Κεντρικής Ελλάδας, την χρονική περίοδο 2013-2014 όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.1**.



Εικόνα 2.1 Κατανομή των στελεχών ανάλογα με την περιοχή δειγματοληψίας

2.2.β Βιοχημική ταυτοποίηση

Τα στελέχη που διατηρούνταν σε μορφή κυττάρων, σε διάλυμα Brain Heart Infusion + 20% glycerol ανακαλλιεργήθηκαν στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα *Pseudomonas agar base/CN agar* με την μέθοδο των παράλληλων γραμμών με σκοπό να ληφθούν μεμονωμένες αποικίες. Ακολούθησε επώαση στους 37°C σε αερόβιες συνθήκες για 24 h.

- Τα στελέχη που παρήγαγαν πυοκιανίνη (αποικίες μπλε-πράσινου χρώματος) προσμετρήθηκαν ως *P. aeruginosa* [35].
- Τα στελέχη με αποικίες που δεν προσέδιδαν στο μέσο μπλε-πράσινο χρώμα (μη-παραγωγή πυοκιανίνης) αλλά που φθόριζαν κάτω από λάμπα UV 360 ± 20 nm ανακαλλιεργήθηκαν στο γενικό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient agar προκειμένου να υποβληθούν στη βιοχημική δοκιμασία παραγωγής αμμωνίας από ακεταμίδιο. Τα στελέχη που έδωσαν θετική αντίδραση στην παραπάνω διαδικασία, προσμετρήθηκαν ως *P. aeruginosa* [35].
- Τα στελέχη με μη φθορίζουσες αποικίες κοκκινό-καφέ χρώματος ανακαλλιεργήθηκαν στο γενικό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient agar προκειμένου να υποβληθούν στις εξής βιοχημικές δοκιμασίες: παραγωγή αμμωνίας, παραγωγή οξειδάσης και έλεγχος φθορισμού σε King's agar υπό λάμπα UV. Τα στελέχη που έδωσαν θετική αντίδραση και στις τρεις επιβεβαιωτικές διαδικασίες, προσμετρήθηκαν ως *P. aeruginosa* [35].

Τα βήματα που απαιτούνται για την βιοχημική ταυτοποίηση των ύποπτων αποικιών που αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα *Pseudomonas agar base/ CN agar* συνοψίζονται στην **Εικόνα 2.2** [35].

Παραγωγή οξειδάσης

Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με αμπούλες οξειδάσης (Oxidase Reagent Droppers) που περιείχαν το N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride, ένας δείκτης ο οποίος αλλάζει χρώμα όταν αντιδρά με οξειδάση. Μεταφέρθηκε μεμονωμένη αποικία σε διηθητικό χαρτί και στη συνέχεια προστέθηκαν 2-3 σταγόνες του παραπάνω αντιδραστηρίου. Ως θετικό αποτέλεσμα, θεωρείται η παραγωγή χρώματος μπλε έως βαθύ μπλε-μωβ [35].

Παραγωγή αμμωνίας

Μεμονωμένη αποικία από το γενικό θρεπτικό υπόστρωμα εμβολιάστηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε Acetamide broth και μετά την επώαση στους 37 °C σε αερόβιες συνθήκες για 24 h, έγινε προσθήκη του Nessler Reagent. Ως θετικό αποτέλεσμα θεωρείται (εάν το στέλεχος είναι *Pseudomonas aeruginosa* και έχει παραχθεί αμμωνία), η ανάπτυξη χρώματος από κίτρινο έως κεραμίδι [35].

Έλεγχος φθορισμού σε King's agar υπό λάμπα UV

Μεμονωμένη αποικία από το γενικό θρεπτικό υπόστρωμα εμβολιάστηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα King's Agar και επώαστηκε στους 37 °C σε αερόβιες συνθήκες για 1-5 ημέρες. Ως θετικό αποτέλεσμα θεωρείται η ανάπτυξη έντονου φθορισμού κάτω από λάμπα UV [35].

Description of colony on CN agar	Ammonia from acetamide	Production of oxidase	Fluorescence on King's B	Confirmed as <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Blue/green	NT ^a	NT	NT	Yes
Fluorescent (not blue/green)	+	NT	NT	Yes
Reddish brown	+	+	+	Yes
Other types	NT	NT	NT	No

^a NT: not tested.

Εικόνα 2.2 Τα βήματα που απαιτούνται για την βιοχημική ταυτοποίηση των ύποπτων αποικιών

2.2.γ Απομόνωση ολικού DNA

Η απομόνωση ολικού DNA από τα στελέχη πραγματοποιήθηκε είτε με τη μέθοδο βρασμού-ψύξης είτε με τη χρήση του PureLink, Genomic DNA Mini kit (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την μέθοδο βρασμού-ψύξης, αποικίες από καθαρές καλλιέργειες σε Nutrient agar μεταφέρθηκαν σε 250μl water for injection. Ακολούθησε βρασμός για 20 min στους 100°C, έπειτα ψύξη των κυττάρων για 10 min στους -20°C και τέλος φυγοκέντρηση για 5 min σε 10.000rpm. Το ολικό βακτηριακό DNA εντοπίζεται στο υπερκείμενο.

2.2.δ Μοριακή ταυτοποίηση

Τα 18 στελέχη της συλλογής ταυτοποιήθηκαν εφαρμόζοντας τη μοριακή μέθοδο της PCR για την ανίχνευση του συντηρημένου γονιδίου της 16S ριβοσωμικής υπομονάδας. Χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών, ένα ειδικό για το γένος *Pseudomonas* (PA-GS-F/R) και ένα ειδικό για το είδος *P. aeruginosa* (PA-SS-F/R) (**Πίνακας 2.1**), βάσει του δημοσιευμένου πρωτοκόλλου Spilker T. et al [36]. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% και έλεγχος των αποτελεσμάτων σε λάμπα UV. Το επιθυμητό μέγεθος των προϊόντων για την κάθε pcr ήταν στα 618bp και 956bp, αντίστοιχα (**Πίνακας 2.1**). Στις περιπτώσεις όπου δεν ελήφθη προϊόν στην πρώτη PCR (γένος-ειδική), θεωρήθηκε πως πιθανόν τα συγκεκριμένα στελέχη ανήκουν σε διαφορετικό γένος (δηλαδή όχι *Pseudomonas*) και απορρίφθηκαν από την μελέτη. Τα στελέχη που έδωσαν προϊόν του σωστού μοριακού βάρους (δηλαδή 618 bp) στην πρώτη γένος-ειδική PCR, υποβλήθηκαν στη συνέχεια και στην δεύτερη PCR (είδος-ειδική). Τα στελέχη που ανέδειξαν αρνητικό αποτέλεσμα θεωρήθηκε πως πιθανόν ανήκουν σε διαφορετικό είδος, ενώ αυτά που έδωσαν προϊόν σωστού μοριακού βάρους (δηλαδή 956bp) ταυτοποιήθηκαν ως *P.aeruginosa* [33, 9]. Στις παραπάνω αντιδράσεις των PCR χρησιμοποιήθηκαν αρνητικοί μάρτυρες και σαν θετικοί, τα στελέχη αναφοράς *P. aeruginosa* PAO1 και NEQAS. Στους παρακάτω **Πίνακες (Πίνακας 2.1, 2.2, 2.3)** παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και το πρωτόκολλο και οι συνθήκες της PCR, αντίστοιχα.

Πίνακας 2.1: PCR εκκινητές [36]

Αλληλουχίες εκκινητών		Θερμοκρασία Υβριδοποίησης (T _m)	Μέγεθος προϊόντος (bp)
1 ^η pcr γένος-ειδική <i>Pseudomonas spp</i>	PA-GS-F: GACGGGTGAGTAATGCCTA	54	618
	PA-GS-R CACTGGTGTTTCCTTCCTATA		
2 ^η pcr είδος-ειδική <i>P. aeruginosa</i>	PA-SS-F:GGGGGATCTTCGGACCTCA	58	956
	PA-SS-R:TCCTTAGAGTGCCACCCG		

Πίνακας 2.2: Πρωτόκολλο PCR

Αρχικές Συγκεντρώσεις	Τελικές Συγκεντρώσεις	Τελικός Όγκος (25μl)
Buffer + MgCl ₂ 10X	1X	2.5μl
dNTPs mix 10mM	0.2 mM	0.5 μl
Εκκινητές 10μM έκαστος	0.5 μM έκαστος	1 μl έκαστος
Ταq πολυμεράση (5 U/μl)	1U	0.2μl
Απεσταγμένο νερό	-	16.8 μl
DNA	1-500 ng	3 μl

Πίνακας 2.3: Πρόγραμμα PCR [36]

Αρχική Αποδιάταξη: 95°C για 2 min	} 25 κύκλους
Αποδιάταξη: 94 °C για 20sec	
Υβριδισμός: 54 °C/ 58 °C για 20 sec	
Επιμήκυνση: 72 °C για 40 sec	
Τελική επιμήκυνση σε 72 °C για 1 min.	

2.2.ε Gel purification

Από τα στελέχη που έδωσαν αποτέλεσμα στην 2^η PCR (είδος-ειδική), επιλέχθηκαν κάποια αντιπροσωπευτικά για να πραγματοποιηθεί καθαρισμός (purification) των προϊόντων της PCR με το PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2.στ Έλεγχος μικροβιακής ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Όλα τα στελέχη, εκτός από αυτά που απορρίφθηκαν, υποβλήθηκαν σε έλεγχο μικροβιακής ευαισθησίας, σε 11 ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, 6 διαφορετικών τάξεων (συνδυασμός πενικιλίνης-αναστολέων β-λακταμασών, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, μονοβακτάμες, αμινογλυκοσίδες, κινολόνες), με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε άγαρ (μέθοδος Kirby Bauer), σύμφωνα με τις οδηγίες της πρότυπης μεθόδου του The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: συνδυασμός πενικιλίνης-αναστολέων β-λακταμασών: ταζομπακτάμη-πιπερακιλίνη (TPZ; 30/10 μg) κεφαλοσπορίνες: κεφεπίμη (FEP; 30 μg), κεφταζιδίμη (CAZ; 30 μg), μονοβακτάμες: αζτρεονάμη (ATM; 30 μg), αμινογλυκοσίδες: γενταμυκίνη (GM; 30 μg), τομπραμυκίνη (TOB; 30 μg), αμικασίνη (AK; 30 μg), νετιμυκίνη (NET; 30 μg), καρβαπενέμες: μεροπενέμη (MEM; 10 μg), ιμιπενέμη (IPM; 10 μg), φθοριοκινολόνη: σιπροφλοξασίνη (CIP; 5 μg). Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων και η κατηγοριοποίηση των στελεχών ως άγριου τύπου (wild type), μη άγριου τύπου (Non-wild type, NW), και ανθεκτικά (Resistant, R) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με προτεινόμενες οδηγίες από το EUCAST-ECOFFs και άλλων δημοσιεύσεων [9, 37, 38, 39].

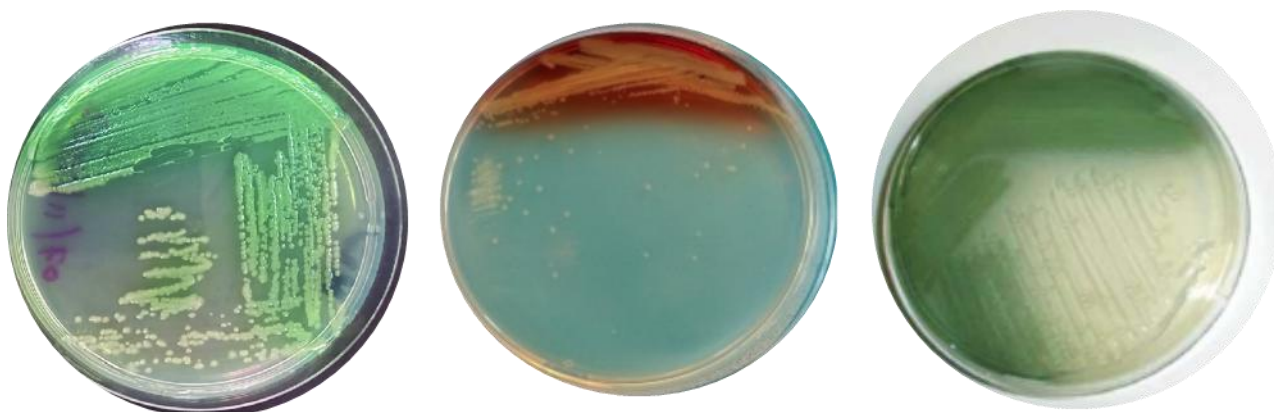
3. Πειραματικό Μέρος

Αποτελέσματα

3. Αποτελέσματα

3.1 Βιοχημική ταυτοποίηση

Από τα 18 στελέχη, τα 9 (9/18, 50%) επιβεβαιώθηκαν βιοχημικά ως *P. aeruginosa*. Πιο συγκεκριμένα, από αυτά τα 9, τα 6 παρήγαγαν πυοκυανίνη (αποικίες μπλε-πράσινου χρώματος), επομένως σύμφωνα με το ISO 16266 [35] δεν χρειάστηκε να υποβληθούν σε περαιτέρω δοκιμασίες. Τα υπόλοιπα 2 από τα 9, δεν παρήγαγαν πυοκυανίνη αλλά φθορίζαν κάτω από λάμπα UV και ανέδειξαν θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμασία παραγωγής αμμωνίας. Τέλος, 1 από τα 9 στελέχη με μη φθορίζουσες αποικίες κόκκινο-καφέ χρώματος βρέθηκαν θετικά στις δοκιμασίες παραγωγής αμμωνίας, παραγωγής οξειδάσης και ελέγχου φθορισμού σε King's agar υπό λάμπα UV. Από τα υπόλοιπα 9 μη επιβεβαιωμένα στελέχη (9/18, 50%) ανέδειξαν θετικό αποτέλεσμα μόνο στην δοκιμασία οξειδάσης, τα 5 με μη φθορίζουσες αποικίες κόκκινο-καφέ χρώματος, το 1 με μη φθορίζουσες αποικίες υπόλευκου χρώματος και το 1 με φθορίζουσες αποικίες. Στον **Πίνακα 3.1** παρουσιάζονται συνολικά τα βιοχημικά αποτελέσματα. Στην **Εικόνα 3.1** απεικονίζονται καλλιέργειες στελεχών *P. aeruginosa* σε Nutrient agar με χαρακτηριστικές αποικίες μπλε-πράσινου χρώματος (παραγωγή πυοκυανίνης) και κόκκινου- καφέ χρώματος (παραγωγή πυοβερδίνης).



Εικόνα 3.1 Καλλιέργειες στελεχών *P. aeruginosa* σε Nutrient agar με χαρακτηριστικές αποικίες μπλε-πράσινου χρώματος (παραγωγή πυοκυανίνης) και κόκκινου- καφέ χρώματος (παραγωγή πυοβερδίνης)

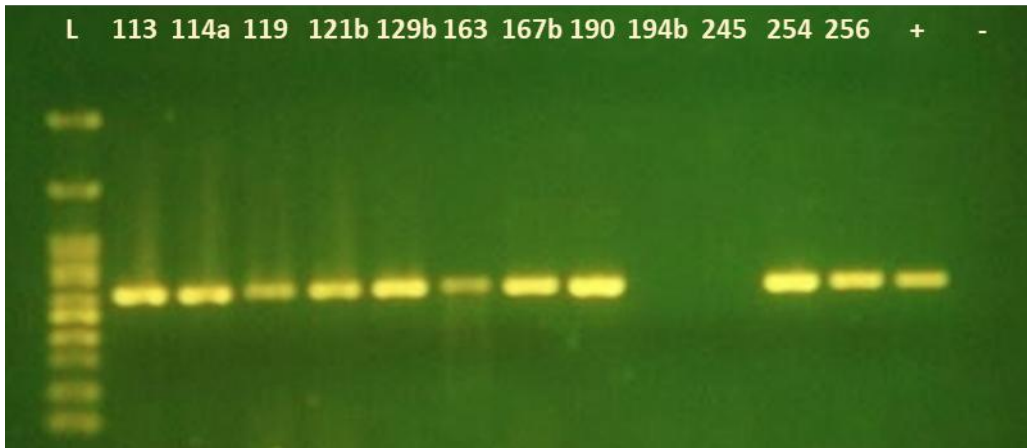
Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα βιοχημικών διαδικασιών

a/a στελέχος	Pseudomonas Agarose Base	Παραγωγή Αμμωνίας	Παραγωγή Οξειδάσης	Φθορισμός σε King's B	Επιβεβαιωμένα στελέχη P. aeruginosa
113	Πράσινες/Μπλε Αποικίες	ΔΕ*	ΔΕ	ΔΕ	ΝΑΙ
114a	Πράσινες/Μπλε Αποικίες	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΝΑΙ
114b	Φθορίζουσες Αποικίες	+	ΔΕ	ΔΕ	ΝΑΙ
119	Κόκκινες/Καφέ Αποικίες	+	+	+	ΝΑΙ
121b	Άχρωμες Αποικίες	-	+	-	ΟΧΙ
129a	Πράσινες/Μπλε Αποικίες	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΝΑΙ
129b	Φθορίζουσες Αποικίες	+	ΔΕ	ΔΕ	ΝΑΙ
163	Πράσινες/Μπλε Αποικίες	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΝΑΙ
167b	Κόκκινες/Καφέ Αποικίες	-	+	-	ΟΧΙ
190	Πράσινες/Μπλε Αποικίες	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΝΑΙ
191b	Φθορίζουσες Αποικίες	-	+	-	ΟΧΙ
193a	Κόκκινες/Καφέ Αποικίες	-	+	-	ΟΧΙ
194b	Κόκκινες/Καφέ Αποικίες	-	+	-	ΟΧΙ
245	Άχρωμες Αποικίες	-	-	-	ΟΧΙ
254	Πράσινες/Μπλε Αποικίες	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ	ΝΑΙ
255	Άχρωμες Αποικίες	-	-	-	ΟΧΙ
256	Κόκκινες/Καφέ Αποικίες	-	+	-	ΟΧΙ
257	Κόκκινες/Καφέ Αποικίες	-	+	-	ΟΧΙ

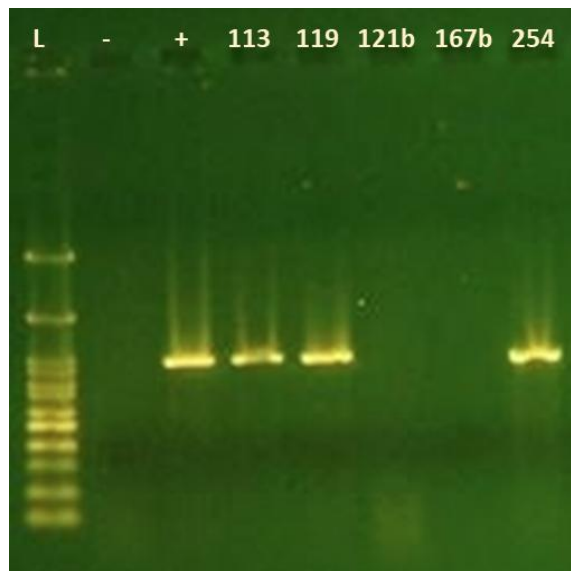
* ΔΕ: Δεν Ελέγχθηκαν

3.2 Μοριακή ταυτοποίηση

Αρχικά όλα τα στελέχη υποβλήθηκαν σε γένος-ειδική PCR 16S, εκ των οποίων τα 3 (3/18, 16.7%) βγήκαν αρνητικά και γι' αυτό δεν εξετάστηκαν περαιτέρω. Στα υπόλοιπα 15 (15/18, 83.3%), που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα, εφαρμόστηκε επιπλέον η είδος-ειδική PCR 16S. Από αυτά τα 15, τα 9 (9/15, 60%) επιβεβαιώθηκαν οριστικά ως *P. aeruginosa*, καθώς παρουσίασαν θετικό αποτέλεσμα στη συγκεκριμένη PCR και τα υπόλοιπα 6 αρνητικά (6/15, 40%), κατατάχθηκαν στα *Pseudomonas* spp. Στις **Εικόνες 3.2** και **3.3** παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της γένος- και είδος-ειδικής PCR, αντίστοιχα. Στον **Πίνακα 3.2** συνοψίζονται τα αποτελέσματα των 2 PCR που εφαρμόστηκαν.



Εικόνα 3.2 Ενδεικτικά αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των *pcr* προϊόντων της γένος-ειδικής *pcr*



Εικόνα 3.3: Ενδεικτικά αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των *pcr* προϊόντων της είδος-ειδικής *pcr*.

Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα μοριακής ταυτοποίησης

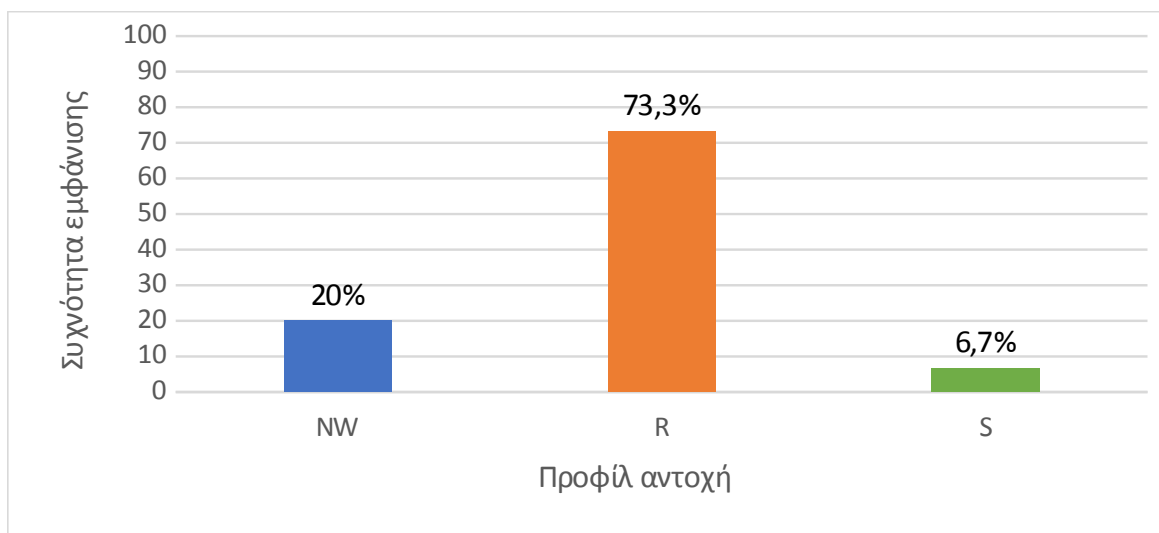
α/α στέλεχος	PCR 16S Pseudomonas spp	PCR 16S Pseudomonas aeruginosa
113	+	+
114a	+	+
114b	+	+
119	+	+
121b	+	-
129a	+	+
129b	+	+
163	+	+
167b	+	-
190	+	+
191b	+	-
193a	+	-
194b	-	-
245	-	-
254	+	+
255	-	-
256	+	-
257	+	-

3.3 Έλεγχος μικροβιακής ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

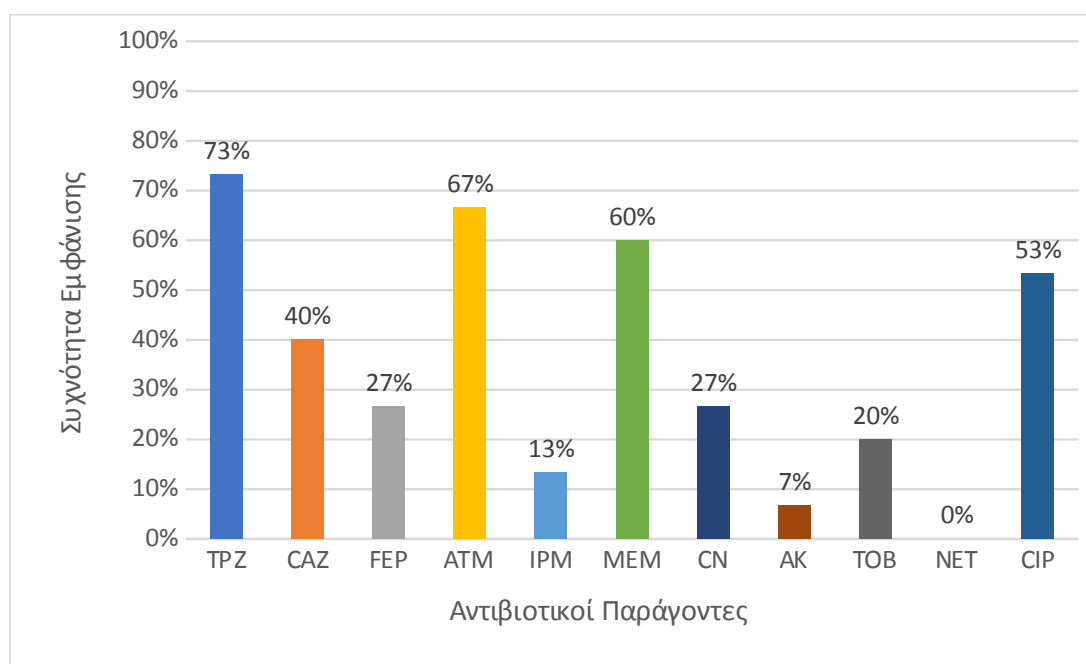
Τα 15 στελέχη που κατατάχθηκαν στα *Pseudomonas spp* (ανεξαρτήτως του είδους) ελέγχθηκαν για τα επίπεδα ευαισθησίας σε 11 αντιβιοτικά και κατηγοριοποιήθηκαν σε 3 ομάδες: το 6.7% (1/15) των στελεχών χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα (sensitive, S: ευαισθησία σε όλους τους υπό μελέτη αντιβιοτικούς παράγοντες), το 20% (3/15) ως μη-άγριου τύπου (non-wild type, N-WT: αντοχή σε δυο το πολύ αντιβιοτικούς παράγοντες) και το 73,3% (11/15) ως ανθεκτικά (resistant, R: αντοχή σε τουλάχιστον 3 αντιβιοτικούς παράγοντες). Ενδεικτικά, στην **Εικόνα 3.4** απεικονίζεται το αντιβιογράμμα ενός ανθεκτικού στελέχους (119) *P. aeruginosa*. Στην **Εικόνα 3.5** παρουσιάζεται η κατανομή των προφίλ αντοχής (N-WT, S και R). Η πλειοψηφία των στελεχών, παρουσίασαν αντοχή στον συνδυασμό πενικιλίνης-αναστολέων β-λακταμασών, TPZ (73%, 11/15), στη μονοβακτάμη, ATM (67%, 10/15), και στην καρβαπενέμη, MEM (60%, 9/15), όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.6**. Τα στελέχη που εμφάνισαν παράλληλη αντοχή στις κεφαλοσπορίνες 3^{ης} και 4^{ης} γενιάς (CAZ, FEP), στην ATM και στις καρβαπενέμες (MEM, IPM) με πρότυπα αντοχής (33.3%, 5/15): -CAZ ή/και FEP-ATM-MEM, πιθανότητα διαθέτουν εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (**Πίνακας 3.3**).



Εικόνα 3.4 Αντιβιογράμμα ανθεκτικού στελέχους *P. aeruginosa*



Εικόνα 3.5 Συχνότητα εμφάνισης των προφίλ αντοχής του γένους Pseudomonas



Εικόνα 3.6 Συχνότητα εμφάνισης αντοχής ανά αντιβιοτικό παράγοντα

<i>Πίνακας 3.3 Πρότυπα και προφίλ αντοχής των στελεχών</i>		
α/α στελέχους	Πρότυπο Αντοχής	Προφίλ Αντοχής
113	-	S
114a/R	TZP, CAZ, FEP, ATM, MEM, CN, AK, TOB, CIP	R
114b	CAZ	NW
119	TZP, ATM, TOB	R
121b	TZP, CAZ, FEP, ATM, MEM, CIP	R
129a	CN	NW
129b/R	TZP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM	R
163	TZP, IPM, CIP	R
167b	TZP, ATM, MEM, CIP	R
190	TZP	NW
191b	TZP, ATM, MEM, CIP	R
193α	TZP, ATM, MEM, CIP	R
254	TZP, CAZ, ATM, MEM, CIP	R
256	CAZ, FEP, ATM, MEM, CN, CIP	R
257	TZP, ATM, MEM, CN, TOB, CIP	R

4. Συζήτηση

Η άσκηση στο νερό έχει τεράστια οφέλη στην σωματική καθώς και στην ψυχική υγεία των ανθρώπων και φαίνεται πως την προτιμούν περισσότερο από την άσκηση στην ξηρά. Οι άνθρωποι μπορούν να ασκούνται περισσότερο στο νερό χωρίς να επιβαρύνουν τόσο πολύ τις αρθρώσεις ή τους μύς τους, κάτι που έχει αποδειχθεί ότι βοηθά στην αποκατάσταση σε άτομα με χρόνια νοσήματα όπως αρθρίτιδα και οστεοαρθρίτιδα [3]. Ωστόσο, τα νερά αναψυχής συμπεριλαμβανομένων των κολυμβητικών δεξαμενών, εγκυμονούν και αρκετούς κινδύνους, όπως πνιγμοί, τραυματισμοί αλλά και ανάπτυξη υδατογενών λοιμώξεων [1, 2, 3, 8]. Τα πιο συχνά νοσήματα που σχετίζονται με την κολύμβηση σε πισίνες είναι η διάρροια, τα δερματικά εξανθήματα, η ωτίτιδα, η πνευμονία και οι λοιμώξεις των οφθαλμών και της αναπνευστικής οδού [1, 2, 3, 4, 8]. Οι λοιμώξεις αυτές προκύπτουν μέσω της κατάποσης μολυσμένου νερού, της άμεσης επαφής με αυτό καθώς και μέσω της εισπνοής αερολυμάτων, που περιέχουν λοιμογόνους παράγοντες [39, 40]. Ιδιαίτερο κίνδυνο ανάπτυξης λοιμώξεων διατρέχουν τα μικρά παιδιά, οι εγκυμονούσες καθώς και τα άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα [1, 2, 3, 4, 8, 39].

Επομένως, η εξασφάλιση της καλής ποιότητας και της ασφάλειας των κολυμβητικών δεξαμενών είναι μείζον ζήτημα για την δημόσια υγεία και για αυτό τον λόγο έχουν θεσπιστεί αυστηρές νομοθεσίες και έχουν σχεδιαστεί συγκεκριμένα πρωτόκολλα που αφορούν τον μικροβιολογικό και το χημικό έλεγχο των νερών αυτών [1, 2, 3, 5, 7, 8]. Η ελληνική νομοθεσία, κατά τον μικροβιολογικό έλεγχο του νερού κολυμβητικών δεξαμενών εστιάζει σε μικροβιολογικές παραμέτρους όπως κολοβακτηριοειδή, *Escherichia coli* και βακτηρία ολικής μεσόφιλης χλωρίδας αλλά όχι στα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* παρότι απομονώνονται πολύ συχνά από το νερό και τις επιφάνειες των κολυμβητικών δεξαμενών. Πιο συγκεκριμένα η *P. aeruginosa*, είναι ένα από τα είδη του γένους ιδιαίτερα επικίνδυνο που έχει αναφερθεί σε πολυάριθμα περιστατικά λοιμώξεων σχετιζόμενων με χρήση κολυμβητικών δεξαμενών [2, 9, 10, 41, 42, 43, 44]. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης, όπου κατά τον μικροβιολογικό έλεγχο δειγμάτων νερών από πισίνες απομονώθηκαν 15 στελέχη του γένους *Pseudomonas* εκ των οποίων τα 9 ταυτοποιήθηκαν ως *P. aeruginosa*. Η ταυτοποίηση των στελεχών βασίστηκε στη μοριακή μέθοδο της PCR για την ενίσχυση του συντηρημένου γονιδίου της 16S ριβοσωμικής υπομονάδας. Η γενετική αναγνώριση και ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Pseudomonas* μέσω της μεθόδου PCR για την ανίχνευση συντηρημένων γονιδίων όπως αυτό του 16S rDNA έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες [9, 10, 45-50], λόγω της αξιοπιστίας, της ευαισθησίας και επαναληψιμότητας που εμφανίζει καθώς και του μειωμένου χρόνου εφαρμογής της.

Ομοίως με προηγούμενες δημοσιεύσεις [9, 10, 44, 51, 52], διαπιστώθηκε πως τα περιβαλλοντικά στελέχη *Pseudomonas* spp της παρούσας εργασίας (συμπεριλαμβανομένων της *P. aeruginosa*) ήταν ανθεκτικά (R) σε τελευταίας γενιάς αντιβιοτικά (όπως κεφαλοσπορίνες 3ης και 4ης γενιάς, μονομπακτάμες, φθοριοκινολόνες και καρβαπενέμες) που χρησιμοποιούνται ευρέως κατά την κλινική πράξη. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.6**, τα ποσοστά αντοχής στα αντιβιοτικά

TPZ, ATM, MEM και CIP ήταν 73%, 67%, 60% και 53%, αντίστοιχα. Ακόμα, σε αρκετά στελέχη (33,3%, 5/15) εντοπίστηκε παράλληλη αντοχή στις κεφαλοσπορίνες 3^{ης} και 4^{ης} γενιάς (CAZ, FEP), μονομπακτάμες (ATM) και στις καρβαπενέμες (MEM, IPM) με πρότυπα αντοχής -CAZ ή/και FEP-ATM-MEM. Η ανθεκτικότητα στους παραπάνω αντιβιοτικούς παράγοντες οφείλεται σε επίκτητους μηχανισμούς αντοχής, πιθανότατα σε ύπαρξη πλασμιδίων που φέρουν γονίδια για εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες ή/και σε μειωμένη έκφραση πορινών (OprD) [9, 10, 19, 39, 44, 52].

Συμπερασματικά, η ανίχνευση στελεχών *P. aeruginosa* στα υπό μελέτη δείγματα νερού κολύμβησης είναι ανησυχητική, καθώς η παρουσία τους αποτελεί ένδειξη επιμόλυνσης των συγκεκριμένων υδάτων. Η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών *P. aeruginosa* ακόμα και σε καρβαπενέμες, που είναι τα πιο ισχυρά αντιβιοτικά που διαθέτουμε μέχρι στιγμής, υπογραμμίζει τον κίνδυνο ανάπτυξης ανίατων λοιμώξεων ειδικά για τους χρήστες κολυμβητικών δεξαμενών που ανήκουν σε ευπαθείς ομάδες. Θεωρούμαι πως η συμπερίληψη της *P. aeruginosa* στην νομοθεσία που αφορά τον μικροβιολογικό έλεγχο δειγμάτων νερού των κολυμβητικών δεξαμενών κρίνεται απαραίτητη. Επιπρόσθετα, καθίσταται αναγκαία η ανάπτυξη πρωτοκόλλων ανίχνευσης, αναγνώρισης και ταυτοποίησης με ακρίβεια, αξιοπιστία και ταχύτητα των διαφόρων ειδών *Pseudomonas*, καθώς αρκετές λοιμώξεις που προέρχονται από περιβαλλοντικά στελέχη του συγκεκριμένου γένους, είναι δύσκολο να ταυτοποιηθούν με τις υπάρχουσες κλασσικές τεχνικές.

Για τον εντοπισμό επιδημιών λοίμωξης από *Pseudomonas* spp που σχετίζονται με χρήση κολυμβητικών δεξαμενών, εφαρμόζονται τυποποιητικές μέθοδοι βασισμένες στην αλληλούχιση (sequencing) του DNA. Επομένως, πρωτεύων μελλοντικός στόχος είναι η μοριακή τυποποίηση μέσω της αλληλούχισης του γονιδίου 16S, η οποία πιθανότατα θα συμβάλει στην φυλογενετική ανάλυση καθώς και στην διάκριση μεταξύ των γενετικά κοντινών στελεχών του βακτηρίου. Αυτό μπορεί να διαδραματίσει καθοριστικό ρόλο στην επιδημιολογική μελέτη του βακτηρίου και να δώσει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο εξάπλωσης και μετάδοσης των στελεχών μεταξύ των χρηστών κολυμβητικών δεξαμενών.

Βιβλιογραφία

1. World Health Organization (2006). Guidelines for safe recreational water environments, Volume 2, Swimming pools and similar environments. Geneva, Switzerland: WHO. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43336>.
2. Guida, M.; Gallé, F.; Mattei, M.L.; Anastasi, D.; Liguori, G. Microbiological quality of the water of recreational and rehabilitation pools: A 2-year survey in Naples, Italy. *Public Health* **2009**, *123*, 448–451.
3. <https://www.cdc.gov/healthy-swimming/about/index.html>
4. Hlavsa MC, Aluko SK, Miller AD, Person J, Gerdes ME, Lee S, Laco JP, Hannapel EJ, and Hill VR. Outbreaks Associated with Treated Recreational Water — United States, 2015–2019. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2021;70(20):733–738. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm7020a1>.
5. Μαυρίδου, Α., Βανταράκης, Α., Ευστρατίου, Μ. Α., & Αρβανιτίδου-Βαγιωνά, Μ., (2014). Μικροβιολογία και Επιδημιολογία Νερού: Θεωρία και Τεχνικές. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης.
6. EPA, US Environmental Protection Agency, (1976). Quality Criteria for Water (“Red Book”). Washington, DC: USEPA. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2018-10/documents/quality-criteria-water-1976.pdf>
7. World Health Organization. (2003). Guidelines for safe recreational water environments. Volume 2: Swimming pools and similar environments.
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2013). Microbes in pool filter backwash as evidence of the need for improved swimmer hygiene - metro-Atlanta, Georgia, 2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 62, 385–388.
9. Pappa O, Vantarakis A, Galanis A, Vantarakis G, Mavridou A. Antibiotic resistance profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various Greek aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol*. 2016;92(6):fiw086. doi:10.1093/femsec/fiw086
10. Schwartz, T., Armant, O., Bretschneider, N., Hahn, A., Kirchen, S., Seifert, M., Dötsch, A. (2015). Whole genome and transcriptome analyses of environmental antibiotic sensitive and multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates exposed to waste water and tap water. *Microbial Biotechnology*, 8, 116–130.10.1111/1751-7915.12156
11. Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 582–610.10.1128/CMR.00040-09

12. https://www.cdc.gov/healthy-swimming/prevention/?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/healthywater/swimming/swimmers/rwi.html
13. Kariminik A, Baseri-Salehi M, Kheirkhah B. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: An updated review article. *Immunol Lett.* 2017;190:1-6. doi:10.1016/j.imlet.2017.07.002
14. Bennik, M. H. J. (1999). *Pseudomonas aeruginosa*. In C. A. Batt (Ed.), *Encyclopedia of food microbiology*
15. Paul J. Planet, in *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Sixth Edition)*, 2023 Microbiology
16. <https://microbenotes.com/pseudomonas-aeruginosa/#biochemical-characteristics-of-pseudomonas-aeruginosa>
17. de Sousa T, Hébraud M, Dapkevicius MLNE, et al. Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (23):12892. Published 2021 Nov 29. doi:10.3390/ijms222312892
18. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* 2019;37(1):177-192. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.013
19. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol.* 2011 Apr 5;2:65. doi:10.3389/fmicb.2011.00065. PMID: 21747788; PMCID: PMC3128976.
20. Mechanisms of Antibiotic and Biocide Resistance That Contribute to *Pseudomonas aeruginosa* Persistence in the Hospital Environment
21. <https://ikee.lib.auth.gr/record/285936/files/GRI-2016-17867.pdf>
22. <https://ir.lib.uth.gr/xmlui/bitstream/handle/11615/44911/9735.pdf?sequence=1>
23. Mena KD, Gerba CP. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2009;201:71-115. doi: 10.1007/978-1-4419-0032-6_3. PMID: 19484589.
24. <https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/MED1175/Pseudomonas%20aeruginosa.pdf>
25. Richard V. Goering, Hazel M. Dockrell, Mark Zuckerman, Peter L. Chiodini, *Medical Microbiology and Immunology*, 6η Έκδοση, Επιστημονικές Εκδόσεις ELSEVIER, σελ.14, 152-154, 331-335. 32 14.
26. Patrick Michael R. Barer, Will Irving, Andrew Swann, Nelun Perera, Επιμέλεια για την Ελληνική Έκδοση Αθανάσιος Τσακρής *Ιατρική Μικροβιολογία: Οδηγός Μικροβιακών Λοιμώξεων, Παθογένεση-Ανοσία-Ερμηνεία Εργαστηριακών Εξετάσεων και Δοκιμασιών*, 1η έκδοση, Βασιλειάδης Ιατρικές Εκδόσεις.
27. Ahmad SS. Water related ocular diseases. *Saudi J Ophthalmol.* 2018;32(3):227-233. doi:10.1016/j.sjopt.2017.10.009

28. R. Murray, Kens S. Rosenthal, Michael A. Pfaller, Επιμέλεια Ελληνικής Έκδοσης Νίκος Α. Μαλισιόβας, Ιατρική Μικροβιολογία, 6η Έκδοση, Επιστημονικές Εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε, σελ. 359-362
29. Ramírez-Castillo FY, Loera-Muro A, Jacques M, et al. Waterborne pathogens: detection methods and challenges. *Pathogens*. 2015;4(2):307-334. Published 2015 May 21. doi:10.3390/pathogens4020307
30. Hassanein F, Masoud IM, Fekry MM, et al. Environmental health aspects and microbial infections of the recreational water : Microbial Infections and Swimming pools. *BMC Public Health*. 2023;23(1):302. Published 2023 Feb 10. doi:10.1186/s12889-023-15183-z
31. M., L., Beach, M., (2004). Prevention of recreational water illnesses. *Infectious Diseases in Children*, 17(5).
32. Verma, A., Bolton, F., J., Fiefield, D., Lamb, P., Woloschin, E., Smith, N., McCann, R., (2007). An outbreak of E.coli O157:H7 associated with a swimming pool: an unusual vehicle of transmission. *Epidemiology and Infection* 135(6), 989-992.
33. Μαυρούδη Αναστασία, Υδατογενείς λομώξεις από τεχνητά υδάτινα οικοσυστήματα, Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Ιατρικές Επιστήμες (BBE)», Σχολή Επιστημών Υγείας, Ιατρικό Τμήμα
34. Bonadonna, L., La Rosa, G., (2019). A Review and Update on Waterborne Viral Diseases Associated with Swimming Pools. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16(2), 166
35. ISO 16266 (2006) Water quality-detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* method by membrane filtration.
36. Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ 2004. PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from Other *Pseudomonas* Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients. *J Clin Microbiol* 42: <https://doi.org/10.1128/jcm.42.5.2074-2079.2004>
37. ECOFFs και Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 10, 2018: http://www.eucast.org/ast_of_bacteria
38. Dioli C, Pappa O, Siatravani E, et al. Molecular Characterization and Prevalence of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Isolates Derived from Clinical Specimens and Environmental Habitats. *Microorganisms*. 2023;11(6):1399. Published 2023 May 26. doi:10.3390/microorganisms11061399
39. Pappa, O., Kefala, A. Molecular Epidemiology of Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Hospitalized Patients in Greece. *Microorganisms*, 2020, 8(11), 1652. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111652>
40. Walker, D., H., (2014). Interactions of Pathogens with the Hosts. *Pathobiology of Human Disease*, 214-216.

41. Doménech-Sánchez A., Laso E., Albertí S. Environmental surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational waters in tourist facilities of the Balearic Islands, Spain (2016–2019), *Travel Medicine and Infectious Disease*, 2023; 54. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2023.102622>.
42. Moore JE, Heaney N, Millar BC, Crowe M, Elborn JS. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational and hydrotherapy pools. *Commun Dis Public Health*. 2002;5(1):23-26.
43. Van Daele SG, Franckx H, Verhelst R, et al. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis rehabilitation centre. *Eur Respir J*. 2005;25(3):474-481. doi:10.1183/09031936.05.00050304
44. Tirodimos I, Arvanitidou M, Dardavessis L, Bisiklis A, Alexiou-Daniil S. Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from swimming pools in northern Greece. *East Mediterr Health J*. 2010;16(7):783-787.
45. Wagner J, Short K, Catto-Smith AG, Cameron DJS, Bishop RF, Kirkwood CD (2008) Identification and Characterisation of *Pseudomonas* 16S Ribosomal DNA from Ileal Biopsies of Children with Crohn's Disease. *PLoS ONE* 3(10): e3578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003578>
46. Lalucat J, et al. Past, present and future of the boundaries of the *Pseudomonas* genus: Proposal of *Stutzerimonas* gen. Nov. *Syst Appl Microbiol*. 2022; 45(1):126289. doi: 10.1016/j.syapm.2021.126289.
47. Kačániová M, Klůga A, Kántor A, et al. Comparison of MALDI-TOF MS Biotyper and 16S rDNA sequencing for the identification of *Pseudomonas* species isolated from fish. *Microb Pathog*. 2019;132:313-318. doi:10.1016/j.micpath.2019.04.024
48. Tripathi P, Banerjee G, Gupta MK, Saxena S, Ramteke PW. Assessment of phylogenetic affiliation using 16S rRNA gene sequence analysis for *Pseudomonas aeruginosa* in patients of lower respiratory tract infection. *Indian J Med Res*. 2013;138(4):557-559.
49. Abeer A. Marhoon, Ismail H.Aziz, Mohammed E. Altaai, Identification *Pseudomonas aeruginosa* by 16s rRNA gene for Differentiation from Other *Pseudomonas* Species that isolated from Patients and environment, 2014, 11 (2), 1028-1034
50. Widmer F, Seidler RJ, Gillevet PM, Watrud LS, Di Giovanni GD. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(7):2545-2553. doi:10.1128/AEM.64.7.2545-2553.1998
51. Lutz JK, Lee J. Prevalence and antimicrobial-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools and hot tubs. *Int J Environ Res Public Health*. 2011;8(2):554-564. doi:10.3390/ijerph8020554
52. Pappa, Olga et al. “Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Recovered from Greek Aquatic Habitats Implementing the Double-Locus

Sequence Typing Scheme.” *Microbial ecology* vol. 74,1 (2017): 78-88. doi:10.1007/s00248-016-0920-8