ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΠΟΙΚΟΙΛΟΤΗΤΑΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *E. coli* ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΙ ΣΕ ΥΔΑΤΙΝΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΑ

Παπατζιτζέ Όλγα

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Αμαλία Δ. Καραγκούνη – Κύρτσου
Καθηγήτρια

Αθήνα, 2012

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΠΟΙΚΟΙΛΟΤΗΤΑΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *E. coli* ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΙ ΣΕ ΥΔΑΤΙΝΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΑ

Παπατζιτζέ Όλγα

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Αμαλία Δ. Καραγκούνη – Κύρτσου

Καθηγήτρια

Αθήνα, 2012

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Ερευνητικό εργαστήριο του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Αθηνών υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Μικροβιολογίας Αθηνάς Μαυρίδου

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγήτρια	Δρ. Αμαλία Δ. Καραγκούνη – Κύρτσου
Αναπληρωτής Καθηγητής	Δρ. Γεώργιος Διαλλινάς
Επίκουρος Καθηγητής	Δρ. Δημήτριος Χατζηνικολάου

Στη μητέρα μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στην πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας θεωρώ καθοριστική τη συνεισφορά συγκεκριμένων προσώπων για την επιστημονική και ηθική συμπαράσταση που μου προσέφεραν.

Πρώτα και κύρια θεωρώ υποχρέωση μου να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια Α. Μαυρίδου, η οποία είχε την επίβλεψη της παρούσας εργασίας, για την άριστη καθοδήγησή της, την ουσιαστική βοήθειά της κατά τη διάρκεια της εκπόνησης των πειραμάτων και σαφώς για την ηθική υποστήριξη καθ'όλο το χρονικό διάστημα της πραγματοποίησης της διπλωματικής εργασίας.

Την Καθηγήτρια Α. Δ. Καραγκούνη – Κύρτσου (επιστημονική υπεύθυνη του Μ. Δ. Ε.) για τις πολύτιμες παρατηρήσεις και την καθοριστική βοήθεια για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Όπως επίσης για τις συμβουλές καθ'όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου στο Μ. Δ. Ε. ''Μικροβιακή Βιοτεχνολογία''.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Όλγα Παππά για τις πολύτιμες συμβουλές της και τη βοήθειά της κατά τη διάρκεια των πειραμάτων καθώς και για την ουσιαστική ηθική συμπαράστασή της για την πραγματοποίηση τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια Ε. Καλκάνη για τις πολύτιμες συμβουλές και την ηθική της στήριξη. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Γ. Σπανάκο για τις πολύτιμες συμβουλές του κατά την εκπόνηση της εργασίας αλλά και τη πολύτιμη βοήθειά του στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων από το πειραματικό μέρος της εργασίας. Αποτέλεσε αφορμή για την απόκτηση πολύτιμης γνώσης. Το προσωπικό του Κεντρικού Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας (Κ.Ε.Δ.Υ) και ιδιαίτερα την κα Μπούφα και την κα Ρουσιά για την βοήθειά τους για την πρόσβαση σε δείγματα που περιείχαν βακτήρια *E. coli*.

Ευχαριστώ θερμά τον Στάθη Κατσίφα για τις επικοδομητικές συμβουλές και την καθοδήγησή του κατά τη συγγραφή της Διπλωματικής Εργασίας όπως και τον Δημήτρη Κεραμμυδά για την πολύτιμη βοήθειά και συνεργασία του ως επόπτη Δ. Υγείας για την πραγματοποίηση των δειγματοληψιών από τις κολυμβητικές δεξαμενές.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους επιστήθιους φίλους από το προσωπικό μου περιβάλλον για την ηθική τους στήριξη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 4

1.1 Βιοποικιλότητα 4

1.2 Μικροβιακή Ποικιλότητα 4

1.3 Η έννοια του είδους στους Προκαρυωτικούς Οργανισμούς. 5

1.4 Το γένος *Escherichia* : Γενικά Χαρακτηριστικά 6

1.4.1 Ταξινόμηση των ειδών του γένους *Escherichia* 7

1.4.2 Παθογένεια του γένους *Escherichia* 8

1.4.3 Το είδος *Escherichia coli* 8

1.4.4 Παράγοντες δημιουργίας νέων στελεχών *E. coli* 19

1.4.5 Θεραπευτική χρήση μη παθογόνων στελεχών *E. coli* 21

1.4.6 Παθογένεια- Νόσοι από *E. coli* 22

1.4.7 Επιδημιολογία των στελεχων *E. coli* 28

1.4.8 Πρόληψη έναντι υδατογενών και τροφιμογενών λοιμώξεων 34

1.4.9 Ευαισθησία του βακτηρίου *E. coli* στα αντιβιοτικά – Θεραπεία των ασθενών που πάσχουν από λοιμώξεις του *E. coli* 35

1.4.10 Ρόλος του βακτηρίου *E. coli* στη Βιοτεχνολογία 35

1.4.11 Οικολογία του βακτηρίου *E. coli* σε υδάτινα και άλλα οικοσυστήματα 37

1.4.12 *E. coli* και μικροβιολογικοί δείκτες ρύπανσης 38

1.4.13 Επιβίωση *E. coli* στις κολυμβητικές δεξαμενές 41

1.5 Τυποποιήση στελεχών *E. coli* 45

1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 56

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 58

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 58

2.1 Δειγματοληψία 59

2.2 Επεξεργασία των δειγμάτων 63

2.3 Διατήρηση μικροοργανισμών 63

2.4 Στελέχη αναφοράς..... 64

2.5 Θρεπτικά Υποστρώματα..... 64

2.6 ΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ..... 65

2.7 Βιοχημικές δοκιμές..... 67

2.8 Μοριακές Τεχνικές Απομόνωσης DNA από *E. coli* 68

2.8.1 Αντίδραση ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence polymerase chain reaction)..... 70

2.8.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 71

2.8.3 Λογισμικό πρόγραμμα PHYLIP 3.6.1 (Phylogeny Inference Package) 72

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 74

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... 74

3.1 Απομόνωση και φαινοτυπική Ταυτοποίηση νέων στελεχών *Escherichia coli* από διάφορα υδάτινα οικοσυστήματα. 75

3.2 Μοριακή τυποποιήση στελεχών *Escherichia coli*..... 81

3.2.1 Πρότυπα των απομονωθέντων στελεχών *E. coli* βάσει της αντίδρασης ERIC-PCR82

3.2.2 Φυλογενετική ανάλυση και καθορισμός μοριακών τύπων ERIC-PCR των στελεχών 89

3.3.3 Ομαδοποιήση των ERIC προφίλ ζωνών που παρουσιάζονται στο φυλογεννετικό δέντρο ανάλογα με τη γεωγραφική κατανομή. 93

3.3.4 Ομαδοποιήση των ERIC προφίλ ζωνών που παρουσιάζονται στο φυλογεννετικό δέντρο ανάλογα με την έκθεσή τους στο χλώριο 95

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 102

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... 102

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 103

4.1 Ταυτοποίηση στελεχών *E. coli* βάση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών. 105

4.2 Τυποποίηση περιβαλλοντικών στελεχών *E. coli* με ERIC-PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence polymerase chain reaction) 105

4.3 Συσχέτιση απομονωθέντων στελεχών με τις γεωγραφικές περιοχές 108

4.4 Τυποποιήση στελεχών *E. coli* 109

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΑΡΑΣΜΑΤΑ 118

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 119

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ..... 139

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιοποικιλότητα

Υπάρχουν πολλές απόψεις για τον ορισμό της βιολογικής ποικιλότητας ή βιοποικιλότητας, αλλά ο πιο αποδεκτός ορισμός είναι εκείνος που όρισε ο Οργανισμός Ηνωμένων Εθνών για τη Βιολογική Ποικιλότητα (UNEP), στις 5 Ιουνίου του 1992 στη Συνδιάσκεψη Κορυφής για το Περιβάλλον και την Ανάπτυξη, στο Rio de Janeiro στη Βραζιλία. Τη Σύμβαση για τη Βιολογική Ποικιλότητα (Άρθρο 2), υπέγραψαν περισσότερα από 150 κράτη. Στη διεθνή βιβλιογραφία χρησιμοποιείται πολύ με το ακρωνύμιό της: CBD (Convention on Biological Diversity). Η Σύμβαση αναφέρει ότι ως βιολογική ποικιλότητα ορίζεται/εννοείται η ποικιλομορφία που εμφανίζεται ανάμεσα στους ζωντανούς οργανισμούς όλων των ειδών, των χερσαίων, θαλάσσιων και άλλων υδάτινων συστημάτων και οικολογικών συμπλεγμάτων στα οποία οι οργανισμοί αυτοί ανήκουν. Ο ορισμός περιλαμβάνει την ποικιλότητα μέσα σε ένα είδος, όπως κι εκείνη μεταξύ διαφορετικών ειδών και μεταξύ των οικοσυστημάτων (Gaston και Spicer, 1998). Η ποικιλότητα διακρίνεται σε τρία βασικά επίπεδα: α) τη γενετική ποικιλότητα, β) την οργανισμική ποικιλότητα και γ) την οικολογική ποικιλότητα. Τα επίπεδα αυτά είναι δυνατόν να εμφανίζονται με διακριτούς ρόλους, μολονότι υπάρχουν μεταξύ τους πολλά σημεία σύγκλισης (π.χ. ο πληθυσμός που αποτελεί στοιχείο και των τριών επιπέδων (Gaston και Spicer, 1998 και Λυμπεροπούλου, 2009).

1.2 Μικροβιακή Ποικιλότητα

Ο Turner (1999), αναφέρει 4 επίπεδα βιολογικής ποικιλότητας: το γενετικό επίπεδο, το επίπεδο των ειδών, το επίπεδο του οικοσυστήματος που περιλαμβάνει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βιοτικών παραγόντων, τις σχέσεις τους με τους αβιοτικούς παράγοντες του οικοσυστήματος και τέλος τη λειτουργική βιολογική ποικιλότητα. Η μικροβιακή ποικιλότητα περιλαμβάνει τη γενετική σύσταση των μικροοργανισμών, το περιβάλλον (οικοθέσεις) όπου οι μικροργανισμοί απαντώνται, καθώς και τον οικολογικό ή λειτουργικό ρόλο των μικροοργανισμών στο οικοσύστημα.

Η σημασία της μικροβιακής ποικιλότητας είναι αρκετά μεγάλη και η εκτίμησή της έχει έντονο επιστημονικό αλλά και οικονομικό ενδιαφέρον. Η χρήση των ενζύμων που απομονώνονται από μικροοργανισμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται σε ακραία περιβάλλοντα (π.χ *Taq* πολυμεράση, κυτταρινάσες, πρωτεάσες κ.λ.π), η βιοαποικοδόμηση και η συμμετοχή τους στον κύκλο του αζώτου αλλά και στους άλλους κύκλους των βασικών στοιχείων, είναι μερικά παραδείγματα χρήσης τους στη βιοτεχνολογία (Hunter-Cevera, 1998 και Alcalde και συνεργάτες, 2006). Ένας από τους αντικειμενικούς σκοπούς της μελέτης της βιοποικιλότητας με τη χρήση μοριακών τεχνικών είναι να καταγράψει την παρουσία των μικροοργανισμών σε ένα περιβάλλον και στη συνέχεια να διευκολύνει την απομόνωση νέων μικροοργανισμών που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν από τη βιομηχανία που χρησιμοποιεί βιοτεχνολογικές διαδικασίες (Glick και Pasternak, 2003).

Η γνώση για τη μικροβιακή ποικιλότητα καθώς και του ρόλου της στα διάφορα οικοσυστήματα είναι σχετικά περιορισμένη καθώς είναι πλέον αποδεκτό ότι μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό (περίπου 1 - 5 %) του συνόλου των μικροοργανισμών έχει απομονωθεί σε καθαρές καλλιέργειες και έχει χαρακτηρισθεί (Ward και συνεργάτες 1998). Η σύγκριση του αριθμού των βακτηρίων που μπορούν να καλλιεργηθούν σε σχέση με το συνολικό αριθμό των βακτηρίων σε διάφορα ενδιαιτήματα, όπως αυτός εκτιμάται από μελέτες αλληλουχιών 16S rDNA και χρήση της τεχνικής FISH (FLUORESENCE IN SITU HYBRIDIZATION), παρουσιάζει μεγάλες διαφοροποιήσεις (Amann και συνεργάτες 1995, Tsen και συνεργάτες, 1998, και Dulti και συνεργάτες, 2006). Η κύρια αιτία για αυτές τις διαφορές σχετίζεται με τη φυσιολογία των μικροοργανισμών στο φυσικό τους περιβάλλον και την αδυναμία προσομοίωσης των συνθηκών του φυσικού περιβάλλοντος στο εργαστήριο (Bohannan και Hughes, 2003).

1.3 Η έννοια του είδους στους Προκαρυωτικούς Οργανισμούς.

Η έννοια της βιοποικιλότητας είναι ταυτισμένη με το είδος, ως μέσο για την διερεύνησή της. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ο ορισμός της είναι αρκετά δύσκολος ιδιαιτέρως για τη Μικροβιολογία (Rosselo-Mora και Amann, 2001).

Μέχρι την ανακάλυψη του DNA, η ταξινόμηση των προκαρυωτικών οργανισμών γινόταν αποκλειστικά με βάση τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά (Konstantinidis και Tiedje, 2005). Στις αρχές της δεκαετίας του ’70, στοιχεία της Μοριακής Βιολογίας, άρχισαν να ενσωματώνονται στην Συστηματική Κατάταξη, ώστε να διακρίνονται τα στενά συγγενικά είδη. Ανάλογα με τα κριτήρια που αναφέρονται κάθε φορά, στη βιβλιογραφία μέχρι το 2004, υπάρχουν τρεις προσεγγίσεις για το είδος:

1. **Ταξινομικό είδος** : μια ομάδα μικροβιακών στελεχών ή απομονώσεων που μοιράζονται τα ίδια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και σχηματίζουν έτσι μια διακριτή φαινοτυπικά ομάδα (Colwell και συνεργάτες, 1995).
2. **Γενοτυπικό είδος** : μια ομάδα μικροργανισμών που εμφανίζει υψηλά ποσοστά ομοιότητας στο συνολικό DNA σύμφωνα με πειράματα υβριδισμού.
3. **Ονοματολογικό είδος** : μια ομάδα μικροοργανισμών που μοιράζεται το ίδιο διωνυμικό όνομα (Colwell και συνεργάτες 1995).

Χρήση μοριακών τεχνικών αποκάλυψε μία αρκετά υψηλή προκαρυωτική ποικιλότητα, μη αναμενόμενης αφθονίας ή ακόμα και επικράτισης ομάδων που ήταν προηγουμένως άγνωστες ή θεωρούνταν σπάνιες (Kemp και Aller, 2004). Για το λόγο αυτό δημιουργήθηκε η ανάγκη να αποκαλυφθεί και ο λειτουργικός και οικολογικός ρόλος κάθε μικροβιακής ομάδας μέσα στο οικοσύστημα και να ληφθεί υπόψη και η οικολογική διάσταση της έννοιας του είδους στην Περιβαλλοντική Μικροβιολογία - Μικροβιακή Οικολογία.

Όλες οι αντιλήψεις και προσεγγίσεις για την έννοια του είδους συνυπολογίζουν ένα κοινό πλάισιο ποικιλότητατας, ότι δηλαδή οι προκαρυωτικοί οργανισμοί συγκροτούν ομάδες ομοιότητας σε επίπεδο φαινοτύπου, ταυτότητας, αλληλουχίας, γονιδιακού περιεχομένου και οικολογίας (Λυμπεροπούλου, 2009 και Ward και συνεργάτες, 2008).

1.4 Το γένος *Escherichia* : Γενικά Χαρακτηριστικά

Το γένος *Escherichia coli* ανήκει στη μεγάλη Οικογένεια των εντεροβακτηριακών. Είναι Gram(-) βακτήριο, μη σποριογόνο, προαιρετικά αναερόβιο και με σχήμα βακίλου. Είναι μέλος της ομάδας των μικροοργανισμών, τα οποία ανευρίσκονται στον γαστρεντερικό σωλήνα των

θερμόαιμων ζώων και τα στελέχη του παρέχουν ένα μέρος της μικροβιακά παραγόμενης, βιταμίνης Κ στον ξενιστή τους (Αρσένη Α., 1994, Καραγκούνη-Κύρτσου,1999 και Μαυρίδου και συνεργάτες, 2012)

1.4.1 Ταξινόμηση των ειδών του γένους *Escherichia*

Η βιολογική ταυτότητα του γένους *Escherichia* έχει αλλάξει στα πρόσφατα χρόνια από την κλασική ταξινόμηση βάση φαινοτυπικών ιδιοτήτων, προς τη σύγχρονη ταξινόμηση βάση γονοτυπικών (φυλογενετικών) ιδιοτήτων. Πλέον με την ανάπτυξη της Μοριακής Βιολογίας όπου γίνεται φυλογενετική ανάλυση και τυποποίηση των ειδών ενός γένους βάση του ριβοσωμικού τους RNA, η ταξινόμηση είναι πιο αξιόπιστη. Το γένος *Escherichia* ανήκει στο Βασίλειο των Βακτηρίων, στο φύλο των *Proteobacteria*, στην ομοταξία των *Gamma Proteobacteria*, στην τάξη των *Enterobacterials* και στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae*, ενώ τα πιο χαρακτηριστικά είδη του γένους είναι τα *E.albertii, E.blattae*, *E.coli*, *E.fergusonii*, *E.hermannii*, *E. vulneris* (Πίνακας 1.1) (Αρσένη, 1994).

Πίνακας 1.1: Κλασική ταξινόμηση του γένους *Escherichia:* Αρσένη, 1994, http://en.wikipedia.org

Escherichia	
Επιστημονική Ταξινόμηση	
Βασίλειο	Βακτήρια
Συνομοταξία	Πρωτεοβακτήρια
Ομοταξία	Γαμμαπρωτεοβακτήρια
Τάξη	Εντεροβακτηριώδη
Οικογένεια:	Εντεροβακτηριοειδή
Είδος:	***Escherichia***
Πιο γνωστά είδη	
E. albertii E. coli E. fergusonii	
E. blattae E. hermannii E. vulneris	

1.4.2 Παθογένεια του γένους *Escherichia*

Αρκετά είδη του βακτηρίου *Escherichia* είναι ακίνδυνα, μπορούν να συνυπάρχουν με άλλους οργανισμούς και αποτελούν τον πολυπληθέστερο φυσικό μικροβιακό πληθυσμό του εντέρου του ανθρώπου, ενώ κάποια άλλα στελέχη από συγκεκριμένα είδη είναι παθογόνα για τον άνθρωπο. Είναι γνωστά σαν την πιο κοινή αιτία για τις λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, σημαντική πηγή ασθενειών του γαστρεντερικού σωλήνα, από μια απλή διάρροια μέχρι καταστάσεις παρόμοιες με δυσεντερία, αλλά και ένα μεγάλο εύρος παθολογικών καταστάσεων (Αρσένη, 1994, Καραγκούνη-Κύρτσου **,**1999, Loukiadis και συνεργάτες, 2006, Shelton και συνεργάτες, 2006, Μαυρίδου, 2012).

1.4.3 Το είδος *Escherichia coli*

α) Γενικά Χαρακτηριστικά του είδους *E. coli*

Το *E. coli* ή αλλιώς *Bacillus coli communis* αποτελεί το πιο αντιπροσωπευτικό είδος της οικογένειας των εντεροβακτηρίων, καθώς διαθέτει όλους τους γενικούς χαρακτήρες της. Η κοινή ονομασία που επικράτησε στην ελληνική είναι «*κολοβακτηρίδιο»*. Ανακαλύφθηκε το 1885 από τον Γερμανό παιδίατρο και βακτηριολόγο Theodor Escherich. Αποτελεί το τυπικό πρότυπο για μελέτες Μοριακής Βιολογίας, Γενετικής, φαινομένων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, πλασμιδιακών μελετών και ενζυμολογίας (Αρσένη, 1994, Καραγκούνη- Κύρτσου, 1999).

Πρόκειται για ένα ευρέως διαδεδομένο οργανισμό αφού είναι το κυρίαρχο δυνητικά αναερόβιο βακτήριο του ανθρώπινου εντερικού μικροβιακού φορτίου και πιθανότατα ο διασημότερος μικροοργανισμός στη Μικροβιολογία. (Κολιάης, 1992 και Tortora και συνεργάτες, 2009).

Ο ανθρώπινος εντερικός σωλήνας αποτελεί το φυσικό περιβάλλον του συγκεριμένου μικροοργανισμού όπου αναπτύσσεται ήδη από την εμβρυική ηλικία του ατόμου και προσαρμόζονται δημιουργώντας μία σχέση αμοιβαίας αλληλεξάρτησης (Λεγάκης και συνεργάτες, 1999, Tortora και συνεργάτες, 2009).

Το *E. coli* επιβιώνοντας στις εντερικές λάχνες συνήθως δεν αποτελεί κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία, εκτός και αν πρόκειται για εξασθενισμένα και ανοσοκατεσταλμένα άτομα ή όταν ο πληθυσμός του βακτηρίου υπερβεί κάποια ανώτατα όρια. Όσον αφορά στα παθογόνα στελέχη του είδους, όπως για παράδειγμα ο ορότυπος O157:H7, αυτά δύνανται να προκαλέσουν μεγάλη ποικιλία εντερικών και εξωεντερικών λοιμώξεων, οι οποίες περιορίζονται στις βλεννογόνες επιφάνειες ή εξαπλώνονται σε ολόκληρο το σώμα (Αρσένη, 1994, Nataro & Kaper 1998 Loukiadis και συνεργάτες, 2006 και Liu και συνεργάτες, 2008).

Στο παχύ έντερο του ανθρώπου υπάρχουν δισεκατομμύρια κύτταρα *E. coli*, τα οποία χρησιμοποιούν τις θρεπτικές ουσίες που προέκυψαν από τις τροφές μέσω πέψης και απορροφήθηκαν στο στομάχι και στο λεπτό έντερο. Αξιοποιούν τις ενώσεις αυτές και συνθέτουν αμινοξέα και βιταμίνες για δική τους χρήση, αλλά κάποια από τα προϊόντα αυτά περνούν στην κυκλοφορία του αίματος και χρησιμοποιούνται και από τον άνθρωπο. Τα βακτήρια αυτά αποτελούν την κύρια πηγή της βιταμίνης Κ. Επίσης λειτουργούν ανταγωνιστικά ως προς την εγκατάσταση άλλων παθογόνων μικροοργανισμών στο έντερο (Durso και συνεργάτες, 2004). Το *E. coli* αυξάνεται πολύ εύκολα σε ποικίλα θρεπτικά υλικά και το γενετικό του υλικό μπορεί εύκολα να τροποποιηθεί με τους μηχανισμούς της Γενετικής Μηχανικής (Alberts και συνεργάτες, 2000).

Παράλληλα, ανευρίσκεται φυσιολογικά στον εντερικό σωλήνα πολλών θερμόαιμων ζώων, όπως είναι τα βοοειδή, τα αιγοπρόβατα, οι χοίροι, οι σκύλοι κ.α. Η παρουσία του στο νερό ή στα τρόφιμα θεωρείται ότι δηλώνει την άμεση ή έμμεση κοπρανώδη μόλυνση από λύματα και την πιθανή παρουσία άλλων παθογόνων. Από τη στιγμή που ο Escherich ταυτοποίησε το *E.coli* πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για να οριστεί η υγειονομική σημασία του μικροοργανισμού αυτού ως δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης (Saenz και συνεργάτες 2001, McLellan 2004, Mora και συνεργάτες 2004, Pearce και συνεργάτες 2004). Η ταυτοποίηση του *E. coli* έχει σημασία διότι: α) Είναι ένας μικροοργανισμός δυνητικά παθογόνος που πρέπει να διακριθεί από τα εντερικά παθογόνα και β) Η παρουσία της σε αποθέματα νερού είναι ένδειξη κοπρανώδους μόλυνσης (Spicer, 2000).

β) Μορφολογικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου Ε. coli

Εικόνα 1.1: α) Στελέχη *E. coli* O157:H7 β) Στελέχη *E. coli* σε κατάσταση σύζευξης (Βενιέρη, 2005)

Πρόκειται για Gram αρνητικό αερόβιο μη σπορογόνο βακτήριο, πάχους 0,5 μm, μήκους 1-5 μm. (Αρσένη, 1994). Ο όγκος του κυττάρου είναι 0,6-0,7 μm^3. Είναι περίτριχο, κινητό, ενώ παράλληλα υπάρχουν και ακίνητα στελέχη Παράγει ένα πολύ λεπτό έλυτρο, το οποίο στα μη κινούμενα στελέχη είναι παχύτερο και μοιάζει με πραγματική κάψα (Εικόνα 1.1).Τα ινίδια που παράγονται από το σύνολο των στελεχών *E. coli* διακρίνονται στα προσκολλητικά και τα συζευκτικά (Neidhardt, 1996 και Λεγάκης 1999, Μαυρίδου και συνεργάτες, 2012).

γ) Βιοχημικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου *E. coli*

Οι βιοχημικές, δηλαδή οι σακχαροδιασπαστικές και οι άλλες ενζυμικές - βιολογικές, ιδιότητες του *E. coli* καθώς και όλων των άλλων εντεροβακτηριακών αποτελούν σταθερό γνώρισμα που επιτρέπει την φαινοτυπική ταυτοποίηση των συγκεκριμένων μικροοργανισμών (Πίνακας 1.1). Οι τυπικές βασικές βιοχημικές ιδιότητες του *E.coli* είναι οι εξής :

Πίνακας 1.2 : Οι βασικές βιοχημικές εξετάσεις της *E. coli*

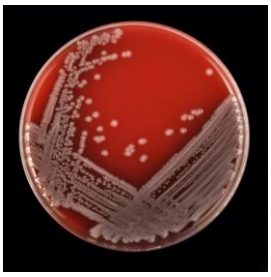
Ινδόλη (+)	**PPA (-)**	**M.R. (+)**
Λακτόζη (+)	VP. (-)	ONPG (+)
Κιτρικά (-)	Λυσίνη (+)	KCN (-)
Ορνιθίνη (+/-)	NO_3 (+)	Αργινίνη (-/+)
^S (-)	Οξειδάση (-)	Ουρία (-)

Εκτός από τις παραπάνω βασικές βιοχημικές ιδιότητες το *E. coli* ζυμώνει διάφορα σάκχαρα εκτός της γλυκόζης και της λακτόζης όπως τη μαλτόζη, τη μανιτόλη, τη σορβιτόλη και αρκετά στελέχη ζυμώνουν τη σουκρόζη, τη σαλικίνη και τη δουλσιτόλη. Αντίθετα δεν πραγματοποιείται ζύμωση του ινοσίτη και της αδενιτόλης (Πινακας 1.2). Κάνει πολυοξειδωτικές ζυμώσεις σε αναερόβιες συνθήκες παράγοντας γαλακτικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ, αιθανόλη, οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα. Πολλά μεταβολικά μονοπάτια πολυοξειδωτικών ζυμώσεων παράγουν αέριο υδρογόνο, οπότε απαιτείται τα επίπεδα υδρογόνου να είναι χαμηλά όπως συμβαίνει στην περίπτωση που το *E. coli* συνυπάρχει με οργανισμούς που καταναλώνουν υδρογόνο (μεθανοβακτήρια και θειαναγωγικά βακτήρια) (Spicer, 2000). Οι διαφορές που παρατηρούνται στις σακχαροζυμωτικές ιδιότητες επιτρέπουν τον διαχωρισμό των *E. coli* σε διάφορους τύπους. Μερικές από τις σακχαρολυτικές και λοιπές ιδιότητες συμβαδίζουν με ορισμένους αντιγονικούς (ορολογικούς) χαρακτή ρες (Αρσένη, 1994, Χαρβάλου, 2007).

Όσον αφορά στην ταυτοποίηση στελεχών *E. coli* έχει διαμορφωθεί μεγάλος αριθμός βιοχημικών δοκιμών, οι οποίες εφαρμόζονται αυτοματοποιημένα υπό τη μορφή συστημάτων και kit (έτοιμες τυποποιητικές διαδικασίες). Ένα από τα πλεόν καθιερωμένα συστήματα ταυτοποίησης είναι και το API 20E (API Biomerieux, Lyon, France), το οποίο συνδυάζοντας 20 βιοχημικές δοκιμασίες δύναται να ταυτοποιεί 94% των εντεροβακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου και του *E. coli.* Ενδεικτικά αναφέρονται και τα Enterotube II (Roche Diagnostics) και το Minitek System (Becton & Dickinson Microbiology System, USA) (Samadpour και συνεργάτες, 2005, Χαρβάλου, 2007).

δ) Φυσιολογικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου *E. coli*

Αναπτύσσεται σε όλα τα κοινά θρεπτικά υποστρώματα και σε πολλά εκλεκτικά. Στο γενικό στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient άγαρ, οι αποικίες του είναι λείες, ελαφρώς υπερυψωμένες με καμπύλη, διαμέτρου μέχρι 2 mm, είτε με σκληρή είτε με γλοιώδη υφή (Καραγκουνη, 2001). Στο αιματούχο άγαρ είναι γκριζωπές και σε πολλά στελέχη οι αποικίες, περιβάλλονται από λεπτή ζώνη αιμόλυσης. Στο άγαρ MacConkey, εμφανίζονται αποικίες χρώματος βυσσινί εξαιτίας της ζύμωσης της λακτόζης, η οποία προκαλεί αλλαγή του χρώματος του ουδέτερου ερυθρού που περιέχεται στο θρεπτικό αυτό υπόστρωμα. Στο άγαρ με δεσοξυχολικό και λακτόζη (DCA) οι αποικίες είναι ακόμη μικρότερες, συμπαγέστερες και κόκκινες. Στον θρεπτικό ζωμό προκαλεί διάχυτη θολερότητα είτε με παχύ ίζημα είτε με κροκυδώδη ανάπτυξη (Αρσένη 1994, Nataro & Kaper 1998, Πόγκας, 2008).



Εικόνα 1.2 : Ανάπτυξη *E. coli* σε θρεπτικό υπόστρωμα Mac Conkey και Αιματούχο άγαρ. (Hart και Sheans, 2000)

Το *E. coli* απομονώνεται εύκολα από κλινικά δείγματα με τη χρήση εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων κατόπιν επώασης στους 37 °C υπό αερόβιες συνθήκες αλλά κάποια «εργαστηριακά» στελέχη μπορούν να αναπτυχθούν και σε θερμοκρασίες μέχρι και 49 °C. Όταν πρόκειται για κοπρανώδες υλικό χρησιμοποιείται κυρίως το *MacConkey* άγαρ (Εικόνα 1.2) ή άγαρ με μπλε του μεθυλενίου *(eosin methylene-blue),* τα οποία επιτρέπουν την εκλεκτική ανάπτυξη μελών της οικογένειας *Enterobacteriaceae* κι ευνοούν τη διαφοροποίηση εντερικών οργανισμών βάσει της μορφολογίας τους *(*Αρσένη, 1994 και Samadpour και συνεργάτες, 2005).

Η μικροσκόπική παρατήρηση του βακτηρίου σε νωπό υλικό και η παρατήρηση με χρώση Gram δείχνουν ότι το βακτήριο έχει κίνηση και είναι

Gram αρνητικό. Στην Εικόνα 1.3 φαίνεται ένα παρασκεύασμα στελέχους αναφοράς του βακτηρίου *E. coli* από to Health Protection Agency (HPA).

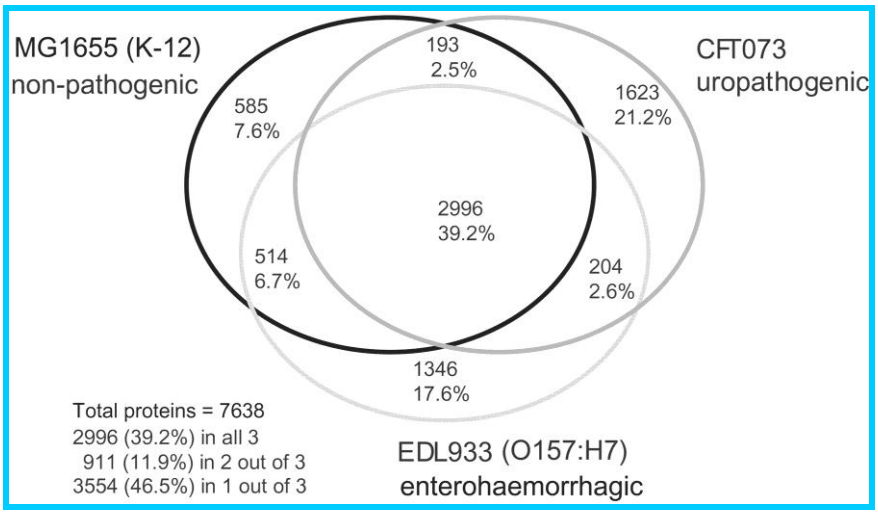
Εικόνα 1.3: Εικόνα από φωτονιακό μικροσκόπιο στελέχους αναφοράς *E. coli* μετά από χρώση Gram.

Ένα βασικό παράδειγμα είναι το στελέχος *E. coli* O157.

Η τυπική διάγνωση παρουσίας του βακτηρίου γίνεται με καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα σορβιτόλης-MacConkey και στη συνέχεια, η τυποποίηση του γίνεται με χρηση αντιορού. Ωστόσο, δοκιμές ανοσοαποτύπωσης (λάτεξ) και κάποιοι ανοσοτυποποιητικοί αντιοροί έχουν δώσει αμφισβητούμενα αποτελέσματα. Επίσης υπάρχουν στελέχη που δεν ζυμώνουν τη σορβιτόλη (Λεγάκης, 1999 και Πόγγας, 2008). Άλλες μέθοδοι για την ανίχνευση του στελέχους *E. coli* O157 στα κόπρανα, περιλαμβάνουν δοκιμές με τη μέθοδο ELISA, την ανοσοαποτύπωση αποικιών, την άμεση μικροσκοπική παρατήρηση με ανοσοφθορισμό, καθώς και τεχνικές ανοσομαγνητικού διαχωρισμού. Οι μέθοδοι αυτοί έχουν σχεδιαστεί ως εργαλείο ανίχνευσης για να καταστεί δυνατή η ταχεία εξέταση παρουσίας του *E. coli* O157 χωρίς προηγούμενη καλλιέργεια του δείγματος κοπράνων (Paton & Paton,1998, Tortora, 2009). Τα τελευταία χρόνια η χρήση Μοριακών τεχνικών στα περιβαλλοντικά δείγματα για την ανίχνευση του συγκεκριμένου βακτηρίου είναι πολύ διαδεδομένη είτε συμπληρωματικά με τη καλλιέργεια είτε απευθείας από το δείγμα ώστε να ξεπεραστεί το πρόβλημα των ζώντων αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων (Loukiadis και συνεργάτες, 2006 και Liu και συνεργάτες, 2008).

ε) Γενετικά Χαρακτηριστικά του βακτηρίου *E. coli*

Η χαρτογράφηση πολλών στελεχών του είδους *E. coli* έχει αποδειχθεί ότι ο μικροοργανισμός αυτός έχει περίπου 4.000 γονίδια, αριθμός εξαρτώμενος από κάθε στέλεχος. Τα γονίδια αυτά βρίσκονται στο κεντρικό κυκλικό χρωμόσωμα που διαθέτει, το οποίο απαρτίζεται από δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA συνολικού περίπου μήκους 4 x 10^6 ζεύγη βάσεων (bp) (Εικόνα 1.4)
Η χαρτογράφηση του γενετικού υλικού του *E. coli* αποτέλεσε σημαντική εξέλιξη σε τομείς της Ιατρικής και Βιολογικής έρευνας (Blattner και συνεργάτες, 1997 και Touchon και συνεργάτες, 2009).



Εικόνα 1.4: Χρωμοσωμικό γενετικό υλικό 3 στελεχών *E.coli*

Στις καλλιέργειες του *E. coli* υπάρχουν πάντοτε στελέχη που έχουν υποστεί μεταλλάξεις οπότε διαθέτουν διαφορετικές ιδιότητες από ότι άλλα μέλη του είδους. Τα βακτήρια με τις μεταλλαγές αυτές δεν παρουσιάζουν φαινότυπο. Σε δυσμενείς όμως συνθήκες επικρατούν και αναπτύσσονται *κλώνοι* με σταθερούς φαινοτυπικούς χαρακτήρες όπως π.χ βιοχημικούς, σακχαροδιασπαστικούς ή αντιγονικούς. Κλώνοι ονομάζονται στελέχη οργανισμών στα οποία δεν διακρίνονται διαφορές στο γενετικό τους υλικό με την εφαρμογή μεθόδων όπως είναι η ανάλυση ριβοτύπου ή η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Ο μεγάλος βαθμός ομοιότητάς τους ενισχύει την υπόθεση ότι προέρχονται από κοινό προγονικό κύτταρο (Tenover και συνεργάτες, 1995 και van Belkum και συνεργάτες, 2007).

Με αυτόν τον τρόπο εξηγείται και η έντονη διαφορά μεταξύ των «αγρίων», δηλαδή ελεύθερων περιβαλλοντικών στελεχών του *E.coli* που απομονώνονται από περιβαλλοντικά δείγματα και αυτών που απομονώνονται από των νοσοκομειακών ασθενών (Amábile-Cuevas και συνεργάτες, 2010)
Το *E. coli* είναι από τα μικρόβια που πολύ εύκολα δέχεται πλασμίδια, τα οποία είναι σε θέση να μεταδώσει, δεδομένου ότι τα F+ στελέχη του παράγουν συζευκτικά ινίδια, μέσω των οποίων πραγματοποιούνται γενετικές συζεύξεις. Οι συζεύξεις λαμβάνουν χώρα όχι μόνο με F-στελέχη άλλων στελεχών *E.coli* αλλά και με F-στελέχη άλλων εντεροβακτηρίων (Schubert και συνεργάτες, 2009)

Οι Blattner και οι συνεργάτες του (1997), από το Εργαστήριο Γενετικής στο Πανεπιστήμιο του Wisconsin-Madison προσδιόρισαν την πλήρη αλληλουχία του γονιδιώματος του ***E. coli* K12** (MG1655).

Το στέλεχος αυτό είναι ένας τύπος που δεν διασπά τη λακτόζη αλλά σε 48ωρη καλλιέργεια, παρουσία λακτόζης, δημιουργούνται μεταλλαγμένα στελέχη του που τη διασπούν. Είναι πολύ ευαίσθητο σε γενετικές επιδράσεις και χρησιμοποιείται σε πλασμιδιακές και κυρίως σε γενετικές μελέτες, δεδομένου ότι είναι το ευπαθέστερο σχήμα (vector) γενετικού υλικού στις μεθόδους ανάλυσης του DNA διαφόρων μικροοργανισμών (Αρσένη, 1994, Riley, 2006, Touchon και συνεργάτες, 2009). Πρόσφατα χρησιμοποιήθηκε μελέτη της ανθεκτικότητας που απέκτησαν στελέχη *E.coli* K12 μετά από έκθεση σε χλωριούχο βενζαλκόνιο. (Bore και συνεργάτες, 2007)

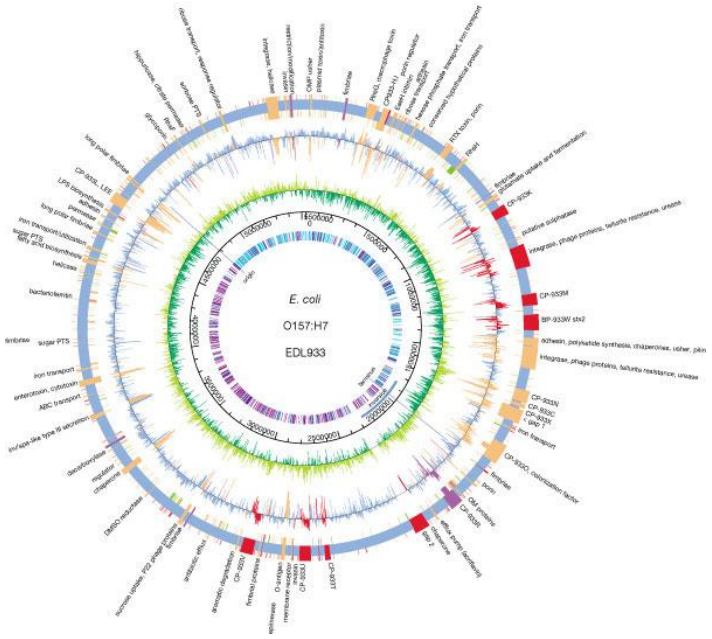
Το στέλεχος αυτό έχει αλληλουχία 4.639.221 ζεύγη βάσεων (Πίν. 1.3) Από τα 4288 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, στο 38% δεν έχει αποδοθεί κάποια λειτουργία. Το γονιδίωμα ακόμα περιέχει IS αλληλουχίες, υπολείμματα φάγων και πολλά άλλα κομμάτια ασυνήθιστης σύνθεσης υποδεικνύοντας τη γονιδιακή ευελιξία κατά την οριζόντια μεταφορά του γενετικού υλικού (Perna και συνεργάτες, 2001 & Touchon και συνεργάτες, 2009).

Πίνακας 1.3: Γενικά χαρακτηριστικά γονιδιώματος στελέχους *E .coli* K12

Chromosome features	*E. coli* K-12 MG1655
Genome Size (bp)	4 639 675
G+C content (%)	50.8
rRNA operons	7 (+5S)
tRNA genes	86
Total Protein-coding genes[a]	4306
Pseudogenes[b] (nb)	81
Protein coding density[c]	85.7
Assigned function[d] (%)	80
Conserved hypothetical (%)	12.5
Orphans (%)	7.5
IS-like genes (nb)	66
Phage-associated genes (nb)	231

Τα τελευταία χρόνια γίνεται αλληλούχιση όλο και περισσότερων στελεχών *E. coli* (Touchon και συνεργάτες, 2009, http://www.genome.wisc.edu).

Έχει γίνει η αλληλούχιση του εντεροαιμορραγικού στελέχους ***E. coli* O157:H7** (Εικόνα 1.5), το οποίο προκαλεί αιμορραγική κολίτιδα και έχει απομονωθεί από πολλές αντίστοιχες επιδημίες αλλά και σύγκριση του γονιδιώματος του με το μη παθογόνο στέλεχος *E. coli* K12 (Hayashi και συνεργάτες, 2001 & Xiong και συνεργάτες, 2012).



Εικόνα 1.5: Γονιδίωμα *E. coli* O157:H7 (Perna και συνεργάτες, 2001)

Το 2011 έγινε αλληλούχιση του στελέχους ***E. coli* O104:H4**, το οποίο ενοχοποιήθηκε για την επιδημία με διάρροιες και αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο στη Γερμανία το Μάιο του 2011. Το στέλεχος αυτό φαίνεται να φέρει γονίδια από 2 κατηγορίες παθογόνων *E. coli* (EHEC και EAEC), δημιουργώντας ένα «υβριδικό» στέλεχος EAHEC (Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli*) (CDC, 2011 και Mellmann και συνεργάτες, 2011). Το στέλεχος αυτό φαίνεται να έχει ένα στρογγυλό χρωμόσωμα μήκους 5,278 kbp και 3 επιπλέον πλασμίδια 88 kbp, 75 kbp και 1.5 kbp σε μέγεθος αντίστοιχα. Το χρωμόσωμα περιέχει περίπου 5.000 κωδικοποιούμενες αλληλουχίες, καλύπτοντας το 87,09% του γονιδιώματος (Brzuszkiewicz και συνεργάτες, 2011 και Laing και συνεργατες, 2012).

<u>ERIC αλληλουχίες</u>

Τα εντεροβακτήρια έχουν στο γονιδίωμά τους τις Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) αλληλουχίες (Εικόνα 1.6). Οι ακολουθίες αυτές είναι μικρές, υψηλά συντηρημένες, μη κωδικοποιημένες επαναλαμβανόμενες περιοχές μέσα στο γονιδίωμα των οποίων η λειτουργία δεν εχει διευκρινιστεί (Versalovic και συνεργάτες, 1994 και Meachm και συνεργάτες, 2003).

```
            10        20        30        40        50        60
             |         |         |         |         |         |
5':TATACCCAAAATAATTCGAGTTGCAGCAAGGCGGCAAGTGAGTGAAT-CCCCAGGAGCTTACAT
   |||||||   ||| |||:||:||||||   |  |   |:|  :|  : ||||||  :|||||  )
3':ATATGGGCAGTATAAAGTTCGACGTCGACGCAACCGACGCAAGCGAGTGGGGTCAGTGAATGAA
          |         |         |         |         |         |
         120       110       100        90        80        70
```

Εικόνα 1.6 : Η αλληλουχία ERIC (Wilson και Sharp, 2006).

Οι ERIC αλληλουχίες περιγράφηκαν πρώτα στο βακτήριο *Escherichia coli*, στη *Salmonella enterica* serovar και *Typhimurium* spp και σε άλλα εντεροβακτηριακά είδη. Η ERIC ακολουθία είναι ένα ατελές παλίνδρομο 126-127 ζεύγη βάσεων. Οι αλληλουχίες αυτές έχουν βρεθεί μόνο σε περιοχές ανάμεσα σε γονίδια, προφανώς μεταξύ μεταγραφόμενων περιοχών (Wilson & Sharp, 2006, Rademaker και συνεργάτες, 2008). Ο αριθμός των αντιγράφων της ERIC αλληλουχίας ποικίλει ανάμεσα στα διάφορα είδη. Στο *E. coli* K-12 υπολογίζονται περίπου 30 αντίγραφα (Hulton και συνεργάτες, 1991). Οι αλληλουχίες αυτές παρουσιάζουν έντονο ενδιαφέρον, διότι χρησιμοποιούνται

σαν τη βάση μίας τεχνικής αποτυπώματος βακτηριακών γονιδιωμάτων (Versalovic και συνεργάτες, 1994, Olive & Bean, 1999 και Rademaker και συνεργάτες, 2008).

ε) Ορολογικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου *E. coli*

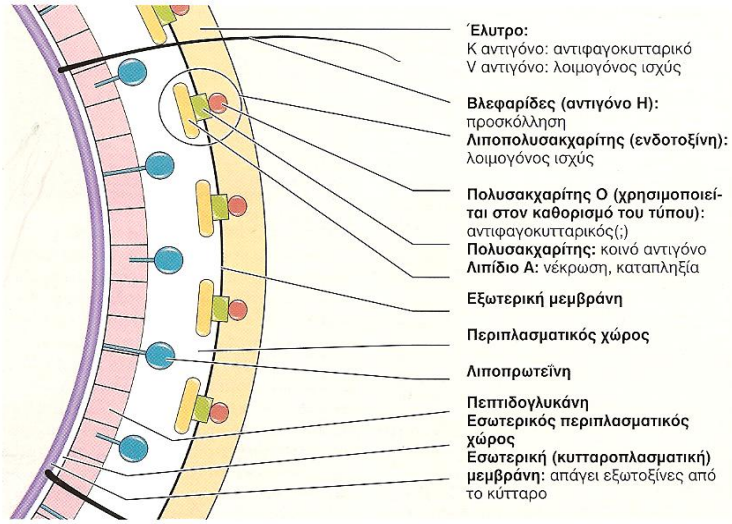
Μια κλασική μέθοδος ταυποίησης του *E. coli*, που χρησιμοποιείται ευρέως σε εργαστήρια και νοσοκομεία, είναι η οροτυποίηση βάση του σωματικού αντιγόνου-Ο , του βλεφαριδικού αντιγόνου Η και του αντιγόνου του ελύτρου Κ, με έτοιμους αντιορούς με πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα που κυκλοφορούν στο εμπόριο (Van Belkum και συνεργάτες, 2007). Η αντιγονική δομή του βακτηρίου *E. coli* είναι η τυπική των Gram αρνητικών βακτηρίων (Εικόνα 1.7). Αντιγονικές ιδιότητες έχουν πολλές από τις ουσίες του κυτταρικού τοιχώματος, της κάψας και των βλεφαρίδων και λιγότερο ουσίες από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Παράλληλα, ως αντιγόνα συμπεριφέρονται μερικές από τις τοξίνες που παράγει το ίδιο το βακτήριο με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα. Οι κυριότερες ομάδες αντιγόνων βάσει των οποίων προκύπτουν οι διάφοροι ορότυποι του *E. coli* είναι οι εξής:

1. Αντιγόνα σωματικά ή αντιγόνα-Ο (>170 είδη)
2. Αντιγόνα βλεφαρίδων ή αντιγόνα-Η (>50 είδη)
3. Αντιγόνα ελύτρου ή αντιγόνα-Κ (>100 είδη)

Με τα τρία αυτά αντιγόνα 0, Κ και Η προσδιορίζεται το αντιγονικό πρότυπο του κάθε στελέχους *E. coli*, όπως για παράδειγμα 026: Κ40: Η12 (Λεγάκης, 1999 και Πόγγας, 2008).

Παρά το γεγονός ότι θα μπορούσαν να γίνουν άπειροι συνδυασμοί των αναφερομένων αντιγόνων, λίγοι ορότυποι απαντούν στις νόσους σε αντίθεση με το φυσικό περιβάλλον όπου υπάρχουν πολλοί περισσότεροι. Η ομαδοποίηση των *E. coli* στους ποικίλους οροτύπους πραγματοποιείται περισσότερο για λόγους ταυτοποίησης. Συγκεκριμένες ορολογικές ομάδες συσχετίζονται με συγκεκριμένους παθολογικούς κλώνους σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Nataro και Kaper 1998). Έχουν παρατηρηθεί διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ Ο-αντιγόνων του *E. coli* και των Ο-αντιγόνων άλλων

βακτηρίων όπως του γένους *Salmonella*, *Shigella* και *Citrobacter* (Λεγάκης, 1999 και Loukiadis και συνεργάτες, 2006).



Εικόνα 1. 7 : Δομή μεμβράνης κυτταρικού τοιχώματος *E. coli* (Spicer, 2000).

Το σωματικό αντιγόνο Ο είναι μία πολυμερισμένη αλυσίδα σακχάρου του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) που βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα. Το λιπιδικό τμήμα του μορίου είναι το λιπίδιο Α που αποτελεί και το τοξικό τμήμα του λιποπολυσακχαρίτη. Ωστόσο όλο το σύμπλεγμα του μορίου LPS θεωρείται βιολογικά ενεργό και προκαλεί πυρετό, λευκοκυττάρωση. ενεργοποίηση του συμπληρώματος, θρομβοκυτταροπενία, διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, καταπόνηση και θάνατο.

Τα βλεφαριδικά αντιγόνα Η είναι ουσίες πρωτεϊνικής φύσεως, ενώ τα αντιγόνα του ελύτρου Κ είναι πολυσακχαριδικά ή σπανιότερα πρωτεϊνικά (Εικόνα 1.7). Μερικά από τα Κ αντιγόνα έχουν σχέση με συγκεκριμένες λοιμώξεις του μικροβίου. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί το αντιγόνο Κ1 που βρίσκεται στο 80% των στελεχών *E. coli* που απομονώνονται από τη νεογνική μηνιγγίτιδα και τη σηψαιμία (Λεγάκης Ν. 1999 και Πόγγας, 2008).

1.4.4 Παράγοντες δημιουργίας νέων στελεχών *E. coli*

Οι διαφορές που παρατηρούνται στις σακχαρολυτικές ιδιότητες, επιτρέπουν τον διαχωρισμό των στελεχών *E.coli* σε διάφορους οροτύπους (Πίνακας 1.4α και 1.4β). Ορισμένες από τις σακχαρολυτικές και λοιπές ιδιότητες

συμβαδίζουν με ορισμένους αντιγονικούς (ορολογικούς) χαρακτήρες. (Αρσένη, 1994, Loukiadis και συνεργάτες, 2006).

Πίνακας 1.4a : Οροτυποι παθογόνων στελεχών *E. coli* (Αρσένη, 1994

Εντεροτοξινο-γόνοι ETEC	Εντεροπαθο-γόνοι EPEC	Εντεροδιει-σδυτικοί EIEC	Εντεροαιμοραγικοί ή νερο-τοξινογόνοι EHEC ή VTEC		Ουροπα-θογόνοι	Μινιγγί-τιδας Σηψαιμίας
O6:H16	O26:H –	O28ac:H –	O1	O115	O1:K1	O1:K1
O8:H9	O26:H11	O29:H –	O2:H5	O118	O6	O3
O8:H2	O55:H6,H7,H –	O112ac:H –	O2:H7	O121	O18:K1	O4
O11:H27	O86:H –	O115	O4:H10,H –	O125	O4	O8
O15:H11,H –	O86:H2,H34	O124:H7	O5:H16,H –	O126	O7	O9
O20:H –	O111ab:H2	O124:H30	O6:H1	O128	O75:K1	
O25:H2,H –	H12,H21	O135	O18:H7,H –	O145	O16:K1	
O27:H7,20	O114:H2	O136	O25	O146	O1	
O63:H12	O125ac:H21	O143	O26	O153	O2	
O78:H11,H11	O127:H –	O144	O38	O157:H –		
O85:H7	H6,H9,H21	O152	O39	O157:H7		
O114:H21	O128ab:H2	O164	O45	O163		
O115:H21,H40	O142:H6	O167	O50	O165		
O126:H9	O158:H23		O55:H7,H10			
O128ac:H7			O82			
H12,H21			O84			
O148:H28			O91			
O149:H4			O103			
O159:H20			O41			
O166:H27			O113			
O167:H5			O114			

Πίνακας 1.4b : Οροτυποι παθογόνων στελεχών *E. coli (*Loukiadis και συνεργάτες, 2006).

Strain	Pathotype (species[a])	Serotype	Virulence factors screened	Accession no. or reference[b]
MG 1655	*E. coli* K-12[c]	Orough:H48		U00096
RIMD 050992	EHEC (human)	O157:H7	*eae* (conserved region), stx_1, stx_2 (conserved region)	16
B2F1	EHEC (human)	O91:H21	$stx_{2vh\text{-}a}$, $stx_{2vh\text{-}b}$, stx_2 G1, *saa*[d]	31
CF11201	EPEC (human)	O125:H–	*eae*-η	38
CL37	EHEC (human)	O111:H8	*eae*-θ	38
H-19	EHEC (human)	O26:H11	*eae*-β_1	29
E 2348/69	EPEC (human)	O127:H6	*eae*-α_1, *bfpA*	29
EDL 933	EHEC (human)	O157:H7	*eae*-γ_1, $stx_{2\text{-EDL933}}$, *ehxA*, *toxB*, $fliC_{h7}$	29
ICC95	EPEC (human)	O86:H34	*eae*-β_2/δ	29
PMK5	EHEC (human)	O103:H2	*eae*-ε, stx_1	29
S1191	STEC (pig)	O139:H–	stx_{2e}	2
EF73	EPEC (human)	O125:H6	*eae*-α_2	29
95NR1	Nonpathogenic *E. coli*	O111:H–	*eae*-γ_2	29
4795/95	STEC (human)	O84:H4	*eae*-ζ	38
6044/95	EHEC (human)	O118:H5	*eae*-κ	38
7476/97	EHEC (human)	O145:H4	*eae*-ι	38

Κάθε στέλεχος του βακτηρίου *E. coli* έχει μοναδικά χαρακτηριστικά, τα οποία το διαχωρίζουν από τα υπόλοιπα στελέχη του. Οι διαφορές αυτές, συχνά ανιχνεύονται μόνο σε μοριακό επίπεδο. Ωστόσο μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές στη φυσιολογία και στον κύκλο ζωής του βακτηρίου. Π.χ ένα στέλεχος μπορεί να αποκτήσει μία παθογόνο ικανότητα ή την ικανότητα να

είναι ανθεκτικό σε διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Διαφορετικά στελέχη *E. coli* συχνά είναι ειδικά για κάποιους ξενιστές, καθιστώντας έτσι εύκολο τον καθορισμό της πηγής προέλευσης της κοπρανώδους μόλυνσης στα περιβαλλοντικά δείγματα (Αρσένη, 1994, Μαυρίδου και συνεργάτες, 2012).

Κατά τη μελέτη όμως πληθυσμών του βακτηρίου ένα βασικό ερώτημα που τίθεται είναι το κατά πόσο είναι προφανή τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όταν αυτό αναπτύσσεται σε εργαστηριακές συνθήκες. Η υπάρχουσα ποικιλότητα είτε αμβλύνεται κατά την ανάπτυξη του πληθυσμού και τη διαίρεση των κυττάρων είτε καταλήγει στη δημιουργία επιγενετικών αλλαγών, ικανών να δημιουργήσουν ετερογένεια στους κλώνους. Ένας ετερογενής πληθυσμός ενδέχεται να έχει προκύψει κατόπιν μεταλλάξεων, συμπεριλαμβανομένων των αναστροφών και των ενθέσεων, οι οποίες λαμβάνουν χώρα με συχνότητα 1 στις 10^1 κυτταρικές διαιρέσεις (Schaechter, 2001). Η ετερογένεια των πληθυσμών *E. coli* αποτελεί συχνά αντικείμενο μελέτης επιδημιολογικών κυρίως ερευνών, στόχος των οποίων είναι η τυποποίηση στελεχών απομονωμένων από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα (Khan και συνεργάτες, 2002, Wiggins και συνεργάτες, 2003, Bryan και συνεργάτες, 2004, Hayes και συνεργάτες, 2004, Maynard και συνεργάτες, 2004, Bettelheim και συνεργάτες, 2005, Βενιέρη, 2005).

1.4.5 Θεραπευτική χρήση μη παθογόνων στελεχών *E. coli*

Το μη παθογόνο στέλεχος *Escherichia coli* Nissle 1917 επίσης γνωστό ως Mutaflor χρησιμοποιείται ως προβιοτικός παράγοντας στην Ιατρική, κυρίως για την πρόληψη διαφόρων γαστρεντερικών παθήσεων συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου (Grozdanov και συνεργάτες, 2004). Ωστόσο, υπάρχουν λίγες βιβλιογραφικές αναφορές για το θεραπευτικό του ρόλο σε πρότυπα ζώων με κολίτιδα και οι θεραπευτικοί μηχανισμοί δεν είναι τελείως γνωστοί (Kamada και συνεργάτες, 2005 και Kamada και συνεργάτες, 2008). Συγκεκριμένα, ο Kamada και οι συνεργάτες του μελέτησαν το συγκεκριμένο στέλεχος και ο σκοπός της εργασίας τους

ήταν η διευκρίνιση της θεραπευτικής του δράσης αλλά και του μηχανισμού δράσης του Nissle 1917, χρησιμοποιώντας πρότυπα ποντικιού με οξεία και χρόνια κολίτιδα. Τα συμπεράσματα της μελέτης τους ήταν ότι το μη παθογόνο αυτό στέλεχος, προλαμβάνει και την οξεία αλλά και την χρόνια κολίτιδα και η αντιφλεγμονώδης δράση του φαίνεται όχι μόνο από το βακτήριο σε ζωντανή μορφή αλλά και από αδρανοποιημένα βακτήρια από θερμικό σοκ ή μόνο με το DNA τους (Kamada και συνεργάτες, 2005).

Οι ίδιοι ερευνητές, μελέτησαν την αντιφλεγμονώδη δράση του βακτηρίου σε φλεγμονώδεις καταστάσεις in vitro για να προσδιορίσουν τον μηχανισμό καταστολής του στον μηχανισμό δημιουργίας της φλεγμονής (Kamada και συνεργάτες, 2008).

1.4.6 Παθογένεια- Νόσοι από *E. coli*

Το βακτήριο *E. coli* είναι δυνητικά ή ευκαιριακά παθογόνος μικροοργανισμός. Προκαλεί εντερικές ή εξωεντερικές λοιμώξεις με μηχανισμούς που ποικίλλουν όσον αφορά στους μικροβιακούς παράγοντες όπως τοξίνες, ένζυμα, προσκολλητίνες, παράγοντες αποικισμού, πλασμίδια και βακτηριοφάγους που ενισχύουν την επιθετικότητα ή την ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού σε κάθε είδους ανταγωνιστές (Αρσένη, 1994 και Liu και συνεργάτες, 2008). Η πηγή των μικροοργανισμών από τους οποίους θα προκληθεί η νόσος είναι είτε εγγενές εντερικό μικροβιακό φορτίο είτε ένας πάσχων ασθενής ή φορέας παθογόνου στελέχους *E. coli*, τοξινογόνου ή φέροντος ειδικό πλασμιδιακό ή βακτηριοφαγικό φορτίο, δεδομένου ότι οι περισσότεροι παθογενετκοί χαρακτήρες της *Escherichia* spp προσδιορίζονται από εξωχρωμοσωμικά γονίδια (http: //ecoli.bham.ac.uk/ path/sero.html 2005).
Νέα στελέχη *E. coli* εξελίσσονται μέσω της φυσικής βιολογικής διαδικασίας της μετάλλαξης και της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Schubert και συνεργάτες, 2009). Αυτά τα παθογόνα στελέχη τυπικά προκαλούν διάρροια, στους ενήλικες και συχνά θανατηφόρο για τα παιδιά στις αναπτυσσόμενες χώρες (Rangel και συνεργάτες, 2005). Ιδιαίτερα ευπαθή είναι τα εξασθενημένα ή ανοσοκατεσταλμένα άτομα (Schaechter, 2001 και Μαυρίδου και συνεργάτες, 2012).

Το βακτήριο *E.coli* αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά υδατογενή παθογόνα που μεταδίδονται μέσω της κοπρανοστοματικής οδού και προκαλεί αρκετές ασθένειες όπως για παράδειγμα λοιμώξεις του εντέρου και των ουροφόρων οδών. Εξαιτίας του μεγάλου ποσοστού των υδατογενών επιδημιών που οφείλονται στο *E.coli,* αποτελεί τον κύριο δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης. Για την υγεινή των υδάτων έχει υιοθετηθεί και εφαρμοστεί η παρακάτω νομοθεσία ανάλογα με την προέλευση του νερού. Τα επιτρεπτά όρια για το *Escherichia coli* είναι:

1. Πόσιμο νερό δικτύου ύδρευσης (WHO 2002 98/83 EC) :
E.coli / 100 ml : απουσία

2. Κολυμβητικές δεξαμενές (Υγειονομική Διάταξη Γ1/443/73 (ΦΕΚ 87Β)
Κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή *E.coli* / 100 ml : απουσία (Παπαπετροπούλου και Μαυρίδου, 1995)

Οι χαρακτήρες παθογονικότητας του βακτηρίου *E. coli* εκτός από το λιποπολυσακχαρίτη και το Κ-αντιγόνο είναι: α) οι εντεροτοξίνες, β) οι αιμολυσίνες, γ) οι προσκολλητίνες, δ) οι τοξικές αντιγονικές ουσίες, ε) η διεισδυτικότητα κ.ά. (Λεγάκης και συνεργάτες, 1999 και Μαυρίδου και συνεργάτες, 2012).
Αναλόγως των παραγόντων αυτών τα βακτήρια *E. coli* διαχωρίζονται στις ακόλουθες ομάδες:

1. Εντεροτοξινογόνα [Enterotoxigenic (ETEC)]

Παράγουν μια ή και δύο εντεροτοξίνες: τη θερμοευαίσθητη (LT) και τη θερμοανθεκτική (ST).
Η τοξίνη (LT): Καταστρέφεται στους 100 °C. Είναι πρωτεΐνη με ΜΒ 73 Kd. Είναι ουσία αντιγονική και τα προς αυτήν αντισώματα εξουδετερώνουν τη δράση της. Παράγεται από ορισμένους ορότυπους.
Η τοξίνη (ST): Είναι θερμοανθεκτική. Αντέχει στους 100° C. Είναι πρωτεΐνη μικρού ΜΒ, αλλά δεν έχει αντιγονική ιδιότητα. Δρα ταχύτερα από την LT εντεροτοξίνη και προκαλεί ταχύτατα διαρροϊκό σύνδρομο.

Για να προκληθεί νόσος από τα εντεροτοξινογόνα (ETEC) στελέχη δεν αρκεί μόνο η παραγωγή τοξινών. Θα πρέπει να προκληθεί ινιδιακή προσκόλληση των στελεχών αυτών στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου. Τα ινίδια των ETEC, CFA (Colonization Factors Antigens) είναι ουσίες πρωτεϊνικές, αντιγονικές, διαφορετικές μεταξύ των διαφόρων ETEC οροτύπων (Λεγάκης και συνεργάτες, 1999 και Πόγγας, 2008.

2. Εντεροδιεισδυτικά [Enteroinvasive (EIEC)]

Ορισμένα στελέχη *E. coli* έχουν την ικανότητα να διεισδύουν και να καταστρέφουν τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου. Δεν παράγουν ειδικές τοξίνες, η δε παθογόνος δράση τους καθορίζεται από χρωμοσωμικά και πλασμιδιακά γονίδια. Η ταυτοποίησή τους γίνεται με ανοσοενζυματικές μεθόδους και DNA υβριδισμό (Λεγάκης και συνεργάτες, 1999 και Πόγγας, 2008).

3. Εντεροπαθογόνα [Enteropathogenic (EPEC)]

Ο μηχανισμός της παθογόνου δράσης συνδέεται με την προσκολλητικότητα. Προσκολλώνται στις ψηκτροειδείς παρυφές του επιθηλίου του λεπτού εντέρου, με τα ινίδια ή με άλλους τρόπους. Οι παράγοντες προσκόλλησης κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται σε πλασμίδια (Λεγάκης και συνεργάτες, 1999 και Πόγγας, 2008).

4. Εντεροαιμορραγικά [Enterohaemorrhagic (EHEC)] ή Νευροκυτταροτοξικά [Verotoxic-producing (VTEC)]

Η δράση τους αποδίδεται στην παραγωγή τοξίνης (βερο-τοξίνης, VT). Η VT τοξίνη έχει παρόμοια δράση με την τοξίνη Shiga (SLT) που παράγεται από στελέχη της *Shigella dysenteriae τύ*που I. Ο βεροτοξινογόνος ορότυπος 0:157 H7, έχει την ικανότητα να προσκολλάται στα επιθηλιακά κύτταρα. Η ικανότητα αυτή ελέγχεται από πλασμιδιακά γονίδια που ρυθμίζουν την παραγωγή των σχετικών ινιδίων. (Λεγάκης και συνεργάτες, 1999, Liu και συνεργάτες, 2008)

5. Διάχυτης προσκολλήσεως [Diffuse-Adhering (DAEC)]

6. Ουροπαθογόνα (http://www.who.int,, http://www.cfsan.fda.gov)

Τα νοσήματα που προκαλούνται είναι τα εξής:

- **Εντερικές Λοιμώξεις**

1) Γαστρεντερίτιδα βρεφών (EPEC)

Τα συμπτώματα κυμαίνονται από σοβαρή διάρροια με πυρετό και μεγάλη αφυδάτωση μέχρι απλή παροδική διάρροια. Η μετάδοση γίνεται με όλους τους δυνατούς τρόπους άμεσης και έμμεσης επαφής με τα κόπρανα του παιδιού που πάσχει. Εμφανίζεται σε βρέφη που νοσηλεύονται σε νοσοκομεία ή που ζουν σε ιδρύματα, με μορφή επιδημιών ή σποραδικών κρουσμάτων.
Η θεραπεία γίνεται με ενυδάτωση και ηλεκτρολυτική ρύθμιση. Αντιβιοτικά συνήθως δεν χορηγούνται (Αρσένη, 1994 και Rangel και συνεργάτες, 2005).

Χολεροειδής εντερίτιδα Νόσος ταξιδιωτών (ETEC)

Τα ETEC στελέχη προκαλούν τη "*διάρροια των ταξιδιωτών".* Οι λοιμώξεις εμφανίζονται με τη μορφή μικρών επιδημιών μετά από κατανάλωση μολυσμένων τροφών ή νερού και διαρκούν 3 ημέρες περίπου. Ο χρόνος επώασης είναι συνήθως μία ή δύο μέρες. Εκτός από τη διάρροια μπορεί να παρατηρηθούν ναυτία, έμετοι, πυρετός, ρίγη και πόνοι στις αρθρώσεις. Οι λοιμώξεις από στελέχη ETEC συμβαίνουν συχνότερα σε άτομα που ταξιδεύουν από αναπτυγμένες περιοχές με καλή υγιεινή και εύκρατα κλίματα σε περιοχές με χαμηλό επίπεδο υγιεινής και θερμά κλίματα. Προσβάλλουν όλες τις ηλικίες. Μετά την ανάρρωση παραμένει ανοσία για μερικούς μήνες. Η θεραπεία περιλαμβάνει ενυδάτωση και διόρθωση των ηλεκτρολυτικών διαταραχών (Αρσένη, 1994 και Πόγγας, 2008).

3) Δυσεντεροειδές σύνδρομο (EIEC)

Προκαλούν κλινικό σύνδρομο παρόμοιο με αυτό που προκαλούν στελέχη του γένους *Shigella*. Το σύνδρομο αυτό παρατηρείται στους ενήλικες και στα βρέφη και χαρακτηρίζεται από πυρετό, πτώση της πίεσης και κοιλιακά άλγη. Οι διαρροϊκές κενώσεις περιέχουν αίμα και πύον. Οι λοιμώξεις από στελέχη

EIEC είναι συνήθως τροφιμογενείς και αποτελούν το 5% όλων των διαρροιών σε περιοχές χαμηλού επιπέδου υγιεινής (Αρσένη, 1994 και Πόγγας, 2008).

4) Αιμορραγική κολίτιδα και αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (EHEC)

Η αιμορραγική κολίτιδα, γνωστή και ως ισχαιμική κολίτιδα, εμφανίζεται με κοιλιακούς πόνους και υδαρή αιμορραγική διάρροια (κόκκινο αίμα). Δεν υπάρχει πυρετός και στα κόπρανα δεν υπάρχουν πυοσφαίρια. Διαρκεί 2-4 ημέρες και αυτοϊάται. Σε μερικούς ασθενείς, κατά τη φάση της ανάρρωσης εμφανίζεται οξύ αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (Αρσένη, 1994, Friedman και συνεργάτες, 1999, Lukiadis και συνεργάτες, 2006 και Liu και συνεργάτες, 2008).

- **Εξωεντερικές Λοιμώξεις**

1)Αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (EHEC)

Το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο συμβαίνει σε όλες τις ηλικίες αλλά είναι συχνότερο σε νεογνά και παιδιά. Είναι η μεγαλύτερη αιτία νεφρικής ανεπάρκειας στην παιδική ηλικία. Χαρακτηρίζεται από οξεία νεφρική ανεπάρκεια, μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία και θρομβοπενια. Τα βεροτοξινογόνα (VTEC) στελέχη *E. coli* προκαλούν λοιμώξεις επίσης σε βοοειδή και χοίρους (Λεγάκης και συνεργάτες, 1999 και Πόγγας, 2008).

2) Λοιμώξεις των ουροφόρων οδών

Το βακτήριο *E. coli* αποτελεί το συχνότερο αίτιο ουρολοιμώξεων καθώς αποτελεί την αιτία για το 90% των εξωνοσοκομειακών και το 50% των νοσοκομειακών ουρολοιμώξεων.

Η αυξημένη λοιμογόνος δύναμή τους οφείλεται:

1) στην ικανότητά τους να ανθίστανται στη βακτηριοκτόνο δράση του ορού,

2) στην παραγωγή βακτηριοκινών,

3) στην ικανότητά τους να προσκολλώνται στα επιθηλιακά κύτταρα των ουροφόρων οδών,

4) στην παραγωγή αερομπακτίνης.

Η προσκολλητικότητα είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες των ουροπαθογόνων στελεχών *E. coli.* Εκφράζεται με την παραγωγή ινιδίων στην επιφάνεια του μικροβιακού κυττάρου, τα οποία αναγνωρίζουν υποδοχείς στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων του ουροποιητικού συστήματος. Η παραγωγή των ινιδίων ρυθμίζεται από χρωμοσωμικά γονίδια. Υπάρχουν δύο τύποι προσκολλητικών ινιδίων, τα τύπου I και τα τύπου P (P-pilli).
Οι λοιμώξεις στις ουροφόρους οδούς είναι συχνότερες στις γυναίκες παρά στους άνδρες. Η διάγνωση των ουρολοιμώξεων γίνεται με ποσοτική καλλιέργεια ούρων. Πληθυσμοί του βακτηρίου $>10^5$/ml είναι συμβατοί με ουρολοίμωξη (Αρσένη, 1994, Λεγάκης και συνεργάτες, 1999 και Πόγγας, 2008).

3) Μηνιγγίτις

Το 40% των περιπτώσεων μηνιγγίτιδας που προκαλούνται στα βρέφη τις τέσσερις πρώτες εβδομάδες της ζωής τους οφείλεται στο *E. coli* ή στους στρεπτόκοκκους της ομάδας Β. Το 80% των στελεχών *E. coli* που προκαλούν μηνιγγίτιδα φέρουν το αντιγόνο Κ. Η μηνιγγίτιδα που παρατηρείται στα νεογνά συνοδεύεται με μικροβιαιμία. Η διάγνωση γίνεται με καλλιέργεια του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (Gillespie και Bamford, 2000 και Tortora και συνεργάτες, 2009).

4) Σηψαιμία

Το βακτήριο *E. coli* αποτελεί το συχνότερο αίτιο (45%) των σηψαιμιών που προκαλούνται από εντεροβακτήρια. Η αρχική λοίμωξη αφορά συνήθως το ουροποιητικό ή το γαστρεντερικό σύστημα. Η θνησιμότητα στη σηψαιμία επηρεάζεται από την υποκείμενη νόσο (Λεγάκης, 1994 και Πόγγας, 2008).

5) Πνευμονία

6) Λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων, ιδιαίτερα σε διαβητικούς

7) Ενδοτοξικό σοκ

8) Σηπτική αρθρίτιδα

9) Ενδοκοιλιακά αποστήματα

10) Περιτονίτιδα (σε ασθενείς με νοσήματα ήπατος κυρίως)

11) Αποστήματα εγκεφάλου

12) Ενδοκαρδίτιδα

13) Οστεομυελίτιδα

14) Προστατίτιδα

15) Μετωπιαία κολπίτιδα

16) Διαπυήσεις τραυμάτων (Lira και συνεργάτες 2004 & Bettelheim και συνεργάτες 2005).

Επειδή η μολυσματική δόση του βακτηρίου *E. coli* είναι μεγάλη, η μετάδοση από άτομο σε άτομο δεν είναι συχνή, ενώ θεωρείται σημαντική η μετάδοση διά των τροφών. Το ***E. coli*** είναι από τους οργανισμούς που έχουν ενοχοποιηθεί για πρόκληση υδατογενών λοιμώξεων. Γενικά, η συσχέτιση της παρουσίας στο νερό παθογόνων βακτηρίων του γαστρεντερικού συστήματος με τους δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης του νερού είναι πολύ καλή. Για παράδειγμα ***Salmonella*** spp. ανιχνεύονται πάντα όταν ο αριθμός των κοπρανωδών κολοβακτηρίων ξεπεράσει τα 2000/100 ml. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία υδατογενείς λοιμώξεις έχουν προκληθεί από διάφορους οροτύπους του ***E. coli*** όπως είναι τα εντεροτοξινογόνα ***ETEC,*** τα εντεροπαθογόνα ***EPEC,*** τα εντεροδιεισδυτικά ***EIEC*** και πιο σπάνια τα αιμορραγικά στελέχη O157:H (Bettelheim και συνεργάτες, 2005).

1.4.7 Επιδημιολογία των στελεχων *E. coli*

Ανά το κόσμο διάφορες περιπτώσεις επιδημιών έχουν αναφερθεί που αναφέρουν ως αιτιολογικό παράγοντα το *E.coli* και κυρίως το είδος *E.coli* O157 :H7 ενώ ως πηγή έναρξης και μετάδοσης των επιδημιών αναφέρονται περιβάλλοντα όπως το νερό και το χώμα.

Το 1982 έγινε η αναγνώριση του στελέχους *E. coli* O157:H7 (Bentley & Meganathan, 1982). Έρευνες που έγιναν σε επιδημίες από το στέλεχος αυτό αύξησαν τις γνώσεις για την επιδημιολογία αλλά και τον τρόπο με τον οποίο εξαπλώνεται το παθογόνο αυτό στέλεχος. Οι περισσότερες από αυτές τις επιδημίες, έχουν σχετιστεί με την τροφή (Rangel και συνεργάτες, 2005). Οι έρευνες αυτές τεκμηρίωσαν ότι το στέλεχος αυτό μπορεί να μεταδοθεί από ωμό μοσχάρι (Adwan και Adwan, 2004), από μη παστεριωμένο γάλα, από μηλίτη (Friedman και συνεργάτες, 1999), από μαρούλι (Hilborn και συνεργάτες, 1999), από τα λάχανα (Friedman και συνεργάτες, 1999), από νερό από το δημοτικό δίκτυο ύδρευσης (Swerdlow και συνεργάτες, 1992 και Dev και συνεργάτες, 1991), από κολύμβηση σε μολυσμένες λίμνες (Keene και συνεργάτες, 1994 και Ackman και συνεργάτες, 1997), από ανθρώπινη επαφή (Friedman και συνεργάτες, 1999) και από κολυμβητικές δεξαμενές μη κατάλληλα χλωριωμένες (Brewster και συνεργάτες, 1994 και Friedman και συνεργάτες, 1999).

Η πρώτη επιδημία που καταγράφτηκε από νερά αναψυχής συνέβη το 1991 (Nwachuku και Gerba , 2008).

Το 1994 αναφέρθηκε μία σχετιζόμενη με κολύμβηση επιδημία αιμορραγικής κολίτιδας, προερχόμενη από *E. coli* O157:H7 και *Shigella sonnei.* Το επιδημικό στέλεχος ανιχνεύθηκε στα νερά μίας λίμνης που βρισκόταν σε ένα πάρκο κοντά στο Portland στο Oregon. 21 άτομα αναγνωρίστηκαν με σχετιζόμενη με το πάρκο μόλυνση από *E. coli* O157:H7(αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο), εκ των οποίων όλα ήταν παιδιά περίπου 6 ετών. 38 άτομα είχαν τα συμπτώματα από μόλυνση με *S. soneei* (εντερική κολίτιδα), κυρίως παιδιά. Και τα 59 άτομα είχαν επισκεφτεί το συγκεκριμένο πάρκο μέσα σε περίοδο 24 ημερών. Όλοι οι ασθενείς είχαν κολυμπήσει στη λίμνη. Το νερό της λίμνης που ήταν μολυσμένο από κολυμβητές, ήταν πολύ πιθανό να ήταν το μέσο μεταφοράς και των δύο μικροοργανισμών, *E. coli* O157:H7 και *S. Soneei.* Η ασυνήθιστη και παρατεταμένη επιδημία συνιστούσε την επιβίωση και των δύο αυτών εντερικών οργανισμών στα νερά της λίμνης αλλά και τη μικρή μολυσματική δόση (Keene και συνεργάτες, 1994).

Το 1994 ο Brewester και οι συνεργάτες του ανέφεραν μία επιδημία που ξέσπασε τον Μάιο του 1991 από μόλυνση με τη νευροτοξίνη που παράγεται από το στέλεχος *E. coli* O157:H7 σε παιδική πισίνα.

Το 1999 στη Georgia των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής ξέσπασε μία επιδημία *E. coli* O157:H7, η οποία συσχετίστηκε με μη κατάλληλα χλωριωμένη κολυμβητική δεξαμενή. Συγκεκριμένα μελέτησαν έναν αριθμό γαστρεντερικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου και ενός αιμολυτικού-ουραιμικού συνδρόμου και μία μόλυνση από επιβεβαιωμένη και καλλιεργητικά *E. coli* O157:H7, οι οποίες παρουσιάστηκαν μετά από ένα πάρτυ σε πισίνα σε ένα πάρκο με τροχόσπιτα. Το πρώτο περιστατικό αναφέρθηκε σαν γαστρεντερική νόσος σε ένα σπίτι ανάμεσα στις 5 - 20 Ιουλίου, στο οποίο ο τίτλος των αντισωμάτων έναντι του *E. coli* O157:H7 (όπου είχαν υπολογιστεί), αυξήθηκε. Από τους 51 παρευρισκομένους στο πάρτυ και κατοίκους των τροχόσπιτων, οι 18 ανέπτυξαν γαστρεντερική νόσο, συμπεριλαμβάνοντας 10 περιστατικά όμοια με το αρχικό. Στην εμπλεκόμενη πισίνα είχε προστεθεί λίγο έως καθόλου χλώριο, κατά τη διάρκεια της περιόδου 4-12 Ιουλίου (Friedman και συνεργάτες, 1999).

Το 2000 οι ερευνητές Goldwater και Bettelheim εκαναν την πρώτη ολοκληρωμένη ορολογική ανάλυση μίας επιδημίας αιμολυτικού ουραιμικού σύνδρομου (ΑΟΣ). Εξετάστηκε σε πολλούς ασθενείς και μάρτυρες η απόκρισή σε αντισώματα ενός ευρέος φάσματος *Escherichia coli* ομάδας «Ο». Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των μικροσυγκολλητινοαντιδράσεων για να εξετασθεί η ορολογική απόκριση στην ομάδα των «Ο» αντιγόνων του *E. coli* σε 22 παιδιά που εισήχθησαν στο νοσοκομείο με ΑΟΣ και 14 μάρτυρες ταυτόχρονα ίδιας ηλικίας. Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 51 διαφορετικά στελέχη «Ο» οροομάδας. Πολλοί ασθενείς εμφάνισαν τίτλο αντισωμάτων για το O26, O111, O123 , O157, O137, O145 σωματικό αντιγόνο. Σε ΑΟΣ που σχετίζεται με λοίμωξη από εντεροτοξινογόνο στέλεχος, πιθανόν να εμπλέκονται περισσότερα από ένα στελέχη, όπως θα πρέπει να αναζητείται και μη- O157 εντεροτοξινογόνο στέλεχος.

Στα επιδημιολογικά δεδομένα που συλλέγονται ανά εξάμηνο και ανά έτος από το CDC (Central of Disease Control) αναφέρεται μεγάλος αριθμός επιδημιών που σχετίζονται με το βακτήριο *E.coli* σε όλο το κόσμο.

Κατά την διάρκεια του 2001-2002, ξέσπασαν 65 επιδημίες. Οι 30 ήταν το 2001 και οι 35 το 2002, οι οποίες συσχετίστηκαν με νερά αναψυχής και αναφέρθηκαν σε 23 πολιτείες των Ηνωμένων Πολιτειών (Πίνακας 1.5).

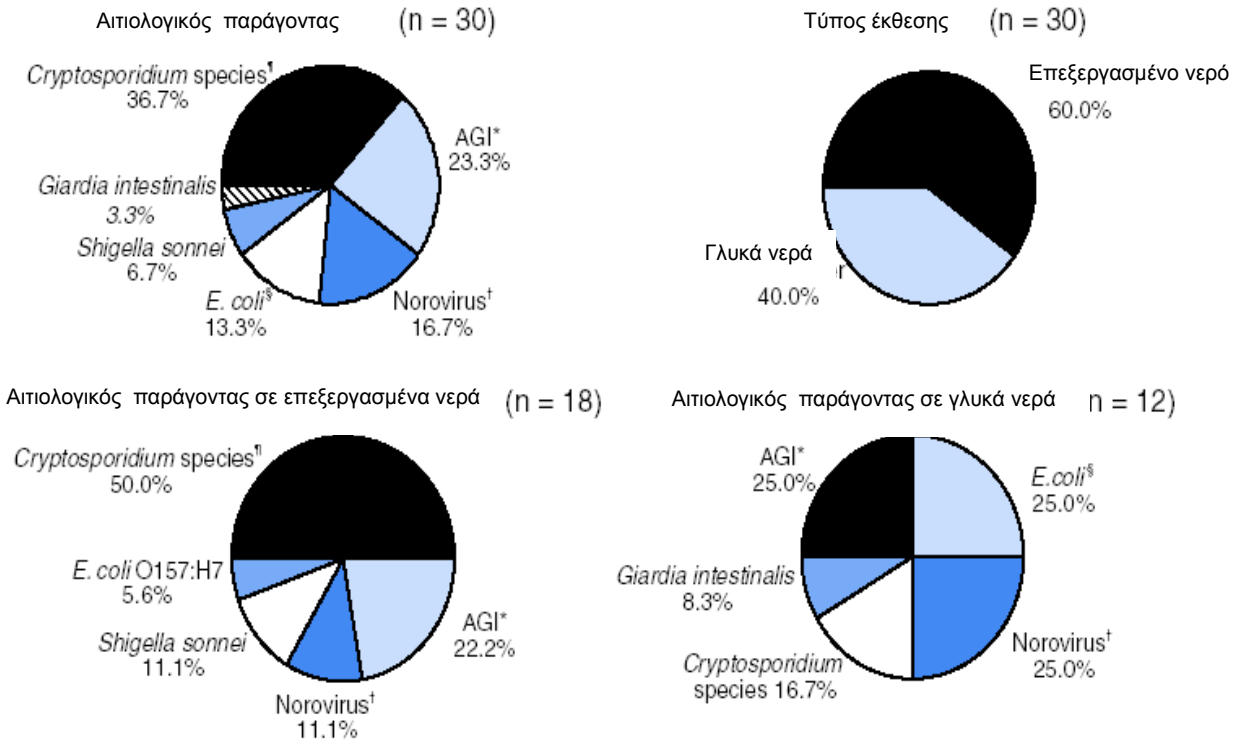
Πίνακας 1.5 : Υδατογενείς επιδημίες (65) που συσχετίζονται με νερά αναψυχή ανά αιτιολογικό παράγοντα και τύπο νερού στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής 2001-2002 (Central of Disease Control).

	Type					
	Treated		Fresh		Total	
Etiologic agent	Outbreaks	Cases	Outbreaks	Cases	Outbreaks	Cases
Bacterial	**24**	**571**	**3**	**69**	**27**	**640**
Pseudomonas aeruginosa	18*	393	0	0	**18**	**393**
Escherichia coli (O157:H7, O26:NM)	1	9	3†	69	**4**	**78**
Shigella sonnei	2	78	0	0	**2**	**78**
Bacillus species	1	20	0	0	**1**	**20**
Legionella species	1	68	0	0	**1**	**68**
Staphylococcus species	1	3	0	0	**1**	**3**
Parasitic	**9**	**1,469**	**12**	**34**	**21**	**1,503**
Cryptosporidium species	9	1,469	2	5	**11**	**1474**
Naegleria fowleri	0	0	8	8	**8**	**8**
Giardia intestinalis	0	0	1	2	**1**	**2**
Avian schistosomes	0	0	1*	19	**1**	**19**
Unknown	**5**	**63**	**3**	**82**	**8**	**145**
AGI§	4	59	3	82	**7**	**141**
ARI¶	1	4	0	0	**1**	**4**
Viruses	**2**	**51**	**3†**	**95**	**5**	**146**
Norovirus	2	51	3†	95	**5**	**146**
Chemical	**4**	**102**	**0**	**0**	**4**	**102**
Chlorine gas	2	50	0	0	**2**	**50**
Chloramines	2*	52	0	0	**2**	**52**
Total	**44**	**2,256**	**21**	**280**	**65**	**2,536**
Percentage	**(67.7)**	**(89.0)**	**(32.3)**	**(11.0)**	**(100)**	**(100)**

Συγκεκριμένα 2.536 άτομα αρρώστησαν με αποτέλεσμα 61 άτομα να νοσηλευτούν σε νοσοκομείο και 8 να καταλήξουν σε θάνατο. Από τις 65 επιδημίες, οι 30 ήταν επιδημίες με γαστρεντερικές νόσους (46,2%), οι 21 ήταν επιδημίες δερματίτιδας (32,3%), οι 8 επιδημίες μηνιγγοεγκεφαλίτιδας (12,3%) και 6 επιδημίες οξείας αναπνευστικής νόσου (9,2%), συμπεριλαμβάνοντας μία αγνώστου αιτιολογίας, (Pontiac fever) και 4 που προκλήθηκαν από έκρηξη χημικών.

Από τις 65 επιδημίες από νερά αναψυχής, οι 21 (32,3%) σχετίζονται με γλυκά νερά ή με επιφανειακά νερά και οι 44 (67,7%) σε εγκαταστάσεις με επεξεργασμένο νερό (π.χ χλωριωμένο).

Ο μολυσματικός παράγοντας ταυτοποιήθηκε ή υπήρχε υποψία στις 53 (81,5%) από τις 65 επιδημίες οι οποίες σχετίζονται με νερά αναψυχής. Από τις 30 επιδημίες με γαστρεντερική νόσο, οι 12 (40%) έχουν προκληθεί από παράσιτα, οι 6 (20%) από βακτήρια και συγκεκριμένα και από ορότυπους E.coli σε ποσοστό 25% σε σχέση με τα άλλα βακτήρια, οι 5 (16.7%) από ιούς και οι υπόλοιπες 7 (23,3%) από άγνωστο αίτιο (CDC) (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8 : Υδατογενείς επιδημίες γαστρεντερίτιδας που συσχετίζονται με νερά αναψυχής, ανα αιτιολογικό παράγοντα και τύπο νερού στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής 2001-2002

Την ίδια χρονιά, 2001-2002, αναφέρθηκαν 31 επιδημίες σε 19 χώρες που συσχετίστηκαν με πόσιμο νερό, ενώ την προηγούμενη χρονιά είχαν αναφερθεί 39 επιδημίες. 1.020 άτομα αρρώστησαν εκ των οποίων τα 51 νοσηλεύτηκαν και τα 7 τελικά κατέληξαν σε θάνατο. Οι επιδημίες αυτές εκδηλώθηκαν στο διάστημα από Ιούνιο έως Σεπτέμβριο. Από τις 31 επιδημίες η μία είχε προκληθεί από *E. coli* O157:H7 (CDC).

Τη χρονιά 2005 έγινε μία βιβλιογραφική ανασκόπηση από το 1982 έως και το 2002, η οποία αφορούσε τις επιδημίες από το βακτήριο *E. coli* O157:H7. Συνολικά, οι επιδημίες οι οποίες είχαν ως πηγή προέλευσης του συγκεκριμένου βακτηρίου το νερό αποτελούν το 9% του συνολικού αριθμού επιδημιών. Συγκεκριμένα 31 επιδημίες από τις 350 ήταν υδατογενούς προελεύσεως, εκ τω οποίων οι 21 είχαν προκληθεί από νερά αναψυχής και οι 10 από πόσιμο νερό. Από τις επιδημίες από τα νερά αναψυχής το 67% (14) έχουν πηγή προέλευσης τις λίμνες και το 33% (7) τις πισίνες (Rangel και συνεργάτες, 2005).

Τη χρονιά 2007 οι Verma και συνεργάτες παρουσίασαν 106 επιδημίες από το βακτήριο *E. coli* O157:H7 στην Αγγλία και την Ουαλία από το 1995-2000. Το βακτήριο αυτό, μπορεί να προκαλέσει εύρος ασθενειών , από ήπια διάρροια έως αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (ΑΟΣ) με θνησιμότητα 3,7%. Η μόλυνση είναι πιο συχνή σε παιδιά κάτω των 5 ετών. Τα νερά αναψυχής αποτελούν ένα μέσο διασποράς μολυσματικών ασθενειών σε όλο τον κόσμο.

Την ίδια χρονιά αναφέρθηκε και μία επιδημία στο Ηνωμένο Βασίλειο η οποία συσχετίστηκε με ένα τοπικό κέντρο αναψυχής με πισίνα, παρόλη την σχετική ευαισθησία του *E.coli* O157 :H7 σε επαρκείς ποσότητες ελεύθερου χλωρίου. (Verma και οι συνεργάτες το 2007).

Σύμφωνα με τον Patel και τους συνεργάτες, κάποιες επιδημίες είχαν πηγή προέλευσης μολυσμένο νερό άρδρευσης. Συγκεκριμένα, ξέσπασε επιδημία με το *E. coli* O157:H7, η οποία συσχετίστηκε με μαρούλι, το οποίο έιχε ποτιστεί με μολυσμένο με λύματα νερό άρδευσης. 53 ασθενείς νοσηλέυτηκαν και σε 8 προκλήθηκε αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (Patel και συνργάτες, 2010).

Το 2011 στη Γερμανία, ξέσπασε μία επιδημία από το στέλεχος *Escherichia coli* O104:H4, η οποία προκάλεσε πάνω από 830 περιπτώσεις αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου και διάρροιες σε κάποιες περιπτώσεις και 46 θανάτους από τον Μάιο έως τον ιούλιο του 2011.Αρχικά αναφέρθηκε η επιδημία από το ECDC και μία ημέρα αργότερα ανιχνεύθηκε με μοριακές μεθόδους, το

βακτήριο στα γερμανικά αγγούρια. Το στέλεχος που απομονώθηκε, ταυτοποιήθηκε και εγινε και αλληλούχιση του γονιδιώματός του. Φέρει γονίδια από 2 κατηγορίες παθογόνων *E. coli* (EHEC και EAEC), δημιουργώντας ένα «υβριδικό» στέλεχος EAHEC (Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli*) (CDC, 2011, Bielaszewska και συνεργάτες, 2011 και Mellmann και συνεργάτες, 2011)

1.4.8 Πρόληψη έναντι υδατογενών και τροφιμογενών λοιμώξεων

Το πλέον δραστικό μέτρο για την πρόληψη των λοιμώξεων είναι να αποφεύγεται η έκθεση στο λοιμογόνο παράγοντα. Η μολυσμένη τροφή και το νερό είναι τα σημαντικότερα μέσα μετάδοσης λοιμώξεων με *E. coli* (ETEC) στις αναπτυσσόμενες χώρες. Η πρόληψη μπορεί να γίνει με σωστή ύδρευση και αποχέτευση, μέτρα ειδικής υγιεινής στα νοσοκομεία και σωστή ατομική καθαριότητα. Τα άτομα που ταξιδεύουν σε χώρες με χαμηλό υγειονομικό επίπεδο και ιδιαίτερα στις τροπικές χώρες, θα πρέπει να επιλέγουν τους χώρους φαγητού με προσοχή. Πρέπει να καταναλώνεται μόνο ζεστή τροφή και εμφιαλωμένο νερό. Τα φρούτα πρέπει να καθαρίζονται ενώ οι ωμές σαλάτες να αποφεύγονται. Το μη παστεριωμένο γάλα πρέπει να αποφεύγεται.

Η εξάπλωση της παιδικής εντερίτιδας σε νοσοκομεία και παιδικούς σταθμούς γίνεται κυρίως από ασθενή σε ασθενή, με τα χέρια του νοσηλευτικού προσωπικού ή από μολυσμένες τροφές νεογνών. Δύναται να προληφθεί μόνο με αυστηρή ατομική υγιεινή. Ασθενείς και άτομα ύποπτα μολύνσεων πρέπει να απομονώνονται. Σε περιπτώσεις επιδημιών επιβάλλεται το κλείσιμο θαλάμων ή παιδικών σταθμών, που πρέπει να απολυμανθούν καλά πριν ξανανοίξουν. Λοιμώξεις από *E. coli* (VTEC) συχνότατα μεταδίδονται με το κρέας και με μη παστεριωμένο γάλα. Συνιστάται ιδιαίτερη προσοχή στο καλό ψήσιμο των ωμών κρεάτων και ιδιαίτερα του κιμά. Για προφύλαξη, έχει παρασκευασθεί εμβόλιο έναντι της ST και LT τοξίνης. Η χρήση του βρίσκεται σε πειραματικό στάδιο (Λεγάκης και συνεργάτες, 1999).Τα τελευταία χρόνια

γίνονται πολλές προσπάθειες για την δημιουργία και άλλων εμβολίων (Ahmed και συνεργάτες, 2006α, Ahmed και συνεργάτες, 2006β και Pearson, 2007).

1.4.9 Ευαισθησία του βακτηρίου *E. coli* στα αντιβιοτικά – Θεραπεία των ασθενών που πάσχουν από λοιμώξεις του *E. coli*

Το βακτήριο *E. coli* είναι ευαίσθητο στις αμινογλυκοσίδες, τη χλωραμφενικόλη, τις τετρακυκλίνες, τις σουλφοναμίδες, την τριμεθοπρίμη, τις νιτροφουράνες, το ναλιδιξικό οξύ. Από τα β-λακταμικά, είναι ευαίσθητο σε πολλές κεφαλοσπορίνες και ανθεκτικό σε μεγάλο ποσοστό στην πενικιλλίνη, αλλά ευαίσθητο σε άλλες ημισυνθετικές πενικιλλίνες όπως η αμπικιλλίνη (White και συνεργάτες, 2000, Khan και συνεργάτες, 2002, Bryan και συνεργάτες, 2004).
Η μεταφορά πλασμιδίων είναι εύκολη μεταξύ των βακτηρίων και με αυτόν τον τρόπο μεταφέρονται και τα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (Gazouli και συνεργάτες, 1996, Oppegaard και συνεργάτες, 2001).
Κατόπιν επιδημιολογικών μελετών έχουν διαπιστωθεί διαφορές μεταξύ στελεχών απομονωμένων από διάφορες χώρες και νοσοκομεία, όσον αφορά σε επιδημιολογικούς χαρακτήρες και στη γενετική τους δομή (Souza και συνεργάτες 1999).

1.4.10 Ρόλος του βακτηρίου *E. coli* στη Βιοτεχνολογία

Η ευκολία του βακτηρίου *E. coli* να καλλιεργείται στο εργαστήριο εδώ και χρόνια αλλά και η ευκολία χειρισμού της *E. coli* παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη σύγχρονη Γενετική Τεχνολογία και τη Βιομηχανική Μικροβιολογία (Lee, 1996, Choi και συνεργάτες, 2011 και Tashiro και συνεργάτες, 2012).

Αποτελεί σημαντικό εργαλείο της βασικής έρευνας στη Βιολογία (Tortora και συνεργάτες, 2009). Θεωρείται πολύ ευπροσάρμοστος υποδοχέας για την παραγωγή των ετερόλογων πρωτεϊνών. Οι ερευνητές μπορούν να εισαγάγουν τα γονίδια στους μικροοργανισμούς με χρήση πλασμιδίων, που επιτρέπει την μαζική παραγωγή των πρωτεϊνών με διαδικασίες βιομηχανικής ζύμωσης. Τα καλλιεργούμενα στελέχη (π.χ. *E. coli* K12) είναι καλά προσαρμοσμένα στο περιβάλλον του εργαστηρίου, και σε αντίθεση με τα στελέχη «άγριου» τύπου, έχουν χάσει την ικανότητά τους να αποικίζουν το έντερο. Πολλά στελέχη του

εργαστηρίου έχουν χάσει την ικανότητά τους να σχηματίσουν βιομεβράνες. Αυτά τα χαρακτηριστικά προστατεύουν τα στελέχη «άγριου» τύπου από τα αντισώματα και χημικές ουσίες, αλλά απαιτούν μεγάλη δαπάνη ενέργειας και υλικών πόρων (Fux και συνεργάτες, 2005).

Γενετικά συστήματα έχουν επίσης αναπτυχθεί που επιτρέπουν την παραγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας το *E. coli.* Μία από τις πρώτες χρήσιμες εφαρμογές της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, ήταν η παραγωγή ανθρώπινης ινσουλίνης από το *E. coli* (Chen et al, 2011). Τροποποιημένο *E. coli* έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για βιοαποικοδόμηση και παραγωγή των ακινητοποιημένων ενζύμων (Cornelis, 2000).

Η τεχνολογία του ανασυνδιασμένου DNA επέτρεψε τη δημιουργία ανασυνδιασμένων εμβολίων (Cornelis, 2000), τα οποία λύνουν οριστικά ορισμένα από τα βασικότερα προβλήματα των «φυσικών» εμβολίων. Το πρόβλημα λύθηκε με την απομόνωση και ταυτοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν τις ειδικές πρωτεΐνες - αντιγόνα των παθογόνων μικροοργανισμών (Tortora και συνεργάτες, 2009).

Το *E. coli* δεν μπορεί, ωστόσο, να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ορισμένων από τις πιο μεγάλες, σύνθετες πρωτεΐνες που περιέχουν πολλαπλούς δισουλφιδικούς δεσμούς και ειδικότερα ασύζευκτες θειόλες, ή των πρωτεϊνών που απαιτούν επίσης μετα-μεταφραστική τροποποίηση για την δράση τους (Lee και συνεργάτες,1996).

Το φαινόμενο γνωστό ως βακτηριακή σύζευξη, περιγράφηκε το 1946, χρησιμοποιώντας το *E. coli* σαν βακτήριο πρότυπο και παραμένει το πρωταρχικό μοντέλο για τη μελέτη της βακτηριακής σύζευξης. Το *E. coli* αποτελούσε ένα αναπόσπαστο κομμάτι από τα πρώτα πειράματα για την κατανόηση της γενετικής των φάγων (Tortora και συνεργάτες, 2009).

Πειράματα μακροχρόνιας εξέλιξης, χρησιμοποιώντας το *E. coli*, ξεκίνησαν από τους ερευνητές Blount, Borland και Lenski το 1988 και έδωσαν τη δυνατότητα άμεσης παρατήρησης των μεγάλων εξελικτικών αλλαγών στο εργαστήριο. Σε

αυτό το πείραμα, ένας πληθυσμός του *E. coli* ανέπτυξε απροσδόκητα την ικανότητα να μεταβολίζει αεροβίως κιτρικό άλας. Αυτή η ικανότητα ήταν ιδιαίτερα σπάνια στο *E. coli*. Η αδυναμία να αναπτυχθεί σε αερόβιες συνθήκες χρησιμοποιώντας τα κιτρικά είναι γνωστή και χρησιμοποιείται ως διαγνωστικό κριτήριο για τη διαφοροποίησή της από άλλα συγγενικά βακτήρια όπως η *Salmonella.* Η καινοτομία αυτή μπορεί να σηματοδοτήσει τη δημιουργία ενός καινούριου είδους που μπορεί να παρατηρηθεί στο εργαστήριο (Blount και συνεργάτες, 2008).

1.4.11 Οικολογία του βακτηρίου *E. coli* σε υδάτινα και άλλα οικοσυστήματα

Το βακτήριο *E. coli* αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος της αερόβιας φυσιολογικού μικροβιακού πληθυσμού του εντέρου των ανθρώπων και ζώων. Επίσης απαντάται στην περιγεννητική περιοχή, στο στόμιο της ουρήθρας και του κόλπου (Μαυρίδου και συνεργάτες, 2012). Το *E. coli* αποικίζει τον γαστρεντερικό σωλήνα των νηπίων εντός 40 ωρών από τη γέννησή τους, στον οποίο φθάνουν με τρόφιμα ή νερό ή με τα άτομα που περιποιούνται τα παιδιά. Στο έντερο, ανευρίσκεται στη βλέννα του παχέος εντέρου. Είναι το πολυαριθμότερο από τα αερόβια μικρόβια στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα. Όσο αυτά τα βακτήρια δεν αποκτούν γενετικά στοιχεία τα οποία κωδικοποιούν λοιμογόνους παράγοντες, παραμένουν μη παθογόνα και συμβιώνουν με τον ξενιστή αρμονικά (Tortora και συνεργάτες, 2009).

Βρίσκονται σχεδόν σε κάθε τρόφιμο που έρχεται σε επαφή με τα χέρια του ανθρώπου και σε αφθονία στα προϊόντα που πρκύπτουν από ζώα όπως το γάλα και τα παράγωγά του (Kariuki και συνεργάτες 1999, Bettelheim και συνεργάτες, 2005).

Επίσης βρίσκεται στο νερό μετά από επιμόλυνση (Durso και συνεργάτες, 2004), σε ψάρια (Hansen και συνεργάτες 2009) και σε χελώνες. Στην άμμο (Ishii και συνεργάτες, 2007) και το χώμα (Ishii και συνεργάτες, 2006). Επίσης τα μη παθογόνα αυτά βακτήρια αλλά και άλλα στελέχη του *E. coli* έχουν προσαρμοστεί σε διάφορα περιβάλλοντα (Ksoll και συνεργάτες, 2007). Σε

ορισμένες γεωγραφικές περιοχές υπάρχουν μοναδικοί πληθυσμοί *E. coli*, ενώ κάποιοι άλλοι πληθυσμοί είναι κοσμοπολίτικοι (Hansen και συνεργάτες, 2009). Βρίσκεται σε όλα τα θερμόαιμα ζώα, όπως πουλιά και πολλά στελέχη του και άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι δυνατόν να μεταδώσουν λοιμώξεις μέσω της χρήσης του νερού σαν πόσιμο, ιαματικό, για αναψυχή και κολύμβηση ή μέσω εισπνοής μολυσμένων υδατοσωματίων. Το νερό μπορεί να προκαλέσει κρούσματα κι επιδημίες σε θηλαστικά (Mavridou και συνεργάτες, 2005).

Το νερό δεν είναι το φυσικό περιβάλλον του *E. coli* αλλά έχει αναφερθεί ότι έχει βρεθεί σε πολλά υδάτινα περιβάλλοντα π.χ υδραγωγεία, κολυμβητικές δεξαμενές και ποτάμια και η παρουσία του υποδεικνύει την παρουσία πρόσφατης κοπρανώδους μόλυνσης, η οποία όμως δεν προέρχεται πάντα από ανθρώπινα λύματα (Tsen και συνεργάτες, 1998, Buldy-Chuldzik και συνεργάτες, 2003, Dos Anjos Borges και συνεργάτες, 2003, Durso και συνεργάτες, 2004 και Mandilara και συνεργάτες, 2006). Το γεγονός ότι δεν εντοπίζεται μόνο στον γαστρεντερικό σωλήνα και η ικανότητά του να επιβιώνει για σύντομο χρονικό διάστημα έξω από το σώμα, το κάνει πολύ καλό και αξιόπιστο μικροβιακό δείκτη για τον έλεγχο κοπρανώδους μόλυνσης του νερού και των τροφίμων, ο οποίος συχνά συσχετίζεται με μεγάλο αριθμό ασθενειών (Casarez και συνεργάτες, 2007α).

Το βακτήριο *E.coli* χρησιμοποιήθηκε πρωτη φορά σαν δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης το 1898 από τον Shardinger (www.fda.gov).

1.4.12 *E. coli* και μικροβιολογικοί δείκτες ρύπανσης

Οι μικροβιολογικοί-δείκτες της ποιότητας του υδάτινου περιβάλλοντος, είναι μικροοργανισμοί που έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών (WHO, 2006 και APHA, 2005).

Η παρουσία δεικτών ρύπανσης σε ένα δείγμα νερού υποδεικνύει ρύπανση κι επομένως και την πιθανότητα (αλλά όχι την βεβαιότητα) της παρουσίας και κάποιων παθογόνων. Τότε απαιτείται Υγειονομική διερεύνηση για να διαπιστωθεί η πηγή της ρύπανσης, εξειδικευμένες μικροβιολογικές αναλύσεις

για την ανίχνευση των παθογόνων και επιδημιολογική διερεύνηση για την πιθανή πρόκληση επιδημίας ή μεμονωμένων κρουσμάτων.

Οι μικροοργανισμοί-δείκτες πρέπει να πληρούν τους παρακάτω όρους:

- Να είναι μετρήσιμοι στα περιβαλλοντικά δείγματα με εύκολες και μη δαπανηρές τεχνικές που ωστόσο πρέπει να είναι ακριβείς και επαναλήψιμες
- Να είναι ανθεκτικοί στις περιβαλλοντικές πιέσεις
- Να υπάρχουν σε ικανό αριθμό στο περιβαλλοντικό δείγμα χωρίς να πολλαπλασιάζονται ή να υφίστανται σημαντικές γενετικές αλλαγές ώστε να επιτυγχάνεται ικανοποιητικά η εκτίμησή τους
- Να έχουν σταθερή και αποκλειστική σχέση με την πηγή των παθογόνων
- Να έχουν σταθερά χαρακτηριστικά (WHO, 2006)

Συνήθως χρησιμοποιούνται τρεις ομάδες δεικτών

α) Γενικοί μικροβιολογικοί δείκτες

Είναι ομάδα μικροοργανισμών που δείχνουν την ικανότητα της διαδικασίας χλωρίωσης του νερού. Παράδειγμα αποτελούν τα ολικά αερόβια και προεραιτικά αναερόβια βακτήρια, των οποίων ο συστηματικός προσδιορισμός τους στο νερό δίνει σημαντικές πληροφορίες ως προς την σταθερότητα της ποιότητας τους. Αυξομειώσεις του ολικού αριθμού της τάξεως των 1-2 λογαρίθμων μπορεί να σημαίνει προβλήματα στη μονάδα επεξεργασίας του νερού, ανάπτυξη βιολογικού υμενίου (biofilm) στο δίκτυο, επιμόλυνση της πηγής υδροληψίας κ.λ.π (Παπαπετροπούλου και Μαυρίδου, 1995 και Mavridou και συνεργατες, 2005).

β) Δείκτες κοπρανώδους ρύπανσης (coliform bacteria)

Είναι ομάδα μικροοργανισμών (π.χ οι βακτηριακές ομάδες θερμοανθεκτικών βακτηρίων ή *E. coli*) που υποδεικνύουν την παρουσία κοπρανώδους μόλυνσης.

Στις περισσότερες υγειονομικές διατάξεις περιλαμβάνονται οι συγκεκριμένοι δείκτες κοπρανώδους ρύπανσης και η παρουσία τους σε ένα δείγμα νερού υποδεικνύει ρύπανση κοπρανώδους μόλυνσης, η οποία συνήθως προέρχεται από αστικά λύματα, μονάδες επεξεργασίας λυμάτων ή κτηνοτροφικές μονάδες (Παπαπετροπούλου και Μαυρίδου, 1995, Mavridou και συνεργάτες, 2005, McLellan, 2004, Ishii και συνεργάτες, 2006 και Tortora και συνεργάτες, 2009). Στη συγκεκριμένη κατηγορία οι μικροβιακοί δείκτες ομαδοποιούνται ως εξής:

1. Η ομάδα των κολοβακτηριοειδών (total coliforms)

Τα ολικά κολοβακτηριοειδή περιλαμβάνουν όλα τα αερόβια και προαιρετικώς αναερόβια gram αρνητικά μη σπορογόνα βακτήρια τα οποία ζυμώνουν την λακτόζη και παράγουν αέριο όταν επωασθούν στους 36 ±1 ^{0}C για 48 ώρες. Περιλαμβάνουν τα είδη *Escherichia, Citrobacter, Klebsiella και Enterobacter.* (Μαυρίδου και συνεργάτες, 2012)

2. Τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή (feacal coliforms)

Τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή αποτελούν υποομάδα των ολικών κολοβακτηριοειδών και βρίσκονται κυρίως στον γαστρεντερικό σωλήνα των θερμόαιμων ζώων. Μπορούν να πολλαπλασιαστούν στους 44,5 ± 0,2 ^{0}C μετά από επώαση 48 h (θερμοανθεκτικοί μικροοργανισμοί).

Το χαρακτηριστικότερο μέλος αυτής της ομάδας είναι το βακτήριο *E.coli* το οποίο ειναι αυστηρά κοπρανώδους προέλευσης. (Liu και συνεργάτες, 2008)

3. Οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι (feacal streptococci)

Είναι Gram-θετικοί, καταλάση- αρνητικοί κόκκοι. Αποτελούνται από ορισμένα είδη του γένους Streptococcus (*S. faecalis*, *S. faecium*, *S. avium*, *S. bovis*, *S. equinous*, *S. gallinarum).* Η ομάδα των εντεροκόκκων (enterococci) είναι υποομάδα των κοπρανωδών στρεπτοκόκκων που περιλαμβάνουν τα είδη *S. faecalis*, *S. faecium, S. avium* και *S. gallinarum* (Παπαπετροπούλου και Μαυρίδου, 1995).

4. *Clostridium perfigens*

Είναι ξενιστής του εντέρου του ανθρώπου και η παρουσία του κυρίως στα επιφανειακά νερα υποδεικνύει παρουσία κρυπτοσποριδίου. Μπορεί να είναι δυνητικά παθογόνο (Παπαπετροπούλου και Μαυρίδου, 1995).

γ) Μη κοπρανώδεις δείκτες, *Pseudomonas aeruginosa*

Αποτελεί σημαντικό δείκτη για τα εμφιαλωμένα νερά και τα νερά αναψυχής (πχ κολυμβητήρια). Είναι πολύ διαδεδομένο βακτήριο. Βρίσκεται στο έδαφος, στο νερό, στα απόβλητα, στα φυτά, στο έντερο των θηλαστικών (Παπαπετροπούλου και Μαυρίδου, 1995, Sazakli, 2005 και Pappa και συνεργάτες, 2009).

δ) Ειδικές κατηγορίες μικροβιακών δεικτών

Η ανίχνευση ορισμένων δεικτών υποδεικνύει την πιθανή παρουσία συγκεκριμένων ομάδων ή και ειδών παθογόνων. Οι F-RNA βακτηριοφάγοι θεωρούνται πρότυπα για την παρουσία ιών εντερικής προέλευσης. (Παπαπετροπούλου και Μαυρίδου, 1995).

1.4.13 Επιβίωση *E. coli* στις κολυμβητικές δεξαμενές

Τα κολυμβητήρια χρησιμοποιούνται ως χώρος διασκέδασης και αθλητισμού. Παράλληλα οι ευεργετικές ιδιότητες του νερού το καθιστούν κατάλληλο και για θεραπευτικούς σκοπούς. Όμως καθώς αυξάνεται ο αριθμός των κολυμβητών, η σκόνη, ο ιδρώτας, οι σωματικές εκκρίσεις και τα νεκρά κύτταρα από το ανθρώπινο δέρμα θα παραμείνουν στο νερό, δημιουργώντας ένα οργανικό φορτίο το οποίο συνεχώς μεγαλώνει (Mavridou και συνεργάτες, 2005). Με τη βοήθεια του αέρα, του φωτός και της θερμότητας αναπτύσονται βακτήρια, μετατρέποντας τις κολυμβητικές δεξαμενές σε εστίες μόλυνσης των κολυμβητών. Συγχρόνως κακή κατασκευή, πλημελής συντήρηση και πολλές δυσλειτουργίες καθιστούν πολύ εύκολη τη μόλυνση του νερού των κολυμβητηρίων από βρώμικο νερό, αναμείξεις με λύματα και άλλους περιβαλλοντικούς ρύπους (Shields και συνεργάτες, 2008).

Οι μολύνσεις μεταδίδονται στους κολυμβητές κυρίως με τη γαστρεντερική οδό, αλλά και από τα μάτια, μύτη, λαιμό, εντερική χώρα, μυκητιάσεις ματιών

και άλλες δερματικές παθήσεις. Η παρουσία και η έκταση της μικροβιακής μόλυνσης είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην αξιολόγηση της ποιότητας του νερού και στον κίνδυνο της ανθρώπινης υγείας (Μαυρίδου και συνεργάτες, 2012).

Έχουν γίνει αρκετές μελέτες για την ποιότητα των νερών των ελληνικών κολυμβητικών δεξαμενών :

1. Το 1998 δημοσιεύθηκε μία μελέτη που αφορούσε στη μικροβιολογική ποιότητα 11 εσωτερικών κι εξωτερικών κολυμβητικών δεξαμενών στην περιοχή της Αθήνας λαμβάνοντας υπ' όψιν φυσικοχημικές, μικροβιολογικές, τεχνικές αλλά και σχετιζόμενες με την υγεία παραμέτρους (Rigas και συνεργάτες, 1998).

2. Το 1999, δημοσίευθηκε μία 12ετής μελέτη (1987-1998), η οποία περιλάμβανε υγειονομικές επιθεωρήσεις και μικροβιολογικές και βιοχημικές δοκιμές κολυμβητικών δεξαμενών στην περιοχή της Αττικής (Mavridou και συνεργάτες, 1999).

3. Οι Μαυρίδου και συνεργάτες (2005) παρουσίασαν μία μελέτη της μικροβιολογικής ποιότητας 178 κολυμβητικών δεξαμενών χρησιμοποιώντας όχι μόνο τους δείκτες που προβλέπονται από την ελληνική νομοθεσία αλλά και άλλους ώστε να αποτιμήσουν πλήρως την ποιότητα.

4. Οι Papadopoulou και συνεργάτες (2008) μελέτησαν τη μικροβιολογική ποιότητα αλλά και την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από 462 δείγματα εσωτερικών κι εξωτερικών κολυμβητικών δεξαμενών από το 1997-2005.

Οι κολυμβητικές δεξαμενές είναι δυνατόν να απολυμανθούν με διάφορους τρόπους. Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος είναι η χλωρίωση. (Grabow, 1991, O' Clifford, 1999 και WHO, 2006). Ακολουθεί η απολύμανση με όζον, η οποία τα τελευταία χρόνια κερδίζει συνεχώς έδαφος. Επίσης χρησιμοποιείται και η υπεριώδης ακτινοβολία καθώς και τα ιόντα και τα μέταλλα(Grabow, 1991 και WHO, 2006).

Η απολύμανση με χλώριο πραγματοποιείται είτε με προσθήκη αερίου χλωρίου είτε με υποχλωριώδους νατρίου είτε με υποχλωριώδους ασβεστίου.

Η δραστικότερη μορφή χλωρίου είναι το υποχλωριώδες οξύ. Κατά την είσοδό του στο κυτταρόπλασμα το χλώριο προκαλεί:

1. Μεταβολές στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης.
2. Παρεμβολές στις λειτουργίες της μεμβράνης που σχετίζονται με το κύτταρο.
3. Καταστροφή ενζυμικών λειτουργιών λόγω αναντίστρεπτης πρόσδεσης στις σουφυδριλικές ομάδες των πρωτεϊνών.
4. Βλάβες στο DNA.
5. Απενεργοποιήση ιών δρώντας είτε πάνω στις πρωτεΐνες του καψιδίου είτε πάνω στο RNA.

Πολλές έρευνες ενοχοποιούν το χλώριο για μια σειρά σοβαρών προβλημάτων υγείας, όπως καρκίνο της ουροδόχου κύστης, αλλεργική ρινίτιδα κ. α.

Τα προβλήματα που δημιουργούνται από τη χρήση του χλωρίου είναι:

- Η δημιουργία χλωραμινών
- Η δημιουργία χλωριωμένων παραγώγων (trihalomethanes (THM), μέσα στις οποίες περιλαμβάνεται και το **χλωροφόρμιο**, τα οποία προέρχονται από την αντίδραση της χλωρίνης με οργανικές ουσίες που βρίσκονται μέσα στο νερό της πισίνας

Οι οργανικές ουσίες που αντιδρούν με τη χλωρίνη προέρχονται από το ανθρώπινο δέρμα και από υπολείμματα των διαφόρων προϊόντων που χρησιμοποιούνται για τη φροντίδα του σώματος (Lourencetti και συνεργάτες, 2012).

Οι απολυμαντικές ικανότητες του χλωρίου είναι γνωστές εδώ και αιώνες αλλά τα τελευταία χρόνια, η απολύμανση του νερού με χλώριο έχει δεχθεί κάποια κριτική λόγω των δευτερευόντων επιδράσεων του χλωρίου και την αυξημένη αντίσταση των βακτηριακών στελεχών στην αδρανοποίηση από το χλώριο (Mir και συνεργάτες, 1997). Οι Saby και οι συνεργάτες (1999) απέδειξαν την ανθεκτικότητα του *E.coli* στο χλώριο και την μειωμένη σύνθεση Γλουταθειόνης

(GSH) σαν απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης από έλλειψη οξυγόνου και τροφής.

Το βακτήριο *E.coli* έχει την ικανότητα να επιβιώνει κατά τη διαδικασία της απολύμανσης. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν ενδείξεις ότι η παρουσία χλωρίου δημιουργεί καταπόνηση στο *E.coli* με αποτέλεσμα την εμφάνιση καινούριων στελεχών.
Η αποτελεσματικότητα των μέσων απολύμανσης, οπότε και του χλωρίου υπολογίζεται από τον βαθμό μείωσης των καλλιεργήσιμων κυττάρων (Arana και συνεργάτες, 1999)

Ο Sobsey (1989), παρατήρησε ότι ο βαθμός αδρανοποιήσης των μικροβιολογικών δεικτών μπορεί να υπερεκτιμηθεί λόγω του φαινομένου της παρουσίας ζωντανών αλλά μη καλλιεργήσιμων βακτηρίων. Τις τελευταίες δεκαετίες όμως, με τη βοήθεια των μοριακών τεχνικών το πρόβλημα αυτό έχει ξεπεραστεί. (Liu και συνεργάτες, 2008)

Αρκετοί ερευνητές απέδειξαν ότι ο αριθμός των ζωντανών μικροοργανισμών ήταν μεγαλύτερος από τον αριθμό των καλλιεργήσιμων (Singh και συνεργάτες, 1990, Coallier και συνεργάτες, 1994, Stewart συνεργάτες, 1994, . (Liu και συνεργάτες, 2008, Μαυρίδου και συνεργάτες, 2012).

Επιπλέον, μελέτες συνέκριναν την αποτελεσματικότητα των μεμβρανών της *Escherichia coli* μετά από την επίδραση χλωρίου και όζοντος. Ο Arana και ο συνεργάτες του (1999) συνέκριναν την επίδραση του χλωρίου και του όζοντος σε αναδιαλυμένα κύτταρα σε λύματα.

Οι Zhao και οι συνεργάτες (2001) μελέτησαν 6 στελέχη *E. coli* O157:7 κι ένα στέλεχος αναφοράς *E. coli*. Τα εξέθεσαν όλα σε διάφορες συγκεντρώσεις ελεύθερου χλωρίου, με σκοπό την αδρανοποίηση τους. Ένα στέλεχος *E. coli* O157:7, έδειξε ασυνήθιστη ανθεκτικότητα στο χλώριο.

Οι Mir και συνεργάτες (1997) μελέτησαν τη συμπεριφορά διαφόρων ειδών Gram (+) και Gram (–) βακτηρίων όταν έμειναν αρκετό χρονικό διάστημα σε περιβάλλον με χλώριο. Παρατήρησαν κατ' αρχήν, ότι τα Gram (+) βακτήρια

έχουν καλύτερη ανθεκτικότητα στο χλώριο κι ότι ο ρυθμός θανάτου των βακτηρίων μετά από κάποιο χρονικό διάστημα επιβραδύνεται και στο τέλος σταθεροποιείται και μάλιστα μετά από 30 λεπτά χρόνου επαφής ο πληθυσμός των βακτηρίων αρχίζει πάλι και αυξάνεται. Αυτό δεν παρατηρείται στα Gram (–) βακτήρια.

Αλλαγές στην μορφολογία του κυττάρου του *E. coli* παρατηρήθηκαν μετά από έκθεση 30 δευτερολέπτων στο χλώριο. Η επέκταση του χρόνου έκθεσης στα 120 δευτερόλεπτα δεν προκάλεσε περαιτέρω μορφολογικές αλλαγές, οι οποίες προκλήθηκαν από καταστροφές στη επιφάνεια του κυττάρου (Wang και συνεργάτες, 2006).

Οι Bore και συνεργάτες (2007) μελέτησαν την ανθεκτικότητα που απέκτησαν στελέχη *E. coli* K-12 μετά από έκθεση σε χλωριούχο βενζαλκόνιο (XB)

1.5 Τυποποιήση στελεχών *E. coli*

Γενικά για να χαρακτηριστεί ένας μικροοργανισμός και να ταξινομηθεί σε ομάδες απαιτούνται πλέον εκτός από φαινοτυπικά (ορότυπος, βιοχημικές ιδιότητες κλπ) και μοριακά (συντηρημένα γονίδια, 16s RNA, επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες κλπ) χαρακτηριστικά (Cazarez και συνεργατές, 2007β, Mohapatra & Mazumder, 2008,Ishii & Sadowesky, 2009).

Σύμφωνα με τα ανωτέρω, οι τυποποιητικές μέθοδοι χωρίζονται σε Φαινοτυπικές και σε Μοριακές. Οι Φαινοτυπικές μέθοδοι βασίζονται στη 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 (Van Belkum και συνεργάτες, 2007).

Φαινοτυπικές Μέθοδοι

Οι φαινοτυπικές μέθοδοι εκμεταλλεύονται μακροσκοπικά και μικροσκοπικά βιολογικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών, πχ μορφολογία αποικιών, με

σκοπό τη σύγκριση στελεχών του ίδιου είδους και την τελική τους τυποποίηση.

Οι μέθοδοι αυτές παρουσιάζουν μια πρώτη εικόνα ταξινόμησης στελεχών ανάλογα με την προέλευση και το περιβάλλον ανάπτυξής τους.
Βασίζονται σε Βιοχημικά χαρακτηριστικά όπως η ποικιλία που εμφανίζουν στις μεταβολικές λειτουργίες, η ευαισθησία τους σε διάφορα αντιβιοτικά (Αντιβιογράμματα), στα αντιγόνα που διαθέτουν τόσο στην κυτταρική τους μεμβράνη όσο και στο μαστίγιο, αν διαθέτουν (Αντιγονική τυποποίηση), στον διαχωρισμό πρωτεϊνών και ενζύμων και άλλα.

Μερικές κλασικές φαινοτυπικές μέθοδοι είναι η Βιοτυποποίηση, τα Αντιβιογράμματα, η Οροτυποποίηση, η Φασματογραφία Μάζας, η Τυποποίηση Βακτηριοφάγων.

Παρόλο, που οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους χρησιμοποιούνται ακόμη ευρέως στα περισσότερα εργαστήρια για συγκεκριμένους σκοπούς, κυρίως σε αναλύσεις ρουτίνας, εμφανίζουν κάποιους περιορισμούς, οι οποίοι τις καθιστούν μη χρηστικές για περιεκτικές επιδημιολογικές μελέτες. Καταρχάς, δεν μπορεί να γίνει ουσιαστική μελέτη και κατανόηση των δυναμικών σχέσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των στελεχών του πληθυσμού και στη διαμόρφωση της δομής της μικροβιακής κοινωνίας. Επιπλέον, οι περισσότερες φαινοτυπικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για συγκεκριμένα βακτήρια και έτσι δεν μπορεί να γίνει γενικευμένη χρήση τους. Τέλος, και ίσως το σημαντικότερο είναι ότι ο κάθε φαινότυπος δεν αντικατοπτρίζει πάντα αξιόπιστα και τον γονότυπο του μικροοργανισμού, με αποτέλεσμα να μην παρέχει αξιόπιστα και σταθερά στοιχεία για τις επιδημιολογικές μελέτες. Ο ρυθμός με τον οποίο πραγματοποιείται ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ πολλών βακτηρίων έχει ως αποτέλεσμα πολλές φορές, ο φαινότυπος να μην αντιπροσωπεύει πλήρως την εξελικτική πορεία ενός μικροοργανισμού. Έτσι, πολλές είναι οι περιπτώσεις όπου οι φαινοτυπικές μέθοδοι έχουν αντικατασταθεί από τις μοριακές μεθόδους ή ακόμη καλύτερα γίνεται ένας συνδυασμός των μεθόδων με σκοπό τη

μεγιστοποίηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων (Van Belkum και συνεργάτες, 2007).

Μοριακές Μέθοδοι

Οι παραδοσιακές μέθοδοι τυποποίησης που βασίζονται σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά περιορίζονται από τον αριθμό των χαρακτηριστικών που μπορούν να εξετάσουν (Olive & Bean 1999, Van Belkum και συνεργάτες, 2007 & Ishii & Sadowsky, 2009). Το βασικό πλεονέκτημα των μεθόδων μοριακής τυποποίησης έναντι της μελέτης φαινοτυπικών χαρακτηριστικών έγκειται στο ότι εντοπίζονται αλλαγές και τροποποιήσεις στο DNA, οι οποίες είτε θα εκδηλωθούν πολύ αργότερα στο βακτηριακό πληθυσμό είτε δεν θα επηρεάσουν καθόλου το φαινότυπο. Παράλληλα, σε ορισμένες περιπτώσεις δεν πραγματοποιείται το στάδιο καλλιέργειας των στελεχών, το οποίο σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δύσκολο και προκαλεί ποικίλα προβλήματα (Cockeril III, 1999 και Van Belkum και συνεργάτες, 2007).

Οι μοριακές μέθοδοι βασίζονται στην ποικιλομορφία του γονιδιώματος των βακτηριακών στελεχών με σκοπό την απόκτηση δεδομένων όσον αφορά στη σύσταση του γονιδιώματος (π.χ. παρουσία ή απουσία πλασμιδίου), την ολική δομή του (π.χ. τη δομή, τον αριθμό και τη θέση των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών) (Meintanis και συνεργάτες, 2007) ή τέλος, την ολόκληρη νουκλεοτιδική αλληλούχισή του (π.χ. ενός ή περισσοτέρων γονιδίων ή ενδογονιδιακών περιοχών). Το γεγονός ότι συνεχώς όλο και περισσότερα γονιδιώματα διαφόρων βακτηρίων δίδονται, πλέον,στη βιβλιογραφία πλήρως αναγνωσμένα, βοηθά στην εξέλιξη των μεθόδων αυτών.

Οι μέθοδοι μοριακής τυποποίησης που βασίζονται στη γενετική δομή βακτηρίων εφαρμόζονται για τη μελέτη της γενετικής δομής και εξέλιξης των οργανισμών, για την ανεύρεση τρόπου μετάδοσής τους σε περιπτώσεις επιδημίας και για τον προσδιορισμό της πηγής προέλευσής τους. Η ανάδειξη πολυμορφισμών και τροποποιήσεων στο χρωμοσωμικό γενετικό υλικό των οργανισμών θεωρείται ο πλέον ενδεδειγμένος τρόπος τυποποίησης, κυρίως όταν πρόκειται να πραγματοποιηθούν συγκριτικές μελέτες με μεγάλο αριθμό στελεχών (Turner, 1999 και Van Belkum και συνεργάτες, 2007)

Στις μοριακές μεθόδους πραγματοποιείται σύγκριση των κλασμάτων του DNA ή RNA. Τα μόρια DNA ή DNA κλάσματα διαχωρίζονται βάση του μοριακού τους βάρους με μια απλή ηλεκτροφόρηση, και κατ' αυτόν τον τρόπο αποκτώνται πληροφορίες για το μήκος του μορίου που εξετάζεται. Τα διάφορα μόρια που προκύπτουν από διαφορετικά βακτηριακά στελέχη συγκρίνονται και οι διαφορές τους στο μέγεθος μπορούν να αποτελέσουν εξαιρετικούς δείκτες για ταξινόμηση και τελική τυποποίηση των βακτηριακών στελεχών (Van Belkum και συνεργάτες, 2007).

Οι μοριακές μέθοδοι εμφανίζουν κάποια πλεονεκτήματα έναντι των φαινοτυπικών, που τις καθιστούν πιο αξιόπιστες και πιο χρηστικές στον καθορισμό του γένους ή και του είδους, αλλά ακόμη και υποείδους σε έναν βακτηριακό πληθυσμό. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα των μεθόδων εντοπίζεται στο ότι η τυποποίηση πραγματοποιείται βάση του γενετικού υλικού, έτσι έχουν την ικανότητα να αντιλαμβάνονται τις διαφορετικές αλληλουχίες και τη ποικιλότητα που εμφανίζουν τόσο στην πρωτοταγή δομή όσο και στον αριθμό των αντιγράφων που υπάρχουν σε κάθε χρωμόσωμα, με αποτέλεσμα να δίνονται δεδομένα για συντηρημένα αλλά και νέα χαρακτηριστικά σε επίπεδο ταξινόμησης (Van Belkum και συνεργάτες, 2007).

Μερικές σημαντικές μοριακές μέθοδοι είναι οι Μέθοδοι Υβριδισμού όπως είναι η Ριβοσωμική Τυποποίηση, κατά την οποία γίνεται μια εκτίμηση του αριθμού των ριβοσωμικών γονιδίων και της θέσης τους στο χρωμόσωμα. Οι Μέθοδοι Διαχωρισμού Κλασμάτων του DNA, όπως είναι η Pulsed Field Gel Electrophoresis, κατά την οποία διαχωρίζονται DNA κλάσματα μεγάλου μοριακού βάρους, (Turner, 1995), αλλά και η Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence polymerase chain reaction (ERIC-PCR) κατά την οποία πραγματοποιείται διαχωρισμός των DNA κλασμάτων με τυχαίους εκκινητές, σχεδιασμένους για τη συντηρημένη ERIC αλληλουχία.

Όλες οι μοριακές μέθοδοι είναι μέθοδοι με υψηλή διακριτική ικανότητα, επαναληψιμότητα παρέχοντας δεδομένα γρήγορα και αξιόπιστα (Van Belkum και συνεργάτες, 2007). Οι τεχνικές αποτυπώματος του DNA που χρησιμοποιούν ολικό γενωμικό υλικό παρέχουν πιο λεπτομερείς πληροφορίες

και έχουν μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα, από αυτές που χρησιμοποιούν μία μόνο περιοχή του DNA (Dos Angos Borges και συνεργάτες, 2003).

Ως τυποποίηση ορίζεται η διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται ανάλυση και αξιολόγηση των φαινοτυπικών ή/και γονοτυπικών χαρακτηριστικών των στελεχών του είδους που μελετάται. Η ανάλυση πραγματοποιείται σε επίπεδο είδους-υποείδους με σκοπό την ταξινόμηση των στελεχών σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά τους (Van Belkum και συνεργάτες, 2007).

Σκοπός της τυποποίησης αποτελεί:

1. Η μελέτη της διασποράς και μετάδοσης των μικροοργανισμών
2. Η μελέτη της δυναμικής των βακτηριακών πληθυσμών σε κλινικά και περιβαλλοντικά ενδιαιτήματα (Van Belkum και συνεργάτες, 2007).
3. Η μελέτη μιας επιδημίας, της παθογένειας και της πορείας μιας μόλυνσης
4. Η μελέτη ενός βακτηριακού πληθυσμού με σκοπό τον καθορισμό της δομής και των σχέσεων που αναπτύσσονται ανάμεσα σε αυτόν και σε άλλους βακτηριακούς πληθυσμούς.

Για να θεωρείται μία τυποποιητική μέθοδος αξιόπιστη πρέπει να ικανοποιεί κάποια κριτήρια. Τα κριτήρια αυτά περιλαμβάνουν τα εξής:

Ικανότητα τυποποίησης:

Είναι η ικανότητα της μεθόδου να προσδίδει έναν τύπο σε όλες τις απομονώσεις που ελέγχονται με τη μέθοδο αυτή. Η τυποποιητικότητα μιας μεθόδου υπολογίζεται ως το πηλίκο των στελεχών που τυποποιούνται πρός το πλήθος των αρχικών στελεχών που μελετώνται (Van Belkum και συνεργάτες, 2007).

Επαναληψιμότητα της μεθόδου:

Είναι η ικανότητα της μεθόδου τυποποίησης να κατατάσσει ένα υπό εξέταση στέλεχος στην ίδια ομάδα, και άρα στον ίδιο τύπο.

Σταθερότητα:

Πρόκειται για τη δυνατότητα της μεθόδου να ταξινομεί στην ίδια ομάδα στελέχη μικροοργανισμών όμοιας γενετικής δομής, ανεξάρτητα από τον χρόνο και τις γενιές που έχουν παρέλθει.

Διακριτική ικανότητα:

Αφορά στην ικανότητα μιας μεθόδου να καθορίζει τη διαφορετικότητα δύο μη σχετιζομένων στελεχών, που προήλθαν από ένα γνωστό βακτηριακό είδος. Για τον έλεγχο της διακριτικής ισχύος έχει καθοριστεί ο Δείκτης ανομοιότητας ή ποικιλομορφίας.

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

N=ο συνολικός αριθμός στελεχών που έχει τυποποιηθεί

S = ο συνολικός αριθμός τύπων

n_j = ο αριθμός στελεχών που ανήκουν στο j τύπο

Θεωρητικά μια μέθοδος πρέπει να έχει D=1,00, αλλά πρακτικά όταν το D>0,95 η μέθοδος έχει ικανοποιητική διακριτική ισχύ (Van Belkum και συνεργάτες, 2007).

Επιδημιολογική Ταύτιση:

Αφορά κυρίως σε επιδημιολογικές μελέτες και είναι η ικανότητα κατάταξης διαφόρων στελεχών που όμως συνδέονται επιδημιολογικά με τα ίδια περιστατικά (Van Belkum και συνεργάτες 2007).

Ακόμη όμως κι αν μια μέθοδος ικανοποιεί όλα τα παραπάνω κριτήρια, για να είναι αξιόπιστα τα αποτελέσματα υπάρχει η αναγκαιότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων της με μία ή περισσότερες τεχνικές. Επιπλέον, λαμβάνονται υπόψη και κάποια πρακτικά χαρακτηριστικά όπως η δυσκολία εφαρμογής και

επεξεργασίας των αποτελεσμάτων, το κόστος και η διαθεσιμότητα αντιδραστηρίων, καθώς και η ταχύτητα εξαγωγής αποτελεσμάτων, κυρίως όταν πρόκειται για θέματα διασφάλισης της Δημόσιας Υγείας και αντιμετώπισης περιπτώσεων μολύνσεων (Πίνακας 1.6) (Stoeckel και συνεργάτες 2004).

Πίνακας 1.6 : Κύρια χαρακτηριστικά μοριακών μεθόδων που εφαρμόζονται για την τυποποίηση βακτηριακών στελεχών (Olive & Bean 1999 και Βενιέρη, 2005)

Χαρακτηριστικό	**Μεθοδολογία**					
	PFGE	PCR-RFLP	Rep-PCR	RAPD	Ανάλυση ριβοτύπου	AFLP
Βαθμός Δυσκολίας	Μέτριος	Μικρός	Μικρός	Μικρός	Μέτριος	Μέτριος
Ερμηνεία Αποτελεσμάτων	Εύκολη	Εύκολη	Εύκολη	Εύκολη	Μέτρια	Δύσκολη
Διακριτική Ικανότητα	Υψηλή	Μέτρια	Υψηλή	Υψηλή	Μέτρια	Υψηλή
Χρόνος Διεξαγωγής Ανάλυσης (ημέρες)	3	1	1	1	2	2
Ενδοεργαστηριακή Επαναληψιμότητα	Καλή	Καλή	Καλή	Καλή	Καλή	Καλή
Επαναληψιμότητα μεταξύ Εργαστηρίων	Καλή	Καλή	Μέτρια	Μέτρια	Καλή	Καλή
Κόστος Εγκατάστασης	Μέτριο	Μέτριο	Μέτριο	Μέτριο	Μέτριο	Υψηλό
Κόστος Ανάλυσης	Μέτριο	Χαμηλό	Χαμηλό	Χαμηλό	Χαμηλό	Μέτριο

Είναι πολύ σημαντικό τα αποτελέσματα μιας τυποποιητικής μεθόδου να αξιολογούνται και να ερμηνεύονται πάντα σε συνδυασμό με τα πρόσφατα επιδημιολογικά, κλινικά και δημογραφικά δεδομένα. Όσον αφορά στην ανάπτυξη μιας Περιβαλλοντικής Μελέτης, όπως η μελέτη της Βιολογικής Διασποράς, τα στελέχη του βακτηρίου που θα χρησιμοποιηθούν πρέπει να σχετίζονται με τη ταξινόμηση, την ομολογία και τις μελέτες παθογένειας.

Τέλος, τα αποτελέσματα της μεθόδου πρέπει να μπορούν να αναπαραχθούν ανεξάρτητα από τον χρόνο, τον τόπο ή το προσωπικό του εργαστηρίου. (Van Belkum και συνεργάτες, 2007)

Αντίδραση ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence polymerase chain reaction)

Τα γονιδιώματα των προκαρυωτικών και κάποιων απλών ευκαρυωτικών οργανισμών διαθέτουν πολυάριθμες μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες παρέχουν στοιχεία για τη γενετική ανάλυση και τυποποίηση πολλών μικροοργανισμών, κυρίως των εντεροβακτηρίων (Lupski και Weinstock 1992, Ishii και Sadowsky, 2009). Οι αλληλουχίες αυτές, είναι οι REP (Repetitive Extragenic Palindromic elements), οι ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) αλληλουχίες και οι BOX αλληλουχίες. (Olive & Bean, 1999, Wilson και Sharp, 2006 και Lyautey και συνεργάτες, 2010).

Η εφαρμογή της αντίδρασης PCR γι' αυτές τις αλληλουχίες χρησιμοποιώντας ένα ή συνδυασμό εκκινητών επιτρέπει τη μελέτη και τυποποίηση μεγάλου αριθμού στελεχών και συμβάλλει στην ανίχνευση προέλευσής τους και την ανεύρεση διαφοροποιήσεων που έχουν στο γενετικό υλικό με σκοπό τη ταξινόμηση των βακτηριακών στελεχών σε ERIC –τύπους (McLellan, 2004 και Casarez και συνεργάτες, 2007).

Σήμερα, μία αξιόπιστη PCR αντίδραση θεωρείται εκείνη η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για πολλές μελέτες, όπως: εκτίμηση της γενετικής ποικιλομορφίας σε πληθυσμούς και είδη, μελέτη της φυλογενετικής σχέσης σε επίπεδο είδους και υποείδους, κατασκευή και κατανόηση του γενετικού χάρτη για κάποιο είδος και γενικότερα εκείνη που χρησιμοποιείται για τη γρήγορη και εύκολη δημιουργία αποτυπώματος για πολλούς μικροοργανισμούς (Meachm και συνεργάτες, 2003, Wilson and Sharp, 2006 και Van Belkum και συνεργάτες, 2009).

Αρχή Μεθόδου

Είναι μια PCR – μέθοδος, κατά την οποία τα DNA κλάσματα που πολλαπλασιάζονται είναι τυχαία. Χρησιμοποιεί οποιοδήποτε συνδυασμό εκκινητών, οι οποίοι είναι σχεδιασμένοι για τη συντηρημένη περιοχή ERIC,

αποτελούμενοι από λίγα νουκλεοτίδια και ένα μεγάλο εκμαγείο γενομικού DNA, στοχεύοντας στο ότι τα κλάσματα του γενετικού υλικού θα πολλαπλασιαστούν. Οι εκκινητές που χρησιμοποιεί μπορεί να είναι ένας μονός εκκινητής, ζεύγος εκκινητών ή πολλαπλές ομάδες εκκινητών (Olive & Bean, 1999 & Mohapatra & Mazumder, 2008) Έχει σκοπό να δημιουργήσει ένα ηλεκροφορητικό σχέδιο ζωνών, βασισμένο στη συχνότητα και στον προσανατολισμό των ERIC αλληλουχιών στο γονιδίωμα (Meachm και συνεργάτες, 2003, Ishii & Sadowsky, 2009).

Δεν είναι γνωστή η αλληλουχία στην οποία θα προσδεθούν οι εκκινητές καθώς έχουν ως στόχο τις αλληλουχίες που δεν είναι επαναλαμβανόμενες επάνω στο χρωμόσωμα και για αυτό θεωρείται και μη ειδική μέθοδος. Τα προϊόντα της αντίδρασης ERIC-PCR θεωρούνται μη ειδικά, γίνεται ανάλυση μικρού ποσοστού του γενετικού υλικού, ενώ δεν δίνονται πληροφορίες για την αλληλουχία μεταξύ των εκκινητών. Ανάλογα με τις θέσεις που υβριδίζουν οι εκκινητές και τη μεταξύ τους απόσταση πάνω στο χρωμόσωμα, προκύπτουν διαφορετικού πλήθους και μεγέθους τμήματα DNA από τα διαφορετικά στελέχη. Έτσι, αν έχει συμβεί κάποια μεταλλαγή στο γενομικό DNA σε κάποιο σημείο που πριν ήταν συμπληρωματικό με τον εκκινητή, σε μια νέα αντίδραση ERIC–PCR δεν θα δώσει ίδια αποτελέσμα, διότι θα υβριδοποιηθούν διαφορετικές αλληλουχίες. (Olive & Bean, 1999, Wilson & Sharp, 2005 & Ishii & Sadowsky, 2009).

Παράγοντες που επηρεάζουν τη μέθοδο

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). Σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την αντίδραση ERIC-PCR είναι η 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. Έχει δειχθεί ότι υψηλότερες θερμοκρασίες εμποδίζουν τον εκκινητή να ενισχύσει τις

αλληλουχίες του DNA. Επιπλέον, η επιλογή του κατάλληλου εκκινητή είναι πιθανά η πιο σημαντική παράμετρος για επιτυχή αντίδραση ERIC-PCR. Πρέπει να προσεχθούν η αλληλουχία του εκκινητή, το μήκος του και η συγκέντρωσή του (Βενιέρη, 2005).

Τα προϊόντα της μεθόδου εξαρτώνται από τον αριθμό και τη συχνότητα εμφάνισης των θέσεων υβριδισμού στη μήτρα του DNA. Καθώς οι θερμοκρασίες υβριδισμού είναι ιδιαίτερα χαμηλές είναι δύσκολο να προβλεφθούν τα αποτυπώματα, για αυτό είναι απαραίτητο να δοκιμαστούν αρκετοί συνδυασμοί εκκινητών για την επιλογή του καταλληλότερου για το εκάστοτε βακτήριο που μελετάται (Nikam, 2004 και Casarez και συνεργάτες, 2007).

Αρκετοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι η περιεκτικότητα σε γουανίνη – κυτοσίνη (GC) παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα του υβριδισμού του εκκινητή (Williams και συνεργάτες, 1990 & Wilson & Sharp, 2005).

Το βέλτιστο μήκος του εκκινητή εξαρτάται από τη μήτρα του DNA. Έχει προταθεί ότι εκκινητές μεγαλύτεροι από 8 νουκλεοτίδια δεν αυξάνουν σημαντικά την πληροφορία σε χαμηλές θερμοκρασίες υβριδισμού. Τέλος, τα προϊόντα της αντίδρασης μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τη συγκέντρωση του εκκινητή. Φαίνεται ότι η αντίδραση ενισχύει την παραγωγή μικρότερων προϊόντων όσο μεγαλώνει η αναλογία εκκινητής/μήτρα 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 master μίγμα της αντίδρασης μπορεί να οδηγήσει σε μη ειδική πρόσδεσή του στη μήτρα του DNA πριν καν αρχίσει η αντίδραση. Αυτοί οι δύο σημαντικοί παράγοντες, όπως επίσης και η συγκέντρωση της μήτρας DNA, αλλά και η DNA-πολυμεράση που θα χρησιμοποιηθεί, πρέπει να προσεχθούν ιδιαίτερα έτσι ώστε να βελτιστοποιηθεί η μέθοδος (Nikam, 2004, Βενιέρη, 2005 & Casarez και συνεργάτες, 2007).

Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα της αντίδρασης ERIC-PCR

Η αντίδραση ERIC-PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence polymerase chain reaction) είναι μια μοριακή τυποποιητική μέθοδος

με αρκετά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Όσον αφορά στα πλεονεκτήματα, είναι μια γρήγορη, εύκολη και σχετικά φτηνή μέθοδος και δεν χρησιμοποιούνται ραδιοϊσότοπα. Παράγεται ένας μεγάλος αριθμός ηλεκτροφορητικών ζωνών ανά εκκινητή και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί εύκολα για τη σύγκριση στελεχών όπου δεν απαιτούνται μεγάλα DNA κλάσματα δίνοντας αποτελέσματα αξιόπιστα με υψηλή διακριτικότητα (Stumph και συνεργάτες, 2005 και Casarez και συνεργάτες, 2007).

Δεν απαιτείται προηγούμενη γνώση της αλληλουχίας του DNA που μελετάται και θεωρητικά είναι μια μέθοδος που μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιονδήποτε μικροοργανισμό. Δεν χρειάζεται προηγούμενη προετοιμασία όπως για παράδειγμα απομόνωση DNA ιχνηλατών ή ανάλυση της αλληλουχίας (sequencing), οπότε η μέθοδος μπορεί να αυτοματοποιηθεί με σκοπό να χρησιμοποιηθεί για γονιδιακή ανάλυση (Lyautey και συνεργάτες, 2010).

Για πολλούς οργανισμούς, παρουσιάζει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα από άλλες γρήγορες - τυποποιητικές μεθόδους και γι’ αυτό χρησιμοποιείται τόσο συχνά. Επίσης είναι πιο γρήγορη από την PFGE και ο χρόνος προετοιμασίας και εκτέλεσης είναι μόνο μία ημέρα. Επιπλέον μηχανήματα PCR (θερμικοί κυκλοποιητές) υπάρχουν σε όλα τα κλινικά αλλά και περιβαλλοντικά εργαστήρια (Meacham και συνεργάτες, 2003 και Ishii & Sadowsky, 2009).

Από την άλλη πλευρά, παρουσιάζει κάποιους περιορισμούς λόγω των εκκινητών που χρησιμοποιούνται. Το σημαντικότερο ίσως μειονέκτημα της μεθόδου είναι η χαμηλή επαναληψιμότητα με αποτέλεσμα να δίνεται διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο κάθε φορά που πραγματοποιείται η αντίδραση PCR ακόμη κι αν πρόκειται για τα ίδια στελέχη (Meacham και συνεργάτες, 2003). Όπως ήδη αναφέρθηκε, η μέθοδος είναι ευαίσθητη στις αλλαγές των συνθηκών της αντίδρασης, όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση του DNA, η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου κ. λ. π. Φυσικά και η κλασική αντίδραση PCR επηρεάζεται από όλες αυτές τις παραμέτρους, αλλά στην αντίδραση ERIC-PCR το φαινόμενο είναι πιο έντονο λόγω της χρήσης μικρού μήκους εκκινητών (Βενιέρη, 2005, Ishii & Sadowsky, 2009, Lyautey και συνεργάτες, 2010).

Παρόλα τα προβλήματα που παρουσιάζονται στην πράξη, θεωρείται μια αξιόπιστη τυποποιητική μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για σύγκριση και ταξινόμηση στελεχών του ίδιου είδους, για γενετική χαρτογράφηση, για διαγνωστικούς σκοπούς και επιδημιολογικές μελέτες (Lyautey και οι συνεργάτες, 2010).

Φυλογενετικό Δέντρο

Τα φυλλογενετικά δέντρα είναι σχέδια στα οποία φαίνονται οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των οργανισμών. Κάθε σημείο συγκεκριμένου κλάδου ενός δενδρογράμματος καθορίζεται από συγκεκριμένο χαρακτηριστικό, κοινό στα διάφορα είδη που ανήκουν σε αυτόν (Wilson & Sharp, 2005 & Ishhi & Sadowsky, 2009). Σήμερα, τα φυλλογενετικά δέντρα των μικροοργανισμών κατασκευάζονται με βάση τις αλληλουχίες rRNA, και οι υπολογισμοί γίνονται από ειδικό λογισμικό υπολογιστών. (Phylip package, UPGMA clustering method, BioNumerics gel analysis) (Meacham και συνεργάτες, 2003, Felsenstein, 2007, Nikam, 2004, Ishii & Sadowsky, 2009)

Ένα από τα προγράμματα φυλογενετικής ανάλυσης είναι το λογισμικό PHYLIP 3.6.1.Το PHYLIP (the *PHYL*ogeny *I*nference *P*ackage) είναι ένα πακέτο προγραμμάτων για την δημιουργία φυλογενετικών δέντρων (Felsenstein, 2007, Tarraga και συνεργάτες, 2007).

1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Βάσει των γνωστών μεθόδων μικροβιακής καλλιέργειας μόνο το 1-5 % του συνόλου των μικροοργανισμών που βρίσκεται στο περιβάλλον είναι δυνατόν να ανακτηθεί σε καλλιέργεια στο εργαστήριο. Συνεπώς η ανάπτυξη μοριακών τεχνικών που συμπληρώνουν τις κλασικές τεχνικές είναι απαραίτητη για την κατανόηση της μικροβιακής ποικιλότητας. Η εφαρμογή μοριακών βιολογικών τεχνικών για ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση της δομής των μικροβιακών κυττάρων. Η παρουσία του χλωρίου στο πόσιμο νερό και στο νερό των κολυμβητηρίων δημιουργεί ένα οικοσύστημα με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, και επομένως είναι πιθανή η δημιουργία νέων στελεχών *E. coli*, με διαφοροποιημένα χαρακτηριστικά. Η

παρουσία του βακτηρίου *E.coli* θεωρείται βασικός δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης του νερού. **Εχει επομένως μεγάλο ενδιαφέρον η μελέτη στελεχών τα οποία, είτε έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα στο χλώριο, είτε έχουν υποστεί αλλοιώσεις που πιθανόν να δυσκολεύουν την ανίχνευσή τους με τις κλασικές καλλιεργητικές τεχνικές που χρησιμοποιούν τα εργαστήρια ποιοτικού ελέγχου των νερών**. Η παρουσία συσχετιζόμενων στελεχών σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές θα μπορούσε να ενισχύσει την υπόθεση αλλοιώσεων που προκαλούνται από περιβαλλοντικές συνθήκες όπως το χλώριο.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εκτίμηση της ποικιλότητας των στελεχών *E. coli* σε Διαφορετικά Περιβάλλοντα του Ελληνικού Οικοσυστήματος. Η προσέγγιση που αποφασίστηκε ήταν η μελέτη και η απομόνωση βακτηρίων *E. coli* από χλωριωμένα και μη δείγματα νερού προερχόμενα από κολυμβητικές δεξαμενές, δίκτυα ύδρευσης από διάφορα μέρη της Ελλάδας και από μία λίμνη. Η μελέτη περιλάμβανε απομόνωση κι επιβεβαίωση των αποικιών με βιοχημικές δοκιμές και με μοριακές τεχνικές. Επιλέχθηκε η μοριακή τεχνική ERIC-PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence polymerase chain reaction) και στόχος ήταν η εκτίμηση της φυλογενετικής συγγένειας των στελεχών με το λογισμικό πρόγραμμα Phylip 3.6.1 και ομαδοποίηση με βάση το προφίλ των ζωνών της αντίδρασης ERIC-PCR ώστε να καθορισθούν διάφοροι τύποι ERIC.

Τα αποτελέσματα θα βοηθούσαν στην εξαγωγή συμπερασμάτων για την κατανομή των βακτηρίων ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή και την έκθεση στο χλώριο.

Οι απαντήσεις στα παρακάτω ερωτήματα μπορούσαν επίσης να βοηθήσουν στη μελέτη και εκτίμηση των οδών της διασποράς και μετάδοσης του βακτηρίου *E. coli* και ίσως και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών.

Προσπάθεια έγινε επίσης, να διαπιστωθεί αν παρατεταμένη έκθεση των βακτηρίων *E. coli* σε χλωριωμένα νερά, μπορεί να οδηγήσει σε πιθανή δημιουργία στελεχών που σχετίζονται φυλογενετικά.

Παρόμοια καταγραφή των μοριακών τύπων περιβαλλοντικών στελεχών του βακτηρίου δεν έχει ξαναγίνει στον Ελλαδικό χώρο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψία

Περιοχές δειγματοληψίας

Κατά τη διάρκεια της Διπλωματικής Εργασίας πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες από 3 διαφορετικά οικοσυστήματα. Συνολικά εξετάστηκαν 101 δείγματα νερού για απομόνωση *Escherichia* spp. Τα 64 δείγματα ήταν από Κολυμβητικές Δεξαμενές (Πίνακας 2.1), τα 27 από Δίκτυα Υδρευσης από όλη την Ελλάδα (Πίνακας 2.2) και τα υπόλοιπα 13 από τη Λίμνη του Μαραθώνα (Πίνακας 2.3).

Η επιλογή των 3 αυτών οικοσυστημάτων έγινε με βάση τη συγκέντρωση του χλωρίου στα δείγματα νερού. Στις Κολυμβητικές Δεξαμενές η συγκέντρωση του χλωρίου ήταν αρκετά μεγαλύτερη σε σχέση με τα Δίκτυα Υδρευσης κι επομένως τα ενδογενή βακτήρια εκεί πιθανά να έχουν εκτεθεί πολύ περισότερο στο χλώριο. Σε αντίθεση, στην Λίμνη του Μαραθώνα τα βακτηριακά στελέχη δεν θα πρέπει να έχουν εκτεθεί καθόλου στο χλώριο.

Η δειγματοληψία κι η ανάλυση ορισμένων δειγμάτων από Δίκτυα ΄Υδρευσης έγιναν στο Κεντρικό Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας. Επίσης η δειγματοληψία κι η ανάλυση των δειγμάτων νερού από τη Λίμνη του Μαραθώνα έγινε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Τομέα Βοτανικής στο Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Στους Πίνακες 2.1, 2.2, 2.3, φαίνεται η κατανομή των δειγματοληψιών.

Οι θέσεις δειγματοληψίας περιλαμβάνουν τον Πύργο Υδροληψίας Βεντούρι, τα ρέματα της Σταμάτας, του Αγίου Στεφάνου, τη σήραγγα των Κιούρκων και το ρέμα του Βαρνάβα (Εικόνα 2.1).

Πίνακας 2.1: Δειγματοληψίες από κολυμβητικές Δεξαμενές Νομού Αττικής

ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΕΣ ΔΕΞΑΜΕΝΕΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΤΙΜΗ Cl_2 (mg\l)	ΗΜΕΡΟ-ΜΗΝΙΑ	pH	T (^oC)
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ	3	----------	30/06/08	----------	----------
ΠΕΤΡΟΥΠΟΛΗΣ	4	1,28/0,44/0,50/0,73	31/03/08	----------	----------
ΕΙΑΑ	5	0,41/0,18/0,57/0,41/1,28	31/03/08	----------	----------
ΑΓ.ΑΝΑΡΓΥΡΩΝ	2	0,46/0,30	31/03/08	----------	----------
ΠΕΡΙΣΤΕΡΙΟΥ	4	0,02/0,03/0,03/0,09	31/03/08	----------	----------
ΧΑΙΔΑΡΙΟΥ	3	0,98/0,56/0,88	02/04/08	----------	----------
ΑΙΓΑΛΕΩ	4	0,43/0,47/0,21/0,70	02/04/08	----------	----------
ΧΑΙΔΑΡΙΟΥ (ΙΔ.)	1	----------	07/04/08	----------	----------
ΠΕΡΙΣΤΕΡΙΟΥ (ΙΔ.)	3	0,63/0,60/0,61	30/06/08	----------	----------
ΑΙΓΑΛΕΩ	2	0,32/0,35	09/07/08	7,3	27,0
ΧΑΙΔΑΡΙΟΥ	2	0,45/0,55	09/07/08	6,5	27,5
ΠΕΡΙΣΤΕΡΙΟΥ	2	0,16/0,26	09/07/08	7,7	29,0
ΠΕΤΡΟΥΠΟΛΗΣ	2	0,46/0,30	09/07/08	7,0	28,0
ΑΓ.ΑΝΑΡΓΥΡΩΝ	1	0,26	09/07/08	6,0	28,0
ΣΧΙΣΤΟ ΧΑΙΔΑΡΙΟΥ	5	0,79/0,42/0,66/0,82/0	16/07/08	7,4/6,9/7,0/ 7,3/7,3	26/25,5/27, 0/26,5/25,5
HILTON	2	0,29/0,25	21/07/08	7,3/7,3	27,1/29,3
DIVANI ACROPOLIS	2	0,7/0,77	21/07/08	6,8/7,0	26,8/26,8
DIVANI CARAVEL	2	0,28/0,87	22/07/08	7,3/7,1	26,3/26,3
ZAFOLIA	2	0.37/0.36	22/07/08	7,1/7,0	26,1/26,1
ΓΥΜΝ. ΑΙΓΑΛΕΩ	1	0,4	10/09/08		
ΚΕΡΑΤΣΙΝΙΟΥ	3	1,07	06/10/08	7,8	26,9
ΠΑΠΑΣΤΡΑΤΕΙΟ	3	0,37	06/10/08	7,5	25,0
ΣΚΙΑΘΟΥ	1	----------	10/08/08	----------	----------
ΜΥΚΟΝΟΥ	1	----------	29/09/08	----------	----------
ΧΑΝΙΩΝ (COSTA-COSTA)	1	0,28	15/09/08	----------	----------
ΧΑΝΙΩΝ(GOLDEN SAND)	1	0,63	15/09/08	----------	----------
ΧΑΝΙΩΝ (ΩΚΑΝΟΣ)	2	0,22/0,23	15/09/08	----------	----------
ΣΥΝΟΛΟ	**64**				

*οι τιμές του pH, της T και κάποιες τιμές Cl_2 που δεν αναγράφονται στον πίνακα δεν ήταν δυνατόν να μετρήθούν.

Πίνακας 2.2: Δειγματοληψίες σε Δίκτυα Υδρευσης από όλη την Ελλάδα

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΔΙΚΤΥΑ ΥΔΡΕΥΣΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΤΙΜΗ Cl_2 (mg\l)
15/01/08	ΙΘΑΚΗΣ	1	0,2
15/01/08	ΙΘΑΚΗΣ	1	0,2
15/01/08	ΙΘΑΚΗΣ	1	0,2
15/01/08	ΙΘΑΚΗΣ	1	0,2
21/01/08	ΤΡΙΚΑΛΩΝ	1	0,2
21/01/08	ΕΥΡΥΤΑΝΙΑΣ	1	0,2
11/02/08	ΚΕΦ/ΝΙΑΣ Κ ΙΘΑΚΗΣ	1	0,2
11/02/08	ΛΑΚΩΝΙΑΣ(ΟΙΚΙΣΜΟΣ)	1	0,2
12/02/08	ΖΑΚΥΝΘΟΥ(ΚΑΤΑΣΤΗΜΑ)	1	0,2
12/02/08	ΖΑΚΥΝΘΟΥ(ΛΑΓΑΝΑΣ)	1	0,2
19/02/08	ΗΛΕΙΑΣ (ΒΡΥΣΗ ΚΑΤΑΣΤΗΜΑΤΟΣ)	1	0,2
19/02/09	ΗΛΕΙΑΣ (ΒΡΥΣΗ ΚΑΤΑΣΤΗΜΑΤΟΣ)	1	0,2
19/02/08	ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ ΟΙΚΙΣΜΟΣ (ΚΡΟΥΝΟΣ)	1	0
19/02/08	ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ (ΚΡΟΥΝΟΣ ΣΧΟΛΙΟΥ)	1	0,01
19/02/08	ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ (ΚΡΟΥΝΟΣ ΕΣΤΙΑΤΟΡΙΟΥ)	1	0
19/02/08	ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ (ΚΡΟΥΝΟΣ ΕΣΤΙΑΤΟΡΙΟΥ)	1	0
03/03/08	ΕΥΒΟΙΑΣ (ΝΗΠΙΑΓΩΓΕΙΟ)	1	0,2
03/03/08	ΕΥΒΟΙΑΣ (ΟΙΚΙΣΜΟΣ)	1	0,2
03/03/08	ΕΥΒΟΙΑΣ (ΟΙΚΙΣΜΟΣ)	1	0,2
03/03/08	ΝΑΞΟΣ (ΜΟΝΗ)	1	0,2
07/04/08	ΗΛΕΙΑΣ	1	0,2
07/04/08	ΕΥΒΟΙΑΣ	1	0,2
07/04/08	ΕΥΒΟΙΑΣ	1	0,2
07/04/08	ΕΥΒΟΙΑΣ	1	0,2
07/04/8	ΕΥΒΟΙΑΣ	1	0,2
20/05/08	ΝΑΞΟΥ	1	0,2
20/05/08	ΝΑΞΟΥ	1	0,2
	ΣΥΝΟΛΟ	**27**	

Πίνακας 2.3: Δειγματοληψίες στη Λίμνη του Μαραθώνα

ΘΕΣΗ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ
Αγ. Στέφανος	09/04/2007
Βεντούρι	30/03/2007
Βεντούρι	09/04/2007
Βεντούρι	10/07/2007
Βαρνάβα	09/04/2007
Βαρνάβα	16/04/2007
Βαρνάβα	10/07/2007
Κιούρκα	16/04/2007
Σταμάτα	12/04/2007
Σταμάτα	10/07/2007

Εικόνα 2.1: Πανοραμική άποψη της Λίμνης του Μαραθώνα και απεικόνιση των θέσεων όπου εκβάλλουν τα ρέματα στα οποία πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία (Λυμπεροπούλου, 2009)

Περιγραφή του Τρόπου δειγματοληψίας

Η δειγματοληψία και η μεταφορά των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με το ISO (ISO 19458, 2006)

Από κάθε επιλεγμένη θέση δειγματοληψίας (Κολυμβητική Δεξαμενή, Δίκτυο Υδρευσης) συλλέχθηκε όγκος δείγματος 1000 ml . Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε γυάλινα αποστειρωμένα μπουκάλια, με προσθήκη υποθειώδους νατρίου. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους 4 ^{o}C κατά τη μεταφορά, αναλύθηκαν εντός 24 ωρών και μέρος του δείγματος (100 ml) διηθήθηκε με ηθμό, Whatman, Schleicher and Schuell, διαμέτρου, 0,45 μm.

Από τις περιοχές δειγματοληψίας από τη Λίμνη του Μαραθώνα συλλέχθηκε όγκος ύδατος 20 λίτρων. Η συλλογή δειγμάτων έγινε σε πλαστικά δοχεία όγκου 10-15 λίτρων που είχαν αποστειρωθεί με χρήση διαλύματος αλκοόλης 70% (v/v) και ακτινοβολίας UV και είχαν εκπλυθεί με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό στο εργαστήριο. Μέρος του δείγματος διηθήθηκε με ηθμό διαμέτρου 0,22 μm.

2.2 Επεξεργασία των δειγμάτων

Διηθήθηκαν 100 ml από κάθε δείγμα με την χρήση μεμβράνης Whatman, Schleicher and Schuell 0,45 μm μέσω της ειδικής συσκευής διήθησης. Η μεμβράνη τοποθετείται στο εκλεκτικό υπόστρωμα Membrane Lauryl Sulphate Agar, έτσι ώστε να ευνοηθεί η ανάπτυξή του (Mavridou και συνεργάτες, 2010). Η καλλιέργεια του *Escherichia coli* επωάστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο **ISO 9308-1: 2000** Water quality- Detection and enumeration of Escerichia coli and coliform bacteria – Part 1: Membrane filtration method στους 44 ± 0,5 ^{o}C για 21 ± 3 ώρες Μετά την επώαση επιλέχθηκαν για ανακαλλιέργεια οι αποικίες που εμφανίσαν χρώμα κίτρινο.

2.3 Διατήρηση μικροοργανισμών

Τα στελέχη που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν, φυλάχθηκαν στους -80 ^{o}C σε Brain Heart + 20% γλυκερόλης.

2.4 Στελέχη αναφοράς

Χρησιμοποιήθηκαν πέντε στελέχη αναφοράς *Escherichia coli*, τα R1-R5 Reference Strains *Escherichia coli* (mean 45 cfus/Lenticule), NCTC 9001 (Batch 113-0404420 και 113-0304407), τα οποία προσφέρθηκαν από το Health Protection Agency (HPA), UK.

2.5 Θρεπτικά Υποστρώματα

Εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Membrane Lauryl Sulphate Broth (MLSB) + agar (MLSA), (Mavridou και συνεργάτες, 2010)

Είλ,χει (g/l): Πεπτόνη 39,0, Yeast Extract 6,0, Λακτόζη 30,0, Phenol red 0,2, Sodium lauryl sulphate 1,0. Διάλυση 76,2 g σε 1000 ml απεσταγμένου νερού και προσθήκη 14 g άγαρ πριν από την αποστείρωση. Θέρμανση του υλικού μέχρι το σημείο βρασμό και ρύθμισή του pH στους 7,4 ± 0,2. Αποστείρωση στους 115 ± 3 ^{o}C για 10 λεπτά. Το χρώμα του θρεπτικού υλικού ήταν κόκκινο διαυγές.

Tryptophan Broth (Metrolab)

Είχε (g/l): τρυπτόνη 10,0 , L- trptophan1,0, χλωριούχο νάτριο 5,0. Διάλυση με θέρμανση 15 σε 1000 ml απεσταγμένου νερού. Διανομή σε δοκιμαστικούς σωλήνες (3 ml). Αποστείρωση για 15 min στους 121 ± 3 ^{o}C. Ρύθμιση του pH, του έτοιμου προς χρήση θρεπτικού υλικού στο 7,5 ± 0,1 στους 25 ^{o}C.

Γενικό θρεπτικό υπόστρωμα για ανακαλλιέργειες - Nutrient Agar (NA) (Metrolab)

Είχε (g/l): πεπτόνη 5,0, εκχύλισμα κρέατος 1,0, εκχύλισμα ζύμης 2,0, χλωριούχο νάτριο 5,0, άγαρ 15,0. Διάλυση 28,0 g σε 1000 ml απιονισμένου νερού, ρύθμιση του pH στο 7,4±0,2 πριν την αποστείρωση και στη συνέχεια αποστείρωση στους 121 ºC για 15 min.

Γενικό θρεπτικό υπόστρωμα ανακαλλιεργειών - Nutrient broth (Metrolab)

Είχε (g/l): beef extract 3,0 και peptomeat 5,0. Διάλυση 8,0 g σε 1000 ml απιονισμένου νερού, διανομή σε δοκιμαστικούς σωλήνες (5 ml) και αποστείρωση στους 121 ºC για 15 min.

Θρεπτικό υπόστρωμα συντήρησης στελεχών στους -80ºC, Brain Heart + 20% glycerol (Merck)

Brain Heart infusion broth 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 ºC για 15 min. Μετά την αποστείρωση προστίθεται 20% γλυκερόλη.

2.6 ΧΗΜΙΚΑ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

10x Tris - Borate EDTA Buffer (TBE), (Sambrook και συνεργάτες, 1989)

Είχε: Tris – HCl 1M 108 g, Βορικό οξύ 55 g και 40 ml EDTA O,5 M. Για παρασκευή TBE 0,5 x έγινε αραίωση ποσότητας του TBE 10x (π. χ. για 100 ml TBE 0,5 x, σε 95 ml νερό προστέθηκαν 5 ml TBE 10x).

Διάλυμα λύσης κυττάρων A (πρωτόκολλο με proteinase K), (Wilson και Carson, 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 και συνεργάτες, 1997)

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

Tris – HCl 1M, (Sambrook και συνεργάτες, 1989)

Διαλθηκανι 121,1 g Tris base σε 650-700 ml υψηλής καθαρότητας νερό, προστέθηκαν 80 ml HCl και ρυθμίστηκε το pH. Συμπληρώθηκε νερό μέχρι τα 1000 ml και αποστείρωση στους 121 ºC για 15 min.

EDTA 0,5 M, (Sambrook και συνεργάτες, 1989)

Σε 800 ml υψηλής καθαρότητας νερό διαλύθηκαν 186,1 g $Na_2EDTA*2H_2O$ και ρυθμίστηκε το pH στο 8,0 προσθέτοντας σιγά-σιγά περίπου 50 ml 10 N

NaOH. Συμπληρώθηκε νερό μέχρι τα 1000 ml και αποστειρώθηκε στους 121 ºC για 15 min.

Βρωμιούχο Αιθίδιο (Ethidium Bromide,Fluka)

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

Διάλυμα Triton X-100 (Sigma)

Triton X-100 1%v/v

Ισοτονικό Διάλυμα PBS (g/l) (Bridson, 2006)

NaCl 8, KCl 0,2, μονόξινο φωσφορικό νάτριο 1,44, δισόξινο φωσφορικό νάτριο 0,24.

Διάλυμα Φόρτωσης (Μειντάνης, 2005)

0,25 % (w/v) κυανούν βρωμοφαινόλης (Sigma), 0,25 % (w/v) κυανολικό ξυλένιο (Sigma), 30% (w/v) γλυκερόλη. Το διάλυμα φυλάχθηκε στους 4 ^{o}C

Διάλυμα γλυκερόλης 30% (w/v) (Wellington και Williams, 1978)

Περιείχε 30 g γλυκερόλη σε 100 ml αποστειρωμένο και απεσταγμένο H_2O

Διάλυμα γλυκερόλης 20% (w/v) (Wellington και Williams, 1978)

Περιείχε 20 g γλυκερόλη σε 100 ml αποστειρωμένο και απεσταγμένο H_2O

Διάλυμα Καθαρής αιθανόλης: 99 % (v/v)

Αντιδραστήριο Kovacs' για ινδόλη

Περιείχε σε (g/l): p-dimethylaminobenzaldehyde 5,0, Amy or butyr alcohol 75,0 ml, Υδροχλωρικό οξύ (p= 1,18 g/ml) 25,0 ml. Το αντιδραστήριο πρέπει να έχει χρώμα ανοιχτό κίτρινο ή ανοιχτό καφέ. Κυκλοφορούν στο εμπόριο έτοιμα αντιδραστήρια(Scharlau)

Ταινίες οξειδάσης (Oxidase strips) (Merck)

Χρησιμοποιούνται ταινίες που κυκλοφορούν στο εμπόριο με την ονομασία Microbiology Bactodent Oxidase (Merck). Οι ταινίες ήταν εμποτισμένες με N,N-dimethyl-1,4-phenylene diammonium dichloride, ένας δείκτης, ο οποίος αλλάζει χρώμα όταν αντιδρά με οξειδάση.

2.7 Βιοχημικές δοκιμές

Ανακαλλιέργειες θετικών αποικιών

Η επιβεβαίωση των αποικιών των βακτηρίων *E. coli* έγινε στο γενικό στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar και σε αυτό ανακαλλιεργήθηκαν.

Από κάθε τρυβλίο MLSA που επωάστηκε στους 44 ± 0,5 ^{o}C επιλέχθηκαν οι αποικίες με κίτρινο χρώμα και ανακαλλιεργήθηκαν σε Nutrient Agar με τη μέθοδο των παράλληλων γραμμών με σκοπό να ληφθούν καθαρές καλλιέργειες από κάθε στέλεχος. Ακολούθησε επώαση στους 36 ± 2 ^{o}C για 22 ± 3 ώρες.

Αντίδραση οξειδάσης

Ο έλεγχος έγινε με τις ταινίες οξειδάσης (Merck). Οι ταινίες ήταν εμποτισμένες με N,N-dimethyl-1,4-phenylene diammonium dichloride, ένας δείκτης, ο οποίος αλλάζει χρώμα παρουσία οξειδάσης. Έτσι, μεταφέρεται η αποικία σε μια ταινία και εάν παραχθεί οξειδάση η ταινία παίρνει ένα χρώμα από μπλε έως βαθύ μπλε-μωβ και η δοκιμή θεωρείται θετική. Το *Escherichia coli* ήταν αρνητικό στη δοκιμασία της οξειδάσης. Η δοκιμασία εφαρμόστηκε όπως περιγράφεται στο Βιβλίο Εργαστηριακών Ασκήσεων Μικροβιολογίας (Καραγκούνη, 2001).

Παραγωγή ινδόλης

Δοκιμαστικός σωλήνας με 10 ml υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Tryptophan Broth εμβολιάστηκε με μία αποικία από καθαρή καλλιέργεια. Επωάστηκε στους 36 ± 2 ^{o}C για 22 ± 3 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκε 0,2 με 0,3 ml αντιδραστηρίου Kovacs'. Η δημιουργία ενός ροζ δακτυλίου στην επιφάνεια του

θρεπτικού υγρού επιβεβαίωσε την παραγωγή της ινδόλης. Το *Escherichia coli* ήταν θετικό στην αντίδραση της ινδόλης (Καραγκούνη, 2001).

2.8 Μοριακές Τεχνικές Απομόνωσης DNA από *E. coli*

Για τη τυποποίηση των στελεχών *Escherichia coli* απαιτείται απομόνωση καθαρού DNA. Στην εργασία αυτή για την απομόνωση του DNA από τα περιβαλλοντικά στελέχη *E. coli* χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές διαδικασίες (πρωτόκολλα) κι έγινε σύγκριση ώστε να επιλεχθεί η καλύτερη μέθοδος.

1. **Διαδικασία απομόνωσης DNA με proteinase K (Wilson T. & Carson J., 2001)**

Στην αρχή πραγματοποιήθηκε ένα απλό πρωτόκολλο για απομόνωση DNA (crude) με Lysis Buffer που περιείχε proteinase K. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Ανακαλλιέργεια του στελέχους από το κρυοφιαλίδιο (-80 °C) σε γενικό θρεπτικό υπόστρωμα, Nutrinet Agar και επώαση στους 37 ºC για 24 h.
2. Μεταφορά κυττάρων σε φυγοκεντρικούς σωλήνες τύπου eppendorf με 1,5 ml PBS ή Φ.Ο.
3. Φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 5 min
4. Απόρριψη του υπερκειμένου
5. Επαναδιάλυση του ιζήματος με 100 μl Lysis Buffer (βλ. § 2.4.2) και προσθήκη 200 μg/ml proteinase K
6. Επώαση στους 37 ºC για 2 h ή στους 56 ºC για 1 h
7. Βράσιμο για 10 min
8. Μεταφορά υπερκειμένου (περιέχει το DNA) σε καθαρό σωλήνα.

Το υπερκείμενο περιέχει το γενετικό υλικό, το οποίο φυλάχθηκε στους -20 ºC και χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση ERIC-PCR.

2. **Διαδικασία απομόνωσης DNA με Lysis Buffer (Haught και συνεργάτες, 1994).**

Δοκιμάστηκε ένα πρωτόκολλο απομόνωσης DNA, στο οποίο χρησιμοποιήθηκε λυσοζύμη κατά το στάδιο της λύσης των κυττάρων με στόχο την απομόνωση DNA υψηλής καθαρότητας και σε περισσότερη ποσότητα. Το πρωτόκολλο περιλάμβανε τα εξής στάδια:

1. Ανακαλλιέργεια στου στελέχους από το κρυοφιαλίδιο (-80 °C) σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar και επώαση στους 37 °C για 20 h
2. Μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένο κρίκο εμβολισμού σε φυγοκεντρικούς σωλήνες που περιείχαν 500 μl διαλύματος $MgSO_4$ 10 mM
3. Φυγοκεντρήθηκαν σε 15000×g για 10 λεπτά στους 4 ^{o}C.
4. Προστέθηκαν 500 μl διαλύματος λύσης (βλ. 2.4.3)
5. Επωάστηκαν για 2 ώρες στους 37 °C
6. Προστέθηκε διάλυμα 125 μl SDS 10 %
7. Επωάστηκε στους 65 °C για 20 λεπτά
8. Φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά, στις 14.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4 °C
9. Μεταφέρθηκε το υπερκείμενο σε καθαρούς σωλήνες
10. Προστέθηκαν 216 μl διαλύματος οξικού καλίου 5 M και έγινε άμεση μεταφορά των σωλήνων σε πάγο για 30 λεπτά
11. Φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 14.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4 °C
12. Μεταφέρθηκε το υπερκείμενου σε καθαρούς σωλήνες
13. Έγινε καταβύθιση με προσθήκη 80 % ισοπροπανόλης για 30 λεπτά σε RT
14. Φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά, στις 14.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4 °C
15. Προστέθηκαν 500 μl αιθανόλης 70 %

16. Φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά, στις 14.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4 °C
17. Το ίζημα ξηράθηκε και αναδιαλύθηκε σε απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ή TE buffer (Haught και συνεργάτες, 1994).

3. Διαδικασία απομόνωσης DNA με kit εμπορίου

Η απομόνωση του ολικού DNA από τα βακτηριακά κύτταρα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του QIAampDNA stool Mini Kit της Qiagen, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Τα προιόντα και από τις 3 αυτές διαδικασίες απομόνωσης DNA, φωτομετρήθηκαν σε ειδικό για DNA φωτόμετρο (eppendorf) για να συγκριθεί η συγκέντρωση του DNA και να γίνει η επιλογή του καταλληλότερου πρωτοκόλλου.

2.8.1 Αντίδραση ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence polymerase chain reaction)

Στη συγκεκριμένη εργασία ελέγχθηκαν με την ERIC-PCR (βλ. παρ. 1.5) τα 117 στελέχη της *Escherichia coli* ταυτοποιήθηκαν με τις επιβεβαιωτικές βιοχημικές διαδικασιες. Χρησιμοποιήθηκαν 2 τυχαίοι εκκινητές, οι οποίοι είχαν ελεγχθεί ως προς τα αποτελέσματά τους σε διάφορες εργασίες και είναι οι: ERIC 1: 5΄ -ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC -3΄ και ERIC 2: 5΄ -AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG– 3’ (Rademaker & de Bruijn, 1997). Η σύσταση του μείγματος της αντίδρασης PCR, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των ERIC αλληλουχιών του προκαρυωτικού γονιδιώματος ήταν η εξής : 40 ng γενωμικού DNA, c DNA, 10 mM KCl (Biolabs, New England), 10 mM Tris – HCl (pH 9,0), 0,1 % (w/v), Triton X-100 (Biolabs, New England), 1 Unit Taq DNA polymerase (Biolabs, New England), 0,2 mM dNTPs (Biolabs, New England), 3,75 mM $MgCl_2$(Biolabs, New England), 4 % (v/v) DMSO (Biolabs, New England) and 20 nM of each ERIC primer ((Invitrogen)

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε στις εξής συνθήκες :

94 ^{o}C για 10 min

94 ^{o}C για 1 min
52 ^{o}C για 1 min } x 35 κύκλους
65 ^{o}C για 8 min

65 ^{o}C για 16 min για την τελική επιμήκυνση

(Rademaker & de Bruijn, 1997)

2.8.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Στη συνέχεια τα προϊόντα της αντίδρασης ERIC-PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1,2% (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν 80 V και η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης ήταν 2 ώρες.

Χρησιμοποιήθηκε αγαρόζη συγκεκριμένης πυκνότητας καθώς το εύρος στο οποίο απαιτήθηκε για τον διαχωρισμό των κλασμάτων του DNA κυμάνθηκε από 200 έως 3000 bp. (Sambrook και συνεργάτες, 1989)

Κατά την ηλεκτροφόρηση υπήρχαν παράμετροι που έπρεπε να προσεχθούν ιδιαίτερα. Το πήκτωμα βάφτηκε με Βρωμιούχο Αιθίδιο, μια φθορίζουσα χρωστική, με την οποία μπορεί κανείς να δει τον διαχωρισμό του DNA επάνω στο πήκτωμα μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφορητική ικανότητα του DNA εξαρτάται 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 κινείται πολύ αργά ή και καθόλου, ενώ στην αντίθετη περίπτωση η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι πολύ υψηλή, το πήκτωμα υπερθερμαίνεται και το DNA αποδιατάσσεται.

Μια ακόμη παράμετρος που έπρεπε να ληφθεί υπόψη ήταν και η τάση στην οποία εκκινείτο το πήκτωμα στην ηλεκτροφορητική συσκευή. Επειδή η

ικανότητα διαχωρισμού του DNA μειώνεται όσο η τάση αυξάνεται, γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε χαμηλή τάση στη συσκευή, περίπου στα 75V. Τα PCR προϊόντα πριν ''φορτωθούν'' στο πήκτωμα βάφτηκαν με μια χρωστική που καλείται χρωστική φόρτωσης και αποσκοπεί στα εξής:

- ✓ Να αυξήσει την πυκνότητα του δείγματος, βεβαιώνοντας ότι το DNA έπεσε μέσα στο πηγαδάκι του πηκτώματος.
- ✓ Να ''προσθέσει'' χρώμα στο δείγμα, κάνοντας τη διαδικασία πιο απλή
- ✓ Να περιέχουν ουσίες, οι οποίες ''κινηθούν' προς την ίδια κατεύθυνση με το DNA βοηθώντας τον διαχωρισμό του σε κλάσματα.

Η αντίδραση ERIC-PCR, σε αντίθεση με άλλες PCR μεθόδους, πραγματοποιείται με μη ειδικούς εκκινητές και σε αυστηρά χαμηλή θερμοκρασία αναδιάταξης του γενετικού υλικού, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικά προϊόντα σε κάθε αντίδραση ακόμα και για τις ίδιες τις αλληλουχίες. Για τον λόγο αυτό, όλες οι ηλεκτροφορήσεις των στελεχών πραγματοποιήθηκαν στις ίδιες ακριβώς συνθήκες (Sambrook και συνεργάτες, 1989).

2.8.3 Λογισμικό πρόγραμμα PHYLIP 3.6.1 (Phylogeny Inference Package)

Η φυλογενετική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό PHYLIP 3.6.1. Το PHYLIP (the *PHYL*ogeny *I*nference *P*ackage) είναι ένα πακέτο προγραμμάτων για τη δημιουργία φυλογενετικών δέντρων (Felsenstein, 1989).

Οι τύποι δεδομένων που μπορεί να χρησιμοποιήσει το πρόγραμμα είναι αρκετοί. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα RESTDIST, για τον υπολογισμό της φυλογενετικής απόστασης των στελεχών, και NEIGHBOR, για τον υπολογισμό του φυλογενετικού δέντρου. Η σχεδίαση του φυλογενετικού δέντρου πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα NJPLOT . (Perrière & Gouy, 1996).

Τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται για να υπολογιστουν οι αποστασεις και η φυλογενετική συγγένεια προέρχονται από τμήματα DNA που παρήχθησαν κατά την αντίδραση ERIC-PCR. http://evolution.genetics.washington.edu .

Το αρχείο αναλύθηκε από το πρόγραμμα RESTDIST εισάγοντας σαν αριθμό περιοριστικών θέσεων το 2 και σαν μήκος ακολουθίας αναγνώρισης το 44, που είναι το συνολικό μήκος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR. Το προκύπτον αρχείο επεξεργάστηκε το πρόγραμμα NEIGHBOR, χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο UPGMA. Το αρχείο που προέκυψε, χρησιμοποιήθηκε από το πρόγραμμα NJPLOT για τον σχεδιασμό του φυλογενετικού δέντρου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση και φαινοτυπική Ταυτοποίηση νέων στελεχών *Escherichia coli* από διάφορα υδάτινα οικοσυστήματα.

Από τα 101 δείγματα νερού που αναλύθηκαν απομονώθηκαν 143 καθαρές αποικίες, οι οποίες θεωρήθηκαν με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά προκαταρκτικά θετικές, σύμφωνα με τις μεθόδους ISO 9308-1: 2000: Water quality-Detection and enumeration of *Escherichia coli* – Part 1: Membrane filtration method, το οποίο περιγράφει την επίσημη μέθοδο φαινοτυπικής ταυτοποιησης του *E. coli* που απομονώνεται από δείγματα νερού.
Όλα τα απομονωθέντα στελέχη ανακαλλιεργήθηκαν σε γενικό στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar κι ελέγχθηκαν για παραγωγή ινδόλης και μη παραγωγή οξειδάσης, με στόχο την επιβεβαίωση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών.

Συνολικά από τα 143 στελέχη, που ελέγχθηκαν επιβεβαιώθηκαν ως βακτήρια *E. coli*, τα 117 (82%) (Πίνακας 3.1)

Τα υπόλοιπα 26 απομονωθέντα στελέχη (18%) έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα και στις δύο δοκιμασίες, οπότε δεν θεωρήθηκαν ως *E. coli* με τις συγκεκριμένες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία και κάτω από τις δοσμένες συνθήκες.

Τα 77 στελέχη απομονώθηκαν από δίκτυα ύδρευσης από διάφορες περιοχές σε όλη την Ελλάδα (65%). 17 στελέχη (13%) απομονώθηκαν από κολυμβητικές δεξαμενές και τα υπόλοιπα 23 (22%) απομονώθηκαν από πύργους υδροληψίας και ρέματα που καταλήγουν στη Λίμνη του Μαραθώνα (βλ. παράγραφο 2.1)

Πίνακας 3.1: Στελέχη *E. coli* και περιοχή προέλευσης. Φαίνεται η παρουσία χλωρίου σε ppm (μL/L) .

Α/Α	Προέλευση	Παρουσία χλώρίου στο υδάτινο οικοσύστημα ppm (μL/L)	Στελέχη
1	Δ.Υ. ΘΕΣ/ΝΙΚΗΣ	0,2. (Cl+)	Mb
2	Δ.Υ. ΘΕΣ/ΝΙΚΗΣ	0,2. (Cl+)	Mc
3	Δ.Υ ΤΡΙΚΑΛΩΝ	0,2. (Cl+)	6
4	Δ.Υ ΕΥΡΥΤΑΝΙΑΣ	0,2. (Cl+)	5a
5	Δ.Υ ΕΥΡΥΤΑΝΙΑΣ	0,2. (Cl+)	5b
6	Δ.Υ ΕΥΡΥΤΑΝΙΑΣ	0,2. (Cl+)	5g
7	Δ.Υ ΕΥΡΥΤΑΝΙΑΣ	0,2. (Cl+)	5d
8	Δ.Υ ΕΥΡΥΤΑΝΙΑΣ	0,2. (Cl+)	5e
9	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	17a
10	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	17b
11	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	17c
12	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	17d
13	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	18a
14	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	18b
15	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	19
16	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	21a
17	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	21b
18	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	21c
19	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	22

Πίνακας 3.1 (συνέχεια)

20	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**23a**
21	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**23b**
22	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**23c**
23	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**24a**
24	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**24b**
25	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**24c**
26	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**24d**
27	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**25a**
28	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**25b**
29	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**25c**
30	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**25d**
31	Δ.Υ ΕΥΒΟΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**25e**
32	Δ.Υ ΗΛΕΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**11a**
33	Δ.Υ ΗΛΕΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**11b**
34	Δ.Υ ΗΛΕΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**12a**
35	Δ.Υ ΗΛΕΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**12b**
36	Δ.Υ ΗΛΕΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**12c**
37	Δ.Υ ΗΛΕΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**12d**
38	Δ.Υ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	0 (Cl-)	**13a**
39	Δ.Υ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	0 (Cl-)	**13b**
40	Δ.Υ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	0 (Cl-)	**13c**
41	Δ.Υ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	0 (Cl-)	**13d**
42	Δ.Υ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	0,01 (Cl-)	**14a**
43	Δ.Υ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	0,01 (Cl-)	**14b**
44	Δ.Υ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	0,01 (Cl-)	**14c**

Πίνακας 3.1 (συνέχεια)

45	Δ.Υ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	0,01(Cl-)	**14d**
46	Δ.Υ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	0,01(Cl-)	**14e**
47	Δ.Υ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	0 (Cl-)	**15a**
48	Δ.Υ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	0 (Cl-)	**15b**
49	Δ.Υ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	0 (Cl-)	**15c**
50	Δ.Υ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	0 (Cl-)	**15d**
51	Δ.Υ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	0 (Cl-)	**15e**
52	Δ.Υ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	0 (Cl-)	**16a**
53	Δ.Υ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	0 (Cl-)	**16b**
54	Δ.Υ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	0 (Cl-)	**16c**
55	Δ.Υ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	0 (Cl-)	**16d**
56	Δ.Υ ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ	0 (Cl-)	**16e**
57	Δ.Υ ΛΑΚΩΝΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**8a**
58	Δ.Υ ΛΑΚΩΝΙΑΣ	0,2. (Cl+)	**8b**
59	Δ.Υ ΙΘΑΚΗΣ	0,2. (Cl+)	**1**
60	Δ.Υ ΙΘΑΚΗΣ	0,2. (Cl+)	**2**
61	Δ.Υ ΙΘΑΚΗΣ	0,2. (Cl+)	**3**
62	Δ.Υ ΙΘΑΚΗΣ	0,2. (Cl+)	**4a**
63	Δ.Υ ΙΘΑΚΗΣ	0,2. (Cl+)	**4b**
64	Δ.Υ ΙΘΑΚΗΣ	0,2. (Cl+)	**7**
65	Δ.Υ ΖΑΚΥΝΘΟΥ	0,2. (Cl+)	**9a**
66	Δ.Υ ΖΑΚΥΝΘΟΥ	0,2. (Cl+)	**9b**
67	Δ.Υ ΖΑΚΥΝΘΟΥ	0,2. (Cl+)	**9c**
68	Δ.Υ ΖΑΚΥΝΘΟΥ	0,2. (Cl+)	**10**
69	Δ.Υ ΝΑΞΟΥ	0,2. (Cl+)	**20a**

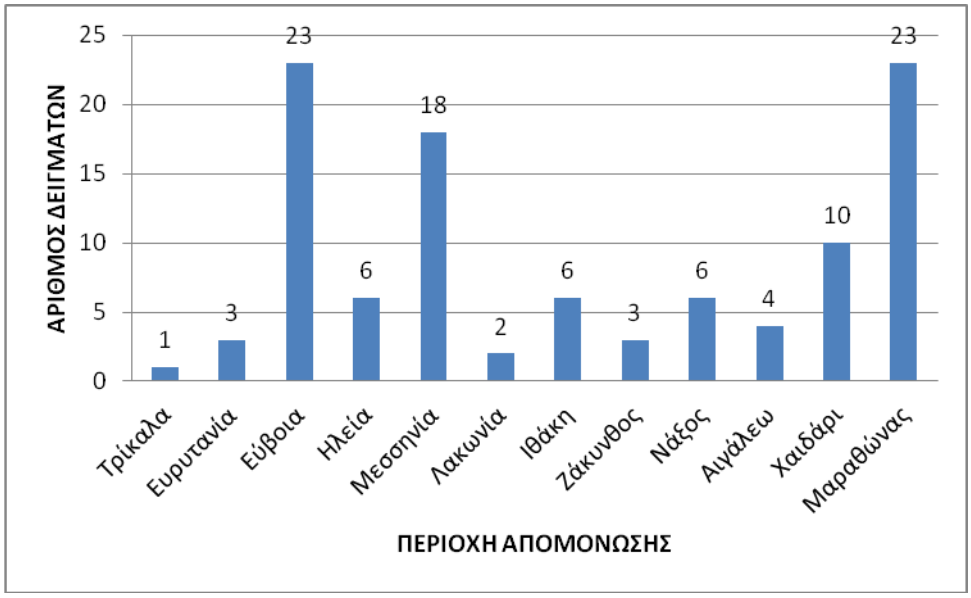
Πίνακας 3.1 (συνέχεια)

70	Δ.Υ ΝΑΞΟΥ	0,2. (Cl+)	**20b**
71	Δ.Υ ΝΑΞΟΥ	0,2. (Cl+)	**20c**
72	Δ.Υ ΝΑΞΟΥ	0,2. (Cl+)	**20d**
73	Δ.Υ ΝΑΞΟΥ	0,2. (Cl+)	**20e**
74	Δ.Υ ΝΑΞΟΥ	0,2. (Cl+)	**26a**
75	Δ.Υ ΝΑΞΟΥ	0,2. (Cl+)	**26b**
76	Δ.Υ ΝΑΞΟΥ	0,2. (Cl+)	**27a**
77	Δ.Υ ΝΑΞΟΥ	0,2. (Cl+)	**27b**
78	Κ.Δ ΑΙΓΑΛΕΩ	0,4 (Cl+)	**28**
79	Κ.Δ ΑΙΓΑΛΕΩ	0,4 (Cl+)	**30**
80	Κ.Δ ΑΙΓΑΛΕΩ	0,4 (Cl+)	**31**
81	Κ.Δ ΑΙΓΑΛΕΩ	0,4 (Cl+)	**32**
82	Κ.Δ ΑΙΓΑΛΕΩ	0,4 (Cl+)	**33**
83	Κ.Δ ΧΑΙΔΑΡΙΟΥ	0 (Cl-)	**34**
84	Κ.Δ ΧΑΙΔΑΡΙΟΥ	0 (Cl-)	**35**
85	Κ.Δ ΧΑΙΔΑΡΙΟΥ	0 (Cl-)	**36**
86	Κ.Δ ΧΑΙΔΑΡΙΟΥ	0 (Cl-)	**37**
87	Κ.Δ ΧΑΙΔΑΡΙΟΥ	0 (Cl-)	**38**
88	Κ.Δ ΧΑΙΔΑΡΙΟΥ	0 (Cl-)	**39**
89	Κ.Δ ΧΑΙΔΑΡΙΟΥ	0 (Cl-)	**40**
90	Κ.Δ ΧΑΙΔΑΡΙΟΥ	0 (Cl-)	**41**
91	Κ.Δ ΧΑΙΔΑΡΙΟΥ	0 (Cl-)	**42**
92	Κ.Δ ΧΑΙΔΑΡΙΟΥ	0 (Cl-)	**43**
93	Κ.Δ ΧΑΙΔΑΡΙΟΥ	0 (Cl-)	**44**
94	Κ.Δ ΧΑΙΔΑΡΙΟΥ	0 (Cl-)	**45**

Πίνακας 3.1 (συνέχεια)

95	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ – Βαρνάβα	0	(Cl-)	**48**
96	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ – Βαρνάβα	0	(Cl-)	**49**
97	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ – Βαρνάβα	0	(Cl-)	**52**
98	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ – Βαρνάβα	0	(Cl-)	**53**
99	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ – Βαρνάβα	0	(Cl-)	**57**
100	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ - Βαρνάβα	0	(Cl-)	**58**
101	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ -Βαρνάβα	0	(Cl-)	**59**
102	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ – Βαρνάβα	0	(Cl-)	**62**
103	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ – Βαρνάβα	0	(Cl-)	**63**
104	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ – Βαρνάβα	0	(Cl-)	**64**
105	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ – Βαρνάβα	0	(Cl-)	**66**
106	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ – Βαρνάβα	0	(Cl-)	**67**
107	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ – Βεντούρι	0	(Cl-)	**46**
108	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ – Βεντούρι	0	(Cl-)	**54**
109	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ – Βεντούρι	0	(Cl-)	**55**
110	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ – Βεντούρι	0	(Cl-)	**56**
111	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ - Βεντούρι	0	(Cl-)	**61**
112	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ – Βεντούρι	0	(Cl-)	**65**
113	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ – Βεντούρι	0	(Cl-)	**68**
114	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ – Κιούρκα	0	(Cl-)	**47**
115	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ – Σταμάτα	0	(Cl-)	**51**
116	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ – Σταμάτα	0	(Cl-)	**60**
117	ΛΙΜΝΗ ΜΑΡΑΘΩΝΑ - Αγ. Στέφανος	0	(Cl-)	50

Στην Εικόνα 3.1 φαίνονται οι περιοχές από τις οποίες έγινε η δειγματοληψία και ο αριθμός των απομονωθέντων βακτηρίων από την κάθε περιοχή.



Εικόνα 3.1: Γεωγραφική κατανομή παρουσίας των στελεχών *E. coli* που απομονώθηκαν από όλα τα δείγματα νερών στην Ελλάδα.

Ο μεγαλύτερος αριθμός απομονωθέντων στελεχών παρατηρήθηκε από τη Λίμνη του Μαραθώνα και από το ΄δικτυο ύδρευσης από την περιοχή της Εύοιας (23) με ποσοστό 19,6%. Ακολουθεί το δίκτυο ύδρευσης από την περιοχή της Μεσσηνίας (18) με ποσοστό 15%. Από την κολυμβητική δεξαμενή από την περιοχή του Χαιδρίου απομονώθηκαν 10 στελέχη (11,7%), ενώ πολύ μικρός αριθμός στελεχών απομονώθηκε από το δίκτυο ύδρευσης Ηλείας, Ιθάκης και Νάξου (6) με ποσοσστό 7%, από την κολυμβητικη δεξαμενή στην περιοχή Αιγάλεω (4) με ποσοστό 4,7%, ακολουθώντας το δίκτυο ύδρευσης της Ευρυτανίας και της Ζακύνθου (3) με ποσοσστό 3.5%. Το χαμηλότερο ποσοστό απομονωθέντων στελεχών, ήταν στην περιοχή των Τρικάλων (1) με ποσοστό 0,9%.

3.2 Μοριακή τυποποιήση στελεχών *Escherichia coli*

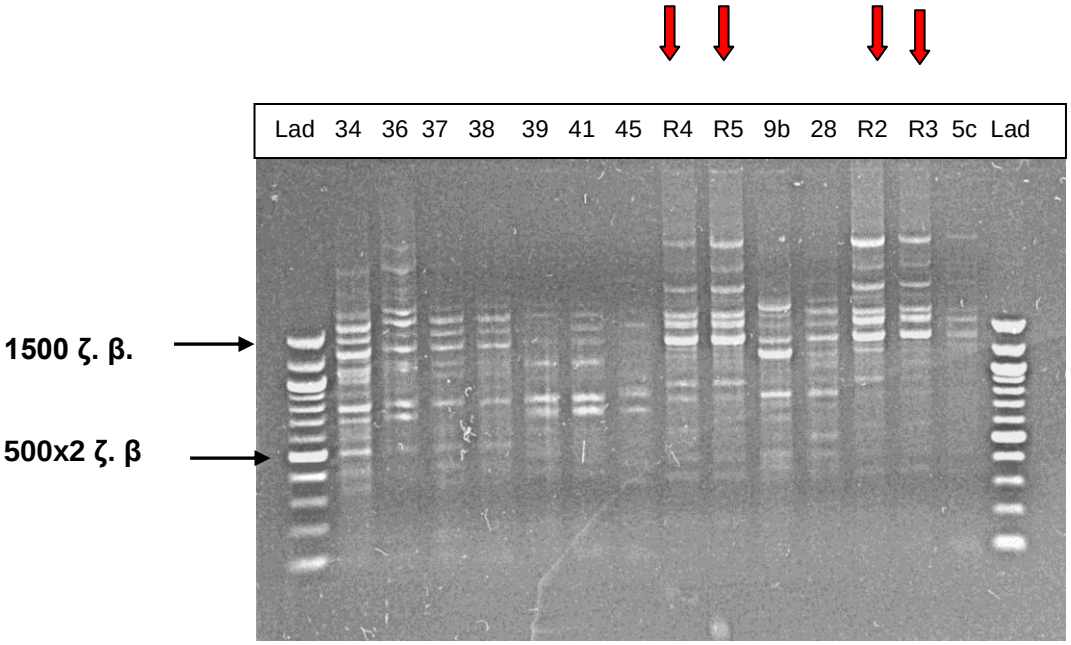
Στις 117 απομονώσεις που είχαν φαινοτυπικά προσδιοριστεί ως *Escherichia coli,* έγινε ανάλυση DNA, το οποίο είχε απομονωθεί όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.8, πρωτόκολλο 3 διότι μετά από σύγκριση με τις άλλες

μεθόδους απομόνωσης DNA αποδείχθηκε υψηλότερης καθαρότητας και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση.

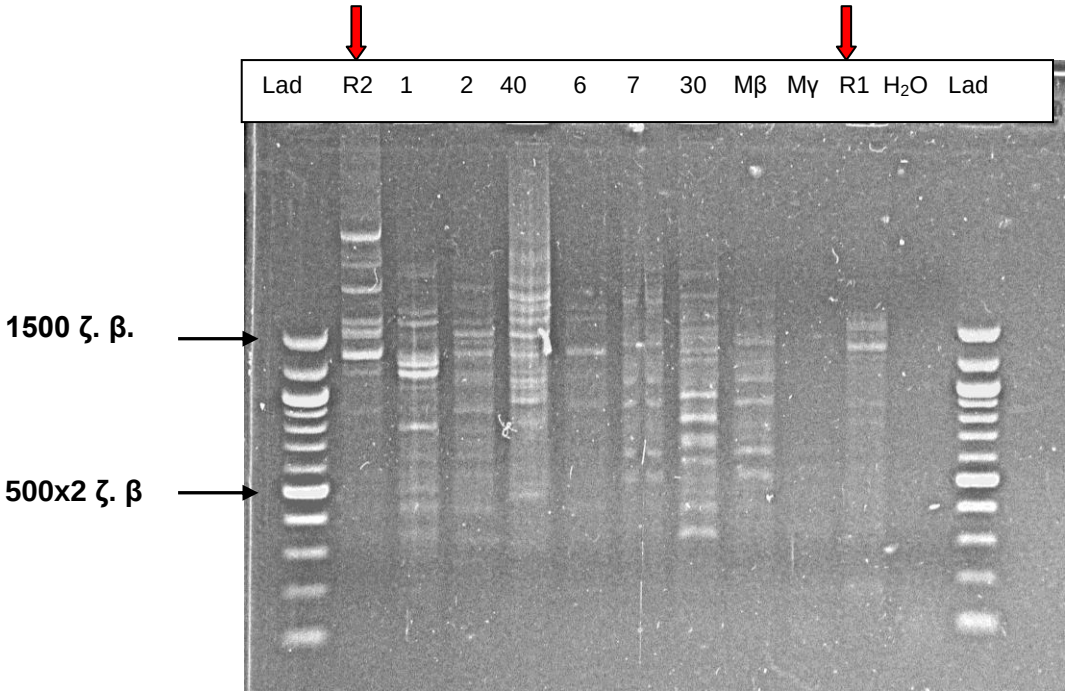
Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αντίδρση ERIC–PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (βλ. παράγραφο 2.8.2). Ως στελέχη αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα *E. coli* R1-R5, για τον έλεγχο της μεθόδου.

3.2.1 Πρότυπα των απομονωθέντων στελεχών *E. coli* βάσει της αντίδρασης ERIC-PCR

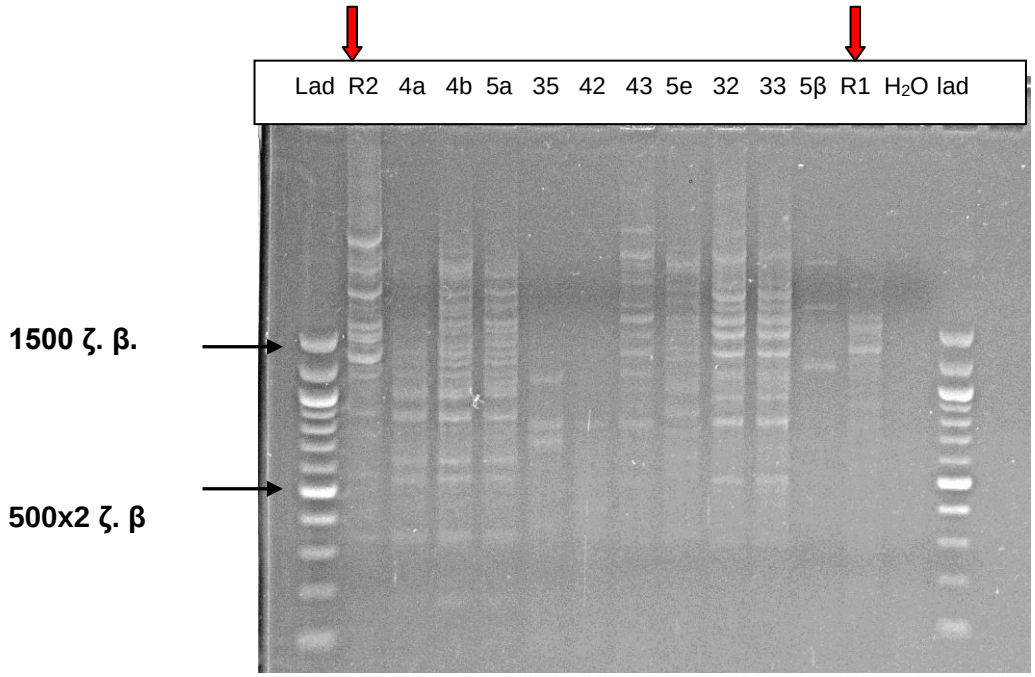
Στις Εικόνες 3.2 - 3.14 παρουσιάζονται τα πρότυπα των στελεχών που απομονώθηκαν, ταυτοποιήθηκαν και τα οποία στη συνέχεια τυποποιήθηκαν σε τύπους ERIC-PCR.



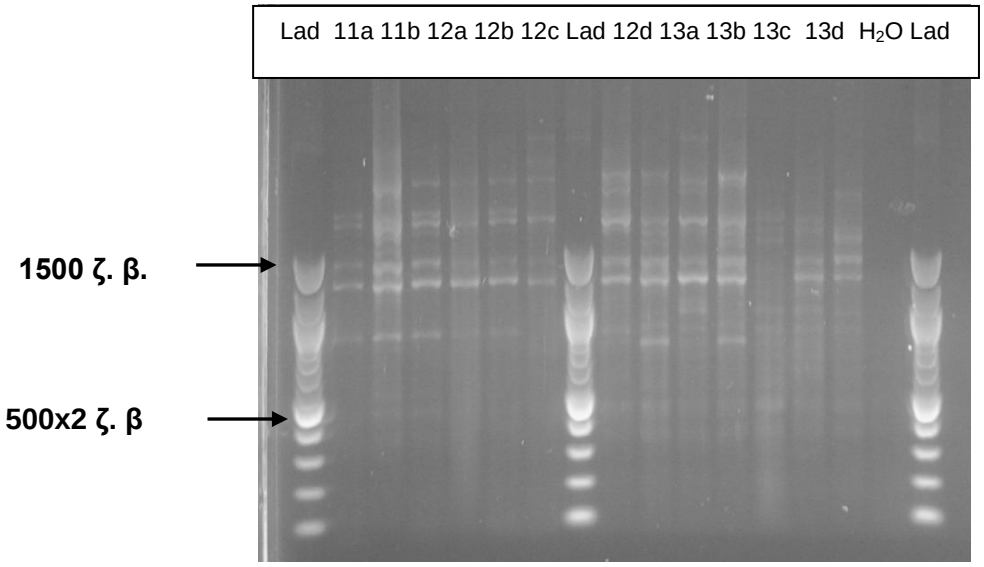
Εικόνα 3.2: Πρότυπα στελεχών *E. coli* βάσει της αντίδρασης ERIC-PCR. Στο ηλεκτροφόρημα παρουσιάζονται τα στελέχη με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: DNA Ladder 100 bp, 34, 36, 37, 38, 39, 41, 45, R4, R5, 9b, 28, R2, R3, 5c, DNA Ladder 100 bp (Τα R2-R5 είναι τα στελέχη αναφοράς)



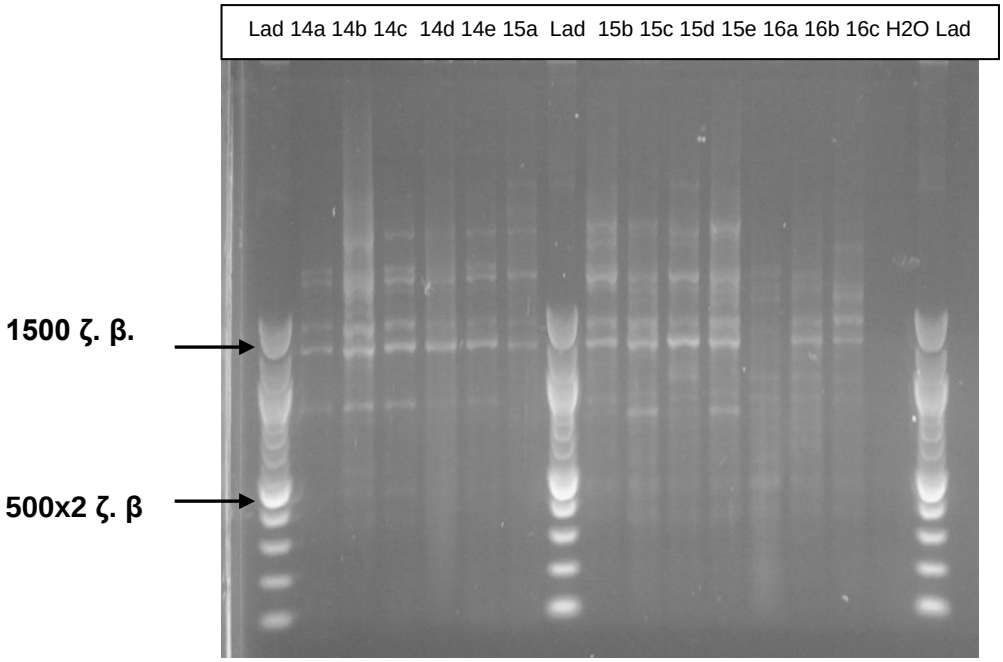
Εικόνα 3.3: Πρότυπα στελεχών *E. coli* βάσει της αντίδραση ERIC-PCR. Στο ηλεκτροφόρημα παρουσιάζονται τα στελέχη με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: Lad , R2, 1, 2,40,6 ,7, 30,Mb,Mc ,R1 ,H_2O, DNA Ladder 100 bp



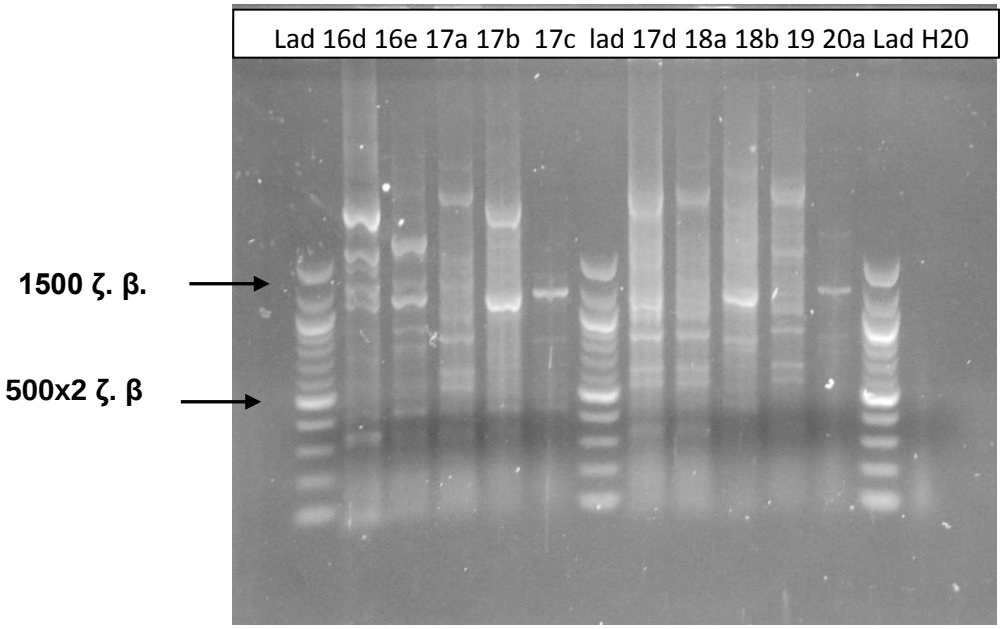
Εικόνα 3.4: Πρότυπα στελεχών *E. coli* βάσει της αντίδρασης ERIC-PCR. Στο ηλεκτροφόρημα παρουσιάζονται τα στελέχη με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: Lad, R2, 4a, 4b, 5a, 35, 42, 43, 5e, 32, 33, 5β, R1, H_2O, Lad



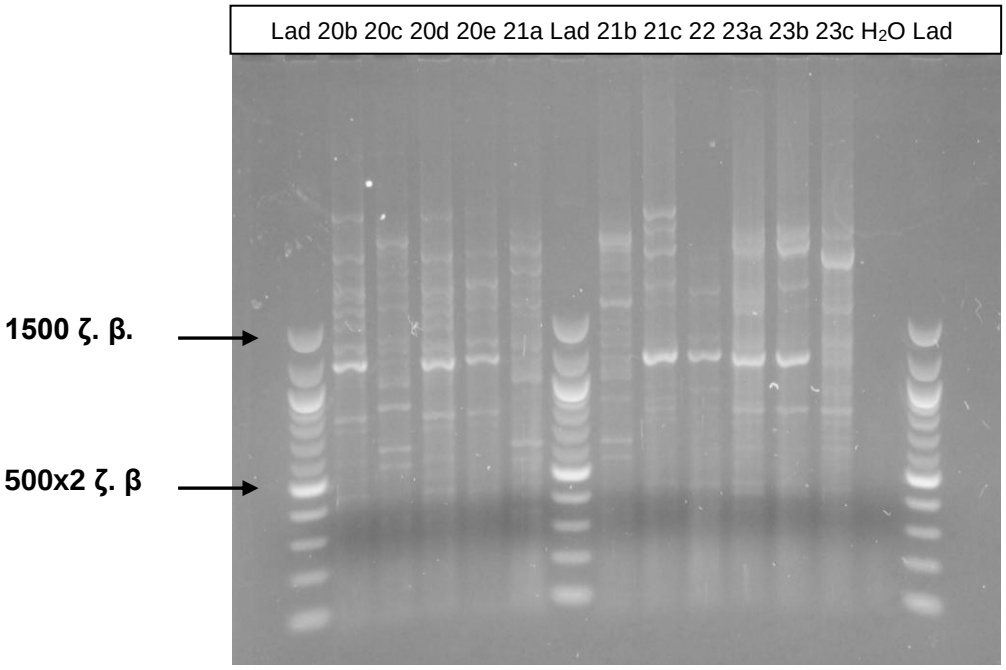
Εικόνα 3.5: Πρότυπα στελεχών *E. coli* βάσει της αντίδρασης ERIC-PCR. Στο ηλεκτροφόρημα παρουσιάζονται τα στελέχη με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: Lad, 11a, 11b, 12a, 12b, 12c, Lad, 12d, 13a, 13b, 13c, 13d, H_2O, Lad



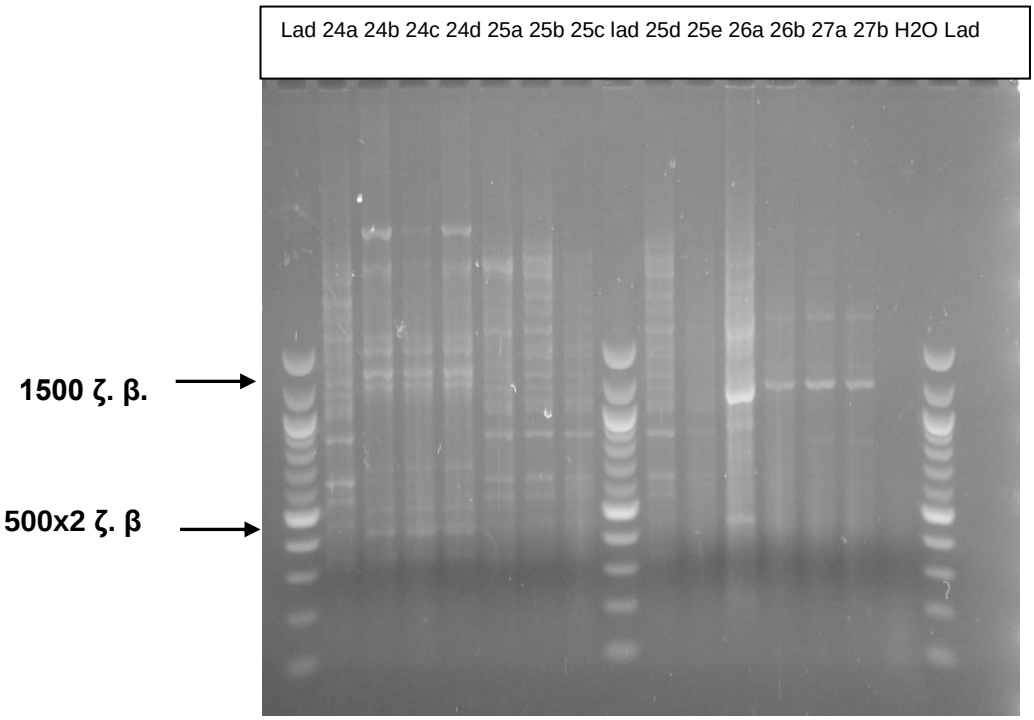
Εικόνα 3.6: Πρότυπα στελεχών *E. coli* βάσει της αντίδρασης ERIC-PCR. Στο ηλεκτροφόρημα παρουσιάζονται τα στελέχη με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: Lad, 14a, 14b, 14c, 14d, 14e, 15a, Lad, 15b, 15c, 15d, 15e, 16a, 16b, 16c, H_2O, Lad



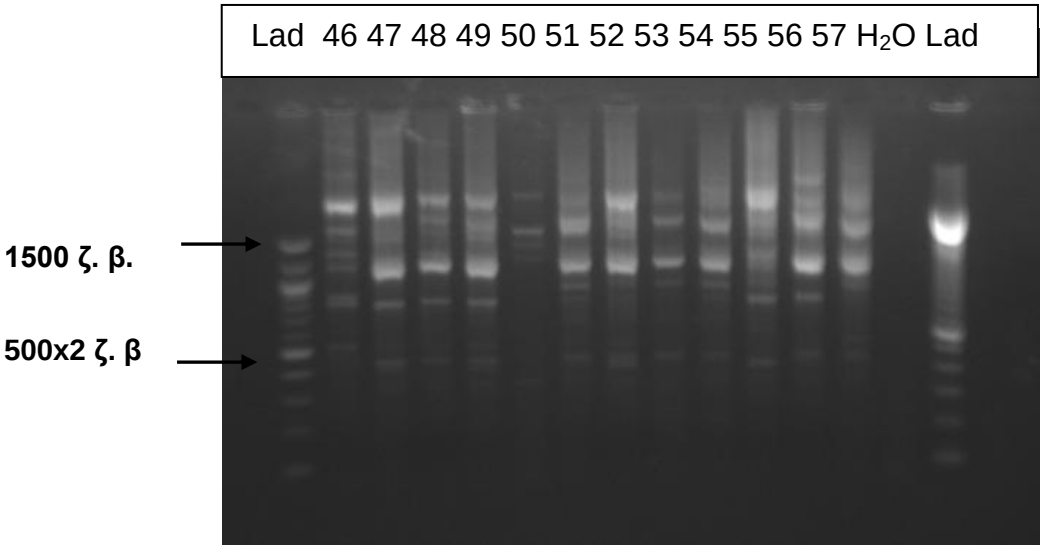
Εικόνα 3.7: Πρότυπα στελεχών *E. coli* βάσει της αντίδρασης ERIC-PCR. Στο ηλεκτροφόρημα παρουσιάζονται τα στελέχη με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: Lad, 16d, 16e, 17a, 17b, 17c, lad, 17d, 18a, 18b, 19, 20a, Lad, H_20



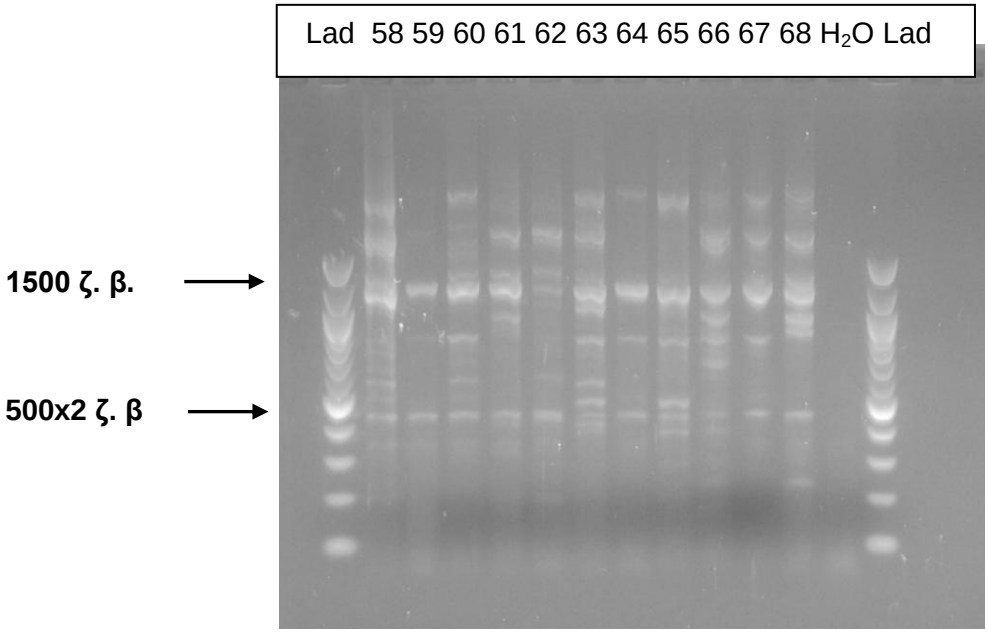
Εικόνα 3.8: Πρότυπα στελεχών *E. coli* βάσει της αντίδρασης ERIC-PCR. Στο ηλεκτροφόρημα παρουσιάζονται τα στελέχη με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: Lad, 20b, 20c, 20d, 20e, 21a, Lad, 21b, 21c, 22, 23a, 23b, 23c, H_2O, Lad



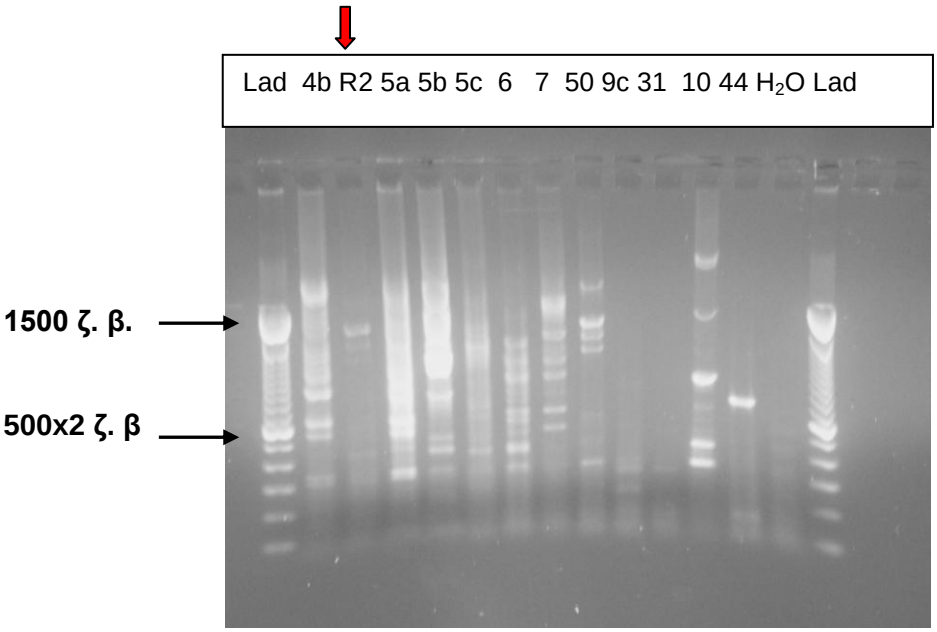
Εικόνα 3.9: Πρότυπα στελεχών *E. coli* βάσει της αντίδρασης ERIC-PCR. Στο ηλεκτροφόρημα παρουσιάζονται τα στελέχη με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: Lad, 24a, 24b, 24c, 24d, 25a, 25b, 25c, Lad, 25d, 25e, 26a, 26b, 27a, 27b, H_2O, Lad



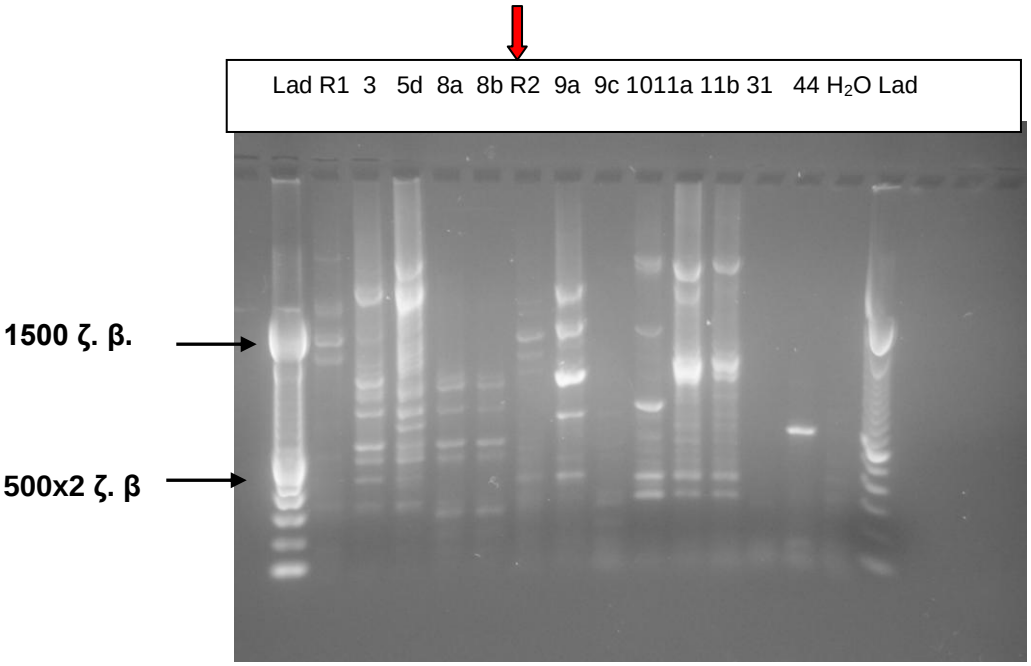
Εικόνα 3.10: Πρότυπα στελεχών *E. coli* βάσει της αντίδρασης ERIC-PCR. Στο ηλεκτροφόρημα παρουσιάζονται τα στελέχη με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: Lad, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, H_2O, Lad



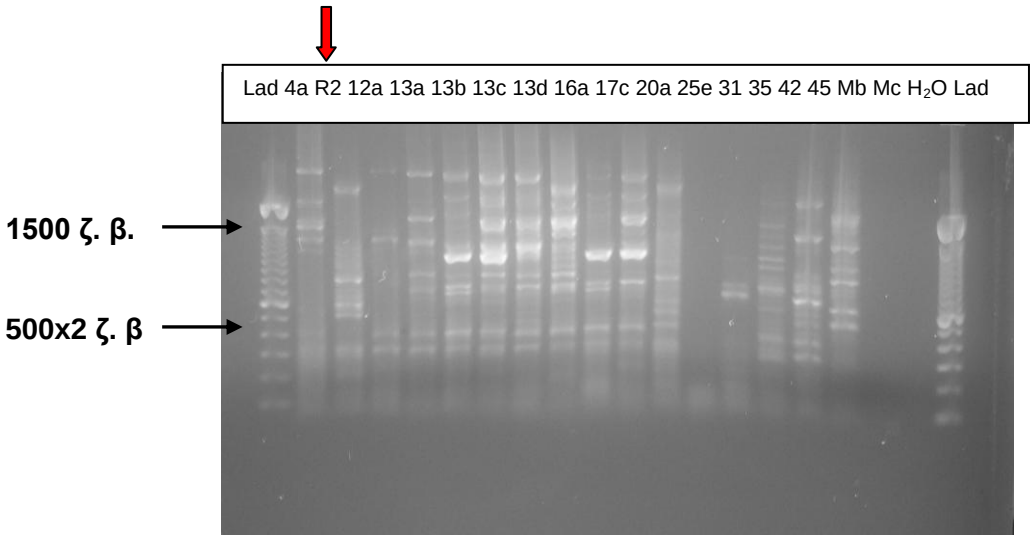
Εικόνα 3.11: Πρότυπα στελεχών *E. coli* βάσει της αντίδρασης ERIC-PCR. Στο ηλεκτροφόρημα παρουσιάζονται τα στελέχη με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: Lad, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, H_2O, Lad



Εικόνα 3.12: Πρότυπα στελεχών *E. coli* βάσει της αντίδρασης ERIC-PCR. Στο ηλεκτροφόρημα παρουσιάζονται τα στελέχη με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: Lad, 4b, R2, 5a, 5b, 5c, 6, 7, 50, 9c, 31, 10, 44, H_2O,Lad



Εικόνα 3.13: Πρότυπα στελεχών *E. coli* βάσει της αντίδρασης ERIC-PCR. Στο ηλεκτροφόρημα παρουσιάζονται τα στελέχη με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: Lad, R1, 3, 5d, 8a, 8b, R2, 9a, 9c,10,11a, 11b, 31, 44, H_2O, Lad



Εικόνα 3.14: Πρότυπα στελεχών *E. coli* βάσει της αντίδρασης ERIC-PCR. Στο ηλεκτροφόρημα παρουσιάζονται τα στελέχη με τη σειρά από αριστερά προς τα δεξιά: Lad, 4a, R2, 12a, 13a, 13b, 13c, 13d, 16a, 17c, 20a, 25e, 31, 35, 42, 45, Mb, Mc, H_2O, Lad

Από τις 117 απομονώσεις που μελετήθηκαν με την αντίδραση ERIC-PCR, οι 105 τυποποιούνται και ομαδοποιούνται σε ERIC-PCR τύπους, ενώ οι 12 (**5b, 5c, 9c, 16d, 26b, 27a, 27b, 31, 35,44, Mb, Mc),** είτε δεν έδωσαν καθόλου

ζώνη κατά την ηλεκτροφόρησή τους, είτε έδωσαν μία ή δύο με πολύ αχνό σήμα, το οποίο έχει παρατηρηθεί και σε άλλες εργασίες (Van Belkum και συνεργάτες, 2007)

Από τα στελέχη που δεν τυποποιήθηκαν με την αντίδραση ERIC-PCR, 9 προέρχονταν από δείγματα νερών από Δίκτυα Υδρευσης των νομών Ευρυτανίας (**5c**), Ζακύνθου (**9c**), Μεσσηνίας (**16d**), Νάξου (**26b**, **27a**, **27b**), Θεσσαλονίκης (**Mb**, **Mc**) και 3 από δείγματα νερών που προέρχονταν από την Κολυμβητική Δεξαμενή στην περιοχή του Αιγάλεω **(31)** και στην περιοχή του Χαιδαρίου **(35, 44).**

Από τα 105 αυτά στελέχη που τυποποιήθηκαν τελικά με την αντίδραση ERIC-PCR τα **14** είχαν απομονωθεί από δείγματα νερού από Κολυμβητικές Δεξαμενές, τα **68** από Δίκτυα Υδρευσης και τα υπόλοιπα **23** από τη Λίμνη του Μαραθώνα.

Από τα αποτελέσματα αυτά, υπολογίζεται ότι η τυποποιητικότητα της αντίδρασης ERIC-PCR είναι υψηλή και υπολογίστηκε σύμφωνα με τα κριτήρια τυποποιητικότητας (βλ. παράγραφο 1.5), T=90%. Το υπόλοιπο 10% αποτελούν τα 12 στελέχη που αναφέρθηκαν παραπάνω, τα οποία δεν κατάφεραν να τυποποιηθούν με την αντίδραση ERIC-PCR.

Η διακριτική ικανότητα της αντίδρασης ERIC-PCR υπολογίστηκε σύμφωνα με τον δείκτη ανομοιότητας ή ποικιλομορφίας (βλ. παράγραφο 1.5), D=0,93.

3.2.2 Φυλογενετική ανάλυση και καθορισμός μοριακών τύπων ERIC-PCR των στελεχών

Η ομαδοποίηση των 105 στελεχών έγινε με στατιστική ανάλυση με το πρόγραμμα PHYLIP 3.6.1, το οποίο ομαδοποιεί τα στελέχη βάση του αριθμού των ζωνών ηλεκτροφόρησης.

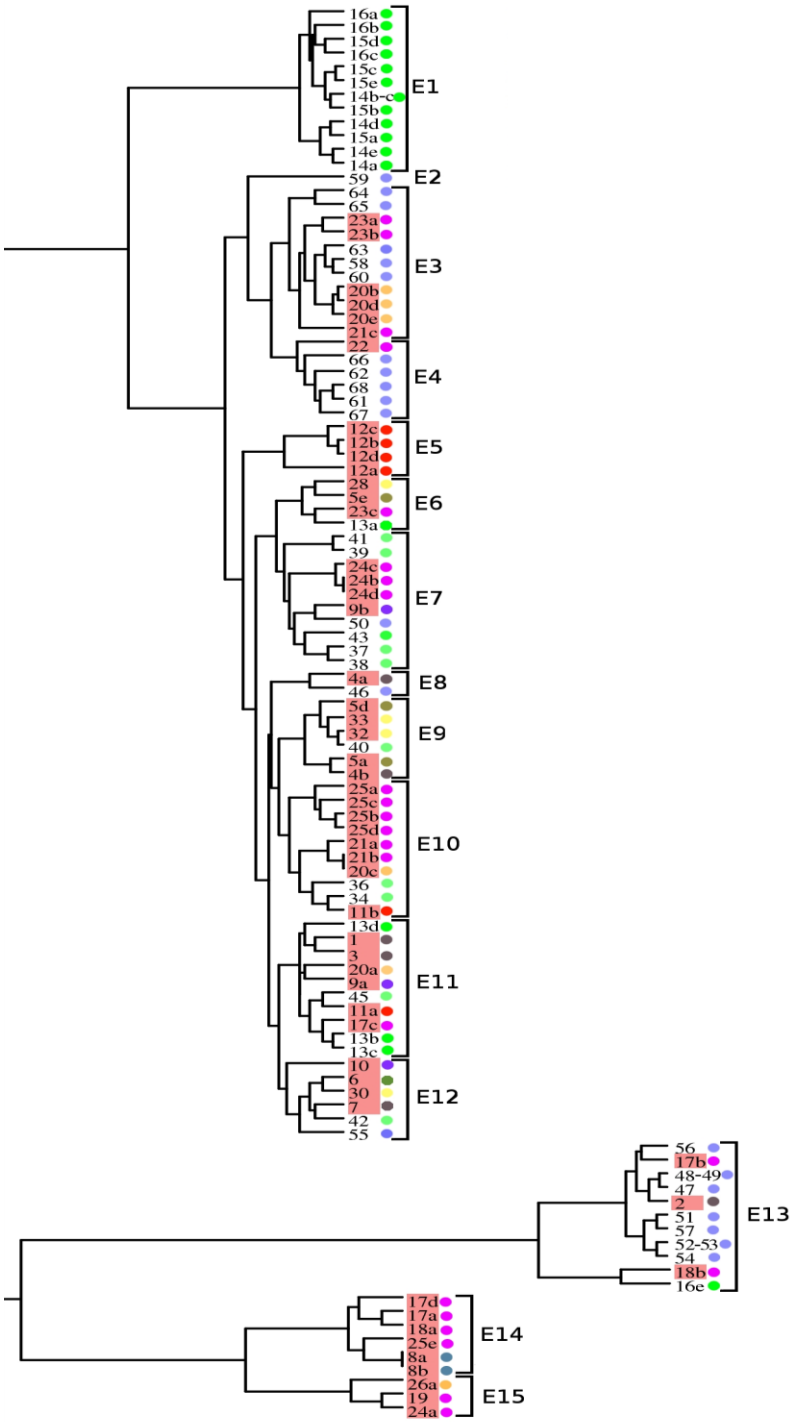
Από τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων, καθορίστηκαν 25 θέσεις ζωνών στις ηλεκτροφόρητικες εικόνες και καταρτίστηκε αρχείο που περιείχε όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν και την ύπαρξη ή έλλειψη της αντίστοιχης ζώνης,

μορφοποιημένο σύμφωνα με τις οδηγίες που συνοδεύουν το λογισμικό PHYLIP.

Όπως έχει αναφερθεί, η αντίδραση ERIC-PCR παρουσιάζει κάποιους περιορισμούς (βλ. παράγραφο 1.5). Λόγω των περιορισμών αλλά και της ποικιλομορφίας που εμφανίζεται σε γονοτυπικό επίπεδο μεταξύ των στελεχών, κρίθηκε απαραίτητη και η επιπλέον οπτική παρατήρηση (Van Belkum και συνεργάτες, 2007), των ηλεκτροφορητικών εικόνων για τη διεξαγωγή των τελικών αποτελεσμάτων. Κατά την οπτική παρατήρηση συναξιολογήθηκαν τα επιδημιολογικά δεδομένα (π.χ πηγή προέλευσης των στελεχών) αλλά και δημοσιευμένα κριτήρια από παλιότερες εργασίες (Van Belkum και συνεργάτες, 2007). Κατά την ανάλυση, στελέχη που έχουν έστω και 2 διαφορετικές ζώνες ηλεκτροφόρησης θεωρούνται διαφορετικά στελέχη. Το φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε από την ανάλυση φαίνεται στην Εικόνα 3.15.

Σύμφωνα με αυτό τα 105 στελέχη ομαδοποιήθηκαν σε 15 ERIC-PCR τύπους. Με χρώματα έχουν επισημανθεί τα στελέχη σύμφωνα με τις 2 παραμέτρους οι οποίες μελετήθηκαν, την ύπαρξη ή μη χλωρίου και την γεωγραφική περιοχή από την οποία απομονώθηκαν. Συγκεκριμένα, με ροζ χρώμα είναι σκιασμένα τα στελέχη που έχουν απομονωθεί από χλωριωμένα δείγματα νερού. Επίσης σε κάθε μία από τις 12 γεωγραφικές περιοχές, αντιστοιχεί ένα διαφορετικό χρώμα για να φαίνεται η προέλευση του κάθε στελέχους στους διάφορους ERIC-PCR τύπους.

Στον πίνακα 3.2 παρουσιάζονται οι 15 ERIC-PCR τύποι, που προέκυψαν από το φυλογενετικό δέντρο και ο αριθμός των στελεχών *E. coli* που αντιστοιχεί σε κάθε ένα από αυτούς. Επίσης φαίνεται η προέλευση του κάθε στελέχους ανάλογα με το οικοσύστημα από το οποίο έχει απομονωθεί.



Εικόνα 3.15: Φυλογενετικό δέντρο των 105 στελεχών που τυποποιήθηκαν με την αντίδραση ERIC-PCR, και την ανάλυση των ηλεκτροφορητικών εικόνων με το πρόγραμμα PHYLIP 3.6.1. Με τη ροζ σκίαση επισημαίνονται τα στελέχη που έχουν απομονωθεί από χλωριωμένα νερά. Τα χρώματα δίπλα από τα στελέχη αντιπροσωπεύουν τις 12 γεωγραφικές περιοχές: Δ.Υ Τρικάλων:πράσινο, Δ.Υ Ευρυτανίας: χακί, Δ.Υ Εύβοιας:φούξια, Δ.Υ Ηλείας: κόκκινο, Δ.Υ Μεσσηνίας:λαχανί, Δ.Υ Λακωνίας: γαλάζιο, Δ.Υ Ιθάκης: γκρι, Δ.Υ Ζακύνθου: μωβ, Δ.Υ Νάξου: σομον, Κ.Δ Αιγάλεω: κίτρινο, Κ.Δ Χαιδαρίου: πράσινο ανοιχτό, Λ. Μαραθώνα: λιλά

Πίνακας 3.2: Προφίλ ζωνών βακτηρίων *E. coli* βάσει της αντίδρασης ERIC-PCR που καθόρισε τύπους ERIC-PCR (E1-E15)

Κ.Δ: Κολυμβητικές Δεξαμενές, ΔΥ: Δίκτυο Ύδρευσης, Λίμνη: Λίμνη Μαραθώνα

ERIC-PCR τύποι	**Απομονωθέντα στελέχη από Κ.Δ (% επι του συνόλου)**	**Απομονωθέντα στελέχη από Δ.Υ (% επι του συνόλου)**	**Απομονωθέντα στελέχη από Λ. (% επι του συνόλου)**
ERIC 1		13(100 %)	
ERIC 2			1(100 %)
ERIC 3		6(55%)	5(45%)
ERIC 4		1(17 %)	5(83 %)
ERIC 5		4(100 %)	
ERIC 6	1(25 %)	3(75 %)	
ERIC 7	5(50 %)	4(40 %)	1(10 %)
ERIC 8		1(50 %)	1(50 %)
ERIC 9	3(50 %)	3(50 %)	
ERIC 10	2(20 %)	8(80 %)	
ERIC 11	1(10 %)	9(90 %)	
ERIC 12	2(33 %)	3(50 %)	1(17 %)
ERIC 13		4(30 %)	9(70 %)
ERIC 14		6(100 %)	
ERIC 15		3(100 %)	
Σύνολο	**14 (13%)**	**68 (65 %)**	**23 (22%)**

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα, το 65% των στελεχών που ομαδοποιήθηκαν στους 15 ERIC-PCR τύπους είχαν απομονωθεί από δείγματα Δικτύου Ύδρευσης, το 22% από Κολυμβητικές Δεξαμενές και το 13% από τη Λίμνη του Μαραθώνα.

Από τα αρχικά 17 απομονωθέντα στελέχη από **Κολυμβητικές Δεξαμενές**, μόνο τα 14 τυποποιήθηκαν με την αντίδραση ERIC-PCR. Τα στελέχη αυτά έδωσαν 6 διαφορετικά Eric προφίλ ζωνών: τα E6, E7, E9, E10, E11, E12. Το υψηλότερο ποσοστό σε στελέχη προυσίασαν τα προφίλ E7 και E9 (50%). Συνολικά τα 14 αυτά στελέχη αποτελούσαν το 13% του συνολικού αριθμού στελεχών που έχουν τυποποιηθεί με την αντίδραση ERIC-PCR.

Από τα αρχικά 77 απομονωθέντα στελέχη από **Δίκτυα Ύδρευσης**, μόνο τα 68 τυποποιήθηκαν με την αντίδραση ERIC-PCR και παρουσίασαν όλα τα προφίλ ERIC, εκτός από εκείνο του E2. Τα στελέχη με προφίλ E1, E5, E14, E14 προέρχονται αποκλειστικά από Δίκτυα Ύδρευσης. Τα 68 αυτά στελέχη από τα Δίκτυα Ύδρευσης αποτελούσαν το 65% του συνολικού αριθμού στελεχών που έχουν τυποποιηθεί με την αντίδραση ERIC-PCR.

Από **τη Λίμνη του Μαραθώνα** και τα 23 απομονωθέντα στελέχη τυποποιήθηκαν με την αντίδραση ERIC-PCR. Τα στελέχη αυτά έδωσαν 7 διαφορετικά ERIC προφίλ ζωνών: τα E2, E3, E4, E7, E8, E12 και E13. Τα στελέχη με προφίλ E4 προέρχονται όλα από τη Λίμνη Μαραθώνα ενώ τα υπόλοιπα είχαν δώσει ίδιο προφίλ ζωνών με άλλα στελέχη διαφορετικής προέλευσης (Κολυμβητικών Δεξαμενών και Δικτύου Ύδρευσης).

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 3.2 ίδιο ERIC προφίλ μπορεί να έχουν στελέχη από διαφορετική πηγή προέλευσης. Εξαίρεση αποτελεί μόνο ένα στέλεχος με μοναδικό προφίλ E2 που έχει προέλθει από την Λίμνη του Μαραθώνα.

3.3.3 Ομαδοποιήση των ERIC προφίλ ζωνών που παρουσιάζονται στο φυλογεννετικό δέντρο ανάλογα με τη γεωγραφική κατανομή.

Έγινε ομαδοποίηση των στελεχών συμφωνα με τη γεωραφική προέλευση των δειγμάτων από τα οποία απομονώθηκαν

Πίνακας 3.3: Γεωγραφική Κατανομή στελεχών στα 15 προφίλ ζωνών βάσει της αντίδρασης ERIC-PCR

ERIC-PCR ΤΥΠΟΙ	Τρίκαλα	Ευρυ-τανία	Εύβοια	Ηλεία	Μεσ-σηνία	Λακωνία	Ιθάκη	Ζάκυνθος	Νάξος	Αιγάλεω	Χαιδαρι	Μαρα-θώνας
Eric 1					13							
Eric 2												1
Eric 3			3						3			5
Eric 4			1									5
Eric 5				4								
Eric 6		1	1		1					1		
Eric 7			3					1			5	1
Eric 8							1					1
Eric 9		2					1			2	1	
Eric 10			6	1					1		2	
Eric 11			1	1	3		2	1	1		1	
Eric 12	1						1	1		1	1	1
Eric 13			2		1		1					9
Eric 14			4			2						
Eric 15			2						1			
Σύνολο	1	3	23	6	18	2	6	3	6	4	10	23

Παρατηρείται οτι στελέχη με ίδια ERIC προφίλ ζωνών (E3, E4, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15) προέρχονται συχνά από πολυ διαφορετικές γεωγραφικές περιοχες (Πίνακας 3.3).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα στελέχη με το E11 προφίλ, τα οποία προέρχονται από 7 διαφορετικές περιοχές (Εύβοια, Ηλεία, Μεσσηνία, Ιθάκη, Ζάκυνθος, Νάξος, Χαιδάρι)

Υπάρχουν όμως και 3 ERIC–PCR τύποι (E1, E2 και ο E5), οι οποίοι αποτελούνται από στελέχη που έχουν απομονωθει από μία μόνο γεωγραφική περιοχή. Π.χ ο E1 αποτελείται μόνο με στελέχη που προέρχονται από τη Μεσσηνία.

Από τον Πίνακα 3.3 φαίνεται ότι κάποιοι ERIC-PCR τύποι είναι εξαπλωμένοι σε πολλές περιοχές του Ελλαδικού Οικοσυστήματος.

3.3.4 Ομαδοποιήση των ERIC προφίλ ζωνών που παρουσιάζονται στο φυλογεννετικό δέντρο ανάλογα με την έκθεσή τους στο χλώριο

Στο φυλογεννετικό δέντρο (Εικόνα 3.15), με ροζ χώμα είναι σκιασμένα τα στελέχη που έχουν προέλθει από χλωριωμένα νερά Δικτύου Ύδρευσης και Κολυμβητικών Δεξαμενών.

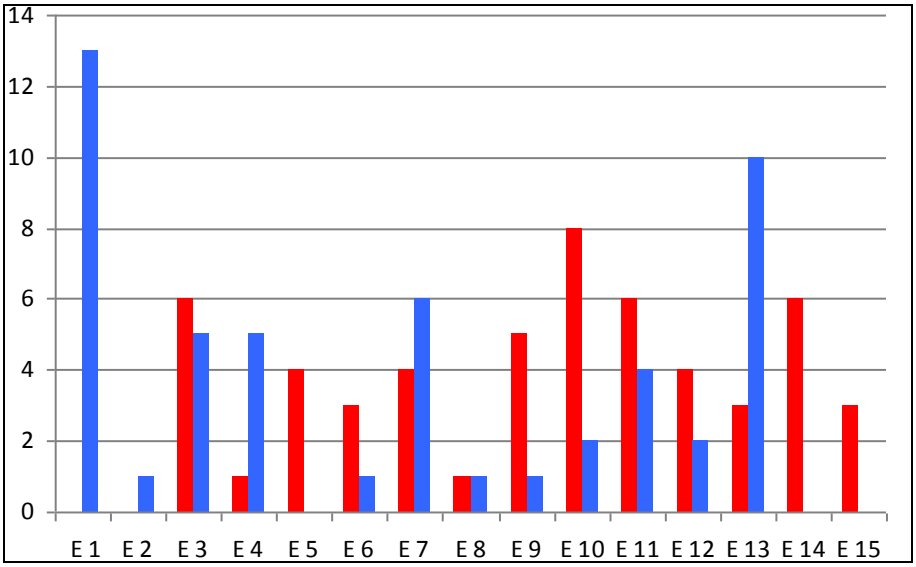
Από τον Πίνακα 3.4, φαίνεται μία ομαδοποιήση των στελεχών ανάλογα με την προέλευση των δειγμάτων από χλωριωμένα ή μη χλωριωμένα νερά.

Τα στελέχη με προφίλ ζωνών E5, E14 και E15 έχουν προέλθει μόνο από χλωριωμένα νερά. Αντίθετα, τα στελέχη που έχουν προφίλ E1 και E2 έχουν προέλθει από μη χλωριωμένα νερά. Τα στελέχη που έχουν δώσει τα υπόλοιπα ERIC προφίλ (E3, E4, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12 και E13) έχουν προέλθει από χλωριωνένα και μη νερά σε διάφορα ποσοστά περιεκτικότητας σε χλώριο.

Πίνακας 3.4: Διαχωρισμός ERIC προφίλ ζωνών σύμφωνα με την προέλευση των επιμέρους στελεχών από χλωριωμένα ή μη δείγματα νερών.

ERIC-PCR ΤΥΠΟΙ	**Αριθμός στελεχών CL (+)**			**Αριθμός στελεχών CL (-)**			**ΣΥΝΟΛΟ**
	Δ.Υ	**Κ.Δ**	**Λ.Μ**	**Δ.Υ**	**Κ.Δ**	**Λ.Μ**	
Eric 1	-	-	-	13			**13**
Eric 2	-	-	-			1	**1**
Eric 3	6					5	**11**
Eric 4	1					5	**6**
Eric 5	4						**4**
Eric 6	2	1		1			**4**
Eric 7	4				5	1	**10**
Eric 8	1					1	**2**
Eric 9	3	2		1			**6**
Eric 10	8				2		**10**
Eric 11	6			3	1		**10**
Eric 12	3	1		1	1		**6**
Eric 13	3			1		9	**13**
Eric 14	6			-	-	-	**6**
Eric 15	3			-	-	-	**3**
Σύνολο	**54**			**51**			**105**

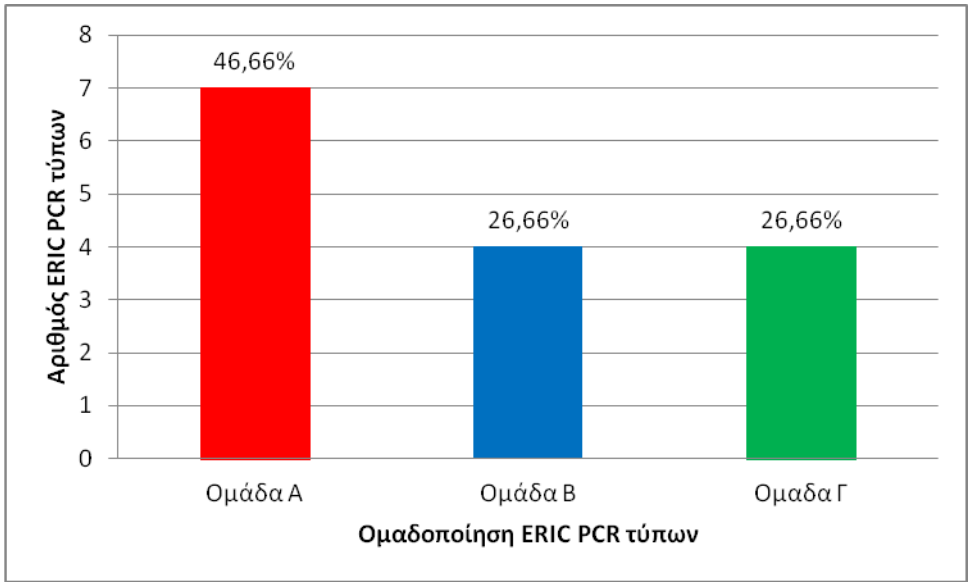
Στην Εικόνα 3.16 φαίνεται η προέλευση των στελεχών (χλωριωμένα ή η μη νερά) και η ομαδοποίησή τους σε όλους τους ERIC PCR τύπους.



Εικόνα 3.16: Ομαδοποίηση ERIC-PCR τύπων ανάλογα με την προέλευση των στελεχών από χλωριωμένα ή μη, δείγματα. CL (+) CL (-)

Μία άλλη ομαδοποίηση των ERIC PCR τύπων μπορεί να γίνει αν στους τύπους που παρουσιάζονται σε στελέχη που έχουν απομονωθεί αποκλειστικά από ένα τύπο δείγματος (χλωριωμένα νερά ή μη) συμπεριληφθούν και οι τύποι που παρουσιάζονται σε στελέχη που στην πλειοψηφία τους έχουν απομονωθεί από ένα τύπο δείγματος.

Συνεπώς, οι 15 ERIC PCR τύποι μπορούν να ομαδοποιηθούν σε 3 ομάδες. **Στη ομάδα Α** ανήκουν οι Ε5, Ε6, Ε9, Ε10, Ε12, Ε14 και Ε15 και παρουσιάζονται σε στελέχη που έχουν προέλθει αποκλειστικά ή στην πλειοψηφία τους μόνο από χλωριωμένα νερά. Στην **ομάδα Β** ανήκουν οι Ε1, Ε2, Ε4 και Ε13 και παρουσιάζονται σε στελέχη που έχουν προέλθει αποκλειστικά ή στην πλειοψηφία τους μόνο από μη χλωριωμένα νερά. Στην **ομάδα Γ** ανήκουν οι Ε3, Ε7, Ε8, Ε11 και παρουσιάζονται σε στελέχη που έχουν έχουν προέλθει από χλωριωμένα και μη νερά σε περίπου ίδια αναλογία (Εικόνα 3.17).



Εικόνα 3.17: Ομαδοποιήση ERIC-PCR τύπων σε 3 ομάδες ανάλογα με την προέλευση των στελεχών από χλωριωμένα ή μη νερά ■ Ομάδα Α: ERIC PCR τύποι αποτελούμενοι από στελέχη που έχουν προέλθει αποκλειστικά ή στην πλειοψηφία τους μόνο από χλωριωμένα νερά ■ Ομάδα Β: ERIC PCR τύποι αποτελούμενοι από στελέχη που έχουν προέλθει αποκλειστικά ή στην πλειοψηφία τους μόνο από μη χλωριωμένα νερά ■ Ομαδα Γ : ERIC PCR τύποι αποτελούμενοι από στελέχη που έχουν έχουν προέλθει από χλωριωμένα και μη νερά σε περίπου ίδια αναλογία

Συγκεκριμένα το προφίλ Ε14 ανήκει στην ομάδα Α και προβάλει στελέχη τα οποία προέρχονται όλα από χλωριωμένα νερά, ενώ το Ε1, το οποίο ανήκει στην ομάδα Β προβάλει στελέχη αποκλειστικά από μη χλωριωμένα νερά. Το προφίλ Ε3, το οποίο ανήκει στην ομάδα Γ, προβάλει 6 στελέχη από χλωριωμένα νερά και 5 από μη χλωριωμένα (Πίνακας 3.4).

Συσχέτιση ERIC-PCR προφίλ ζωνών ανάλογα με τη γεωγραφική τους προέλευση και την έκθεσή τους στο χλώριο

Τα στελέχη της ομάδας Α και Β δηλαδή αυτά που προέρχονται αποκλειστικά ή στην πλειοψηφία τους από ένα τύπο δείγματος (χλωριωμένο ή μη) και έχουν το ίδιο ERIC PCR προφίλ παρατηρείται ότι δεν είναι όλα από την ίδια γεωγραφική περιοχή αλλά από διαφορετικές από όλη την Ελλάδα (Πίνακας 3.5, 3.6).

Πίνακας 3.5: Ομάδα **Α**: ERIC PCR τύποι που παρουσιάζονται σε στελέχη που έχουν απομονωθεί αποκλειστικά ή στην πλειοψηφία τους από χλωριωμένα δείγματα και γεωγραφική κατανομή αυτών.

Ομάδα Α **ERIC-PCR τύποι (CI+)**	**Γεωγραφική Κατανομή**					
Eric 5	Ηλεία					
Eric 6	Ευρυτανία	Εύβοια	Μεσσηνία	Αιγάλεω		
Eric 9	Ευρυτανία	Ιθάκη	Αιγάλεω	Χαϊδάρι		
Eric 10	Εύβοια	Ηλεία	Νάξος	Χαϊδάρι		
Eric 12	Τρίκαλα	Ιθάκη	Ζάκυνθος	Αιγάλεω	Χαϊδάρι	Μαραθώνας
Eric 14	Εύβοια	Λακωνία				
Eric 15	Εύβοια	Νάξος				

Μόνο ένα ERIC PCR προφίλ παρουσιάζεται σε στελέχη από χλωριωμένα νερά που έχουν απομονωθεί όλα από την ίδια γεωγραφική περιοχή. Παράδειγμα αποτελεί το Ε5 προφίλ που και τα 4 στελέχη έχουν απομονωθεί από το Δ.Υ του νομού Ηλείας.

Όλοι οι υπόλοιποι ERIC PCR τύποι παρουσιάζονται σε στελέχη από πολλές και διαφορετικές περιοχές. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα 6 στελέχη με προφίλ Ε12 που έχουν απομονωθεί από 6 διαφορετικές περιοχές (Δ.Υ Τρικάλων, Ιθάκης και Ζακύνθου, Κ.Δ Αιγάλεω και Χαιδαρίου και Λίμνη Μαραθώνα).

Πίνακας 3.6: Ομάδα **Β**: ERIC PCR τύποι που παρουσιάζονται σε στελέχη που έχουν απομονωθεί αποκλειστικά ή στην πλειοψηφία τους από χλωριωμένα δείγματα και γεωγραφική κατανομή αυτών.

Ομάδα Β ERIC-PCR τύποι (Cl-)	**Γεωγραφική Κατανομή**			
Eric 1	Μεσσηνία			
Eric 2	Μαραθώνας			
Eric 4	Εύβοια	Μαραθώνας		
Eric 13	Εύβοια	Μεσσηνία	Ιθάκη	Μαραθώνας

Δύο από τα 4 ERIC προφίλ (Ε1, Ε2) παρουσιάζονται σε στελέχη που έχουν απομονωθεί από μη χλωριωμένα νερά από την ίδια γεωγραφική περιοχή. Π.χ τα στελέχη (13) με Ε1 προφίλ έχουν απομονωθεί αποκλειστικά από το Δ.Υ της Μεσσηνίας. Τα υπόλοιπα 2 ERIC προφίλ (Ε4,Ε13) παρουσιάζονται σε στελέχη από διαφορετικές περιοχές. Π.χ τα στελεχη με Ε13 προφίλ προέρχονται από 4 περιοχές (Εύβοια, Μεσσηνία, Ιθάκη και Μαραθώνα).

Πίνακας 3.6: Ομάδα **Β**: ERIC PCR τύποι που παρουσιάζονται σε στελέχη που έχουν έχουν προέλθει από χλωριωμένα και μη νερά σε περίπου ίδια αναλογία και γεωγραφική κατανομή αυτών.

Ομάδα Γ ERIC-PCR τύποι (Cl+/Cl-)	**Γεωγραφική Κατανομή**						
Eric 3	Εύβοια	Νάξος	Μαραθώνας				
Eric 7	Εύβοια	Ζάκυνθος	Χαιδάρι	Μαραθώνας			
Eric 8	Ιθάκη	Μαραθώνας					
Eric 11	Εύβοια	Ηλία	Μεσσηνία	Ιθάκη	Ζάκυνθος	Νάξος	Χαιδάρι

Όλοι οι ERIC PCR τύποι αποτελούνται και από στελέχη από χλωριωμένα και από μη χλωριωμένα νερά και από περισσότερες από μία περιοχές. Π.χ ο Ε8 τύπος παρουσιάζεται σε 2 στελέχη, εκ των οποίων το ένα προέρχεται από χλωριωμένα νερά από το Δ.Υ Ιθάκης και το άλλο από τη Λίμνη του Μαραθώνα.

Ο Ε11 τύπος παρουσιάζεται σε 10 στελέχη. Τα 6 προέρχονται Δ. Υ Εύβοιας,Ηλίας. Ιθάκης, Ζακύνθου και Νάξου (χλωριωμένα δείγματα) και τα υπόλοιπα 4 από το Δ.Υ της Μεσσηνίας και από την Κ.Δ Χαιδαρίου (μη χλωριωμένα δείγματα).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το βακτήριο *E. coli* αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του αερόβιου φυσιολογικού μικροβιακού πληθυσμού του ανθρώπου και των ζώων. Βρίσκεται σε αφθονία στη φύση σε ποικίλα περιβάλλοντα όπως χώμα, νερό, λύματα αλλά και σε φυσικές πηγές νερού. Η παρουσία του στα διάφορα υδάτινα περιβάλλοντα αποτελεί δείκτη κοπρανώδους ρύπανσης υποδεικνύοντας την πιθανότητα μόλυνσης του οικοσυστήματος με παθογόνους μικροοργανισμούς (Casarez και συνεργάτες, 2007)

Οι αυξημένες περιπτώσεις σοβαρών λοιμώξεων, κυρίως εντερικές, που οφείλονται σε ορισμένα παθογόνα στελέχη του *E. coli*, αλλά και λοιμώξεων των ουροφόρων οδών, βακτηριαιμίας, μηνιγγίτιδας κ.λ.π. αυξάνουν την ανάγκη για την ανάπτυξη γρήγορων και αξιόπιστων εργαστηριακών μεθόδων απομόνωσης, και φαινοτυπικής και μοριακής κλινικών και περιβαλλοντικών στελεχών του.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της ποικιλότητας βακτηρίων *E. coli* από χλωριωμένα και μη δείγματα νερού προερχόμενα από Κολυμβητικές Δεξαμενές, από Δίκτυα Ύδρευσης από όλη την Ελλάδα και από τη Λίμνη του Μαραθώνα, η οποία είναι η βασική πηγή ύδρευσης του μισού πληθυσμού της Ελλάδας. Η επιλογή των 3 αυτών οικοσυστημάτων έγινε βάσει της συγκέντρωσης του χλωρίου στα δείγματα νερού. Οι περιοχές δειγματοληψίας εκτός από την παράμετρο των κλιματολογικών και φυσικοχημικών συνθηκών διαφέρουν κυρίως ως προς το % του περιεχόμενου χλωρίου

Η απομόνωση των αποικιών *E. coli* έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο ISO/ EN 9308-1: 2000. Για την αρχική καλλιέργεια του βακτηρίου χρησιμοποιήθηκε ένα ισοδύναμο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα (Mavridou και συνεργάτες, 2010). Από τις 143, οι 117 θεωρήθηκαν *E. coli,* με βάση τη βιοχημική τους ταυτοποίηση (ISO/ EN 9308-1: 2000). Οι απομονώσεις που ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς ως *Escherichia coli* υπόκεινται στη συνέχεια σε διαδικασία μοριακής τυποποίησης. Χρησιμοποιήθηκε η Μοριακή μέθοδος ERIC-PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence polymerase chain

reaction), η οποία είναι μια προσιτή μέθοδος με μεγάλη διακριτική ικανότητα (Lyautey και συνεργάτες, 2010). Στη συνέχεια ακολούθησε μελέτη της φυλογενετικής συγγένειας των βακτηρίων με το λογισμικό πρόγραμμα Phylip 3.6.1.

Στη διεθνή αλλά και στην ελληνική βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές παρόμοιας καταγραφής μοριακών τύπων στελεχών *E. coli*, που έχουν απομονωθεί από 3 διαφορετικά οικοσυστήματα διαφορετικής συγκέντρωσης χλωρίου αλλά και διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης.

Με την παρούσα εργασία εγινε μία προσπάθεια μελέτης της διασποράς και μετάδοσης του βακτηρίου *E. coli* που θα βοηθήσει στη μελέτη αντίστοιχων οδών μετάδοσης και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών με συνέπεια την προάσπιση της Δημόσιας Υγείας. Επειδή το *E. coli* είναι κοπρανώδης μικροοργανισμος, η παρουσία του σε υδάτινα οικοσυστήματα συσχετίζεται με την παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών που προκαλούν υδατογενείς λοιμώξεις κι επιδημίες (*Salmonella, Shigella* κλπ). Η μελέτη της διασποράς στελεχών *E. coli* σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές πιθανότατα υποδεικνύει παρόμοιες οδούς διασποράς των παθογόνων στελεχών. Οι υδατογενείς λοιμώξεις αποτελούν σημαντικό θέμα Δημόσιας Υγειας με ευρύτατες επιπτώσεις εφόσον όλος ο πληθυσμός εκτίθεται και κινδυνεύει να προσβληθεί.

Επίσης μελετήθηκαν στελέχη τα οποία, είτε έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα στο χλώριο, είτε έχουν υποστεί αλλοιώσεις που πιθανόν δυσκολεύουν την ανίχνευσή τους με τις κλασσικές καλλιεργητικές τεχνικές που χρησιμοποιούν τα εργαστήρια ποιοτικού ελέγχου των νερών. Η παρουσία συσχετιζόμενων φυλογενετικά στελεχών σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές θα μπορούσε να ενισχύσει την υπόθεση αλλοιώσεων που προκαλούνται από περιβαλλοντικές συνθήκες όπως το χλώριο.

4.1 Ταυτοποίηση στελεχών *E. coli* βάση φαινοτυπικών χαρακτηριστικών.

Η ταυτοποίηση των απομονωθέντων αποικιών (143), από τα 101 δείγματα νερού, πραγματοποιήθηκε βάση ISO 9308/1:2000. Η προτεινόμενη μέθοδος φαίνεται να ταυτοποιεί ικανοποιητικά την πλεοψηφία των περιβαλλοντικών στελεχών σε ποσοστό 82% (117/143).

Τα αποτελέσματα της εργασίας είναι σύμφωνα με την πρόσφατη βιβλιογραφία καθώς αρκετοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με την αξιολόγηση του συγκεκριμένου ISO.

Συγκεκριμένα οι Pitkamen και συνεργάτες, μελετώντας 110 δείγματα νερού προερχόμενα από υπόγεια νερά και νερά κολύμβησης, απέδειξαν ότι η χρήση εναλλακτικών θρεπτικών υποστρωμάτων, όπως τα χρωμογόνα θρεπτικά υποστρώματα, απομονώνουν αποικίες *E. coli* σε πολύ καλό ποσοστό. (Pitkamen, 2007).

Παρόμοια εργασία πραγματοποιήθηκε το 2010 από Mavridou και συνεργάτες, στην οποία συμμετείχαν 10 εργαστήρια από όλη την Ελλάδα, αναλύοντας 462 δείγματα χλωριωμένα και μη. Σύμφωνα με τη στατιστική επεξεργασία της εργασίας, φαίνεται ότι τα χρωμογόνα θρεπτικά υποστρώματα και συγκεκριμένα το MLSA, δίνει αποτελέσματα, τόσο αξιόπιστα όσο και και το θρεπτικό υπόστρωμα που προτείνει το ISO 9308/1:2000.

4.2 Τυποποίηση περιβαλλοντικών στελεχών *E. coli* με ERIC-PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence polymerase chain reaction)

Η μοριακή μέθοδος που επιλέχθηκε και εφαρμόστηκε για τη διάκριση προέλευσης της *E. coli* στελεχών ήταν η αντίδραση ERIC-PCR, με σκοπό να εκτιμηθεί η επίδραση της συγκέντρωσης του χλωρίου στην ποικιλότητα των απομονωθέντων στελεχών.

Είναι μια γρήγορη, εύκολη και σχετικά φτηνή μέθοδος. Χρησιμοποιεί οποιονδήποτε συνδυασμό εκκινητών, και θεωρείται μη ειδική μέθοδος. Χρησιμοποιούνται τυχαίοι εκκινητές (random primers), οι οποίοι έχουν ως στόχο τις αλληλουχίες που δεν είναι επαναλαμβανόμενες επάνω στο χρωμόσωμα και για αυτό θεωρείται μη ειδική μέθοδος Η μέθοδος έχει ένα σημαντικό μειονέκτημα, τη χαμηλή επαναληψιμότητα καθώς, λόγω των τυχαίων εκκινητών, δίνεται διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο κάθε φορά που πραγματοποιείται η αντίδραση PCR ακόμη κι αν πρόκειται για τα ίδια στελέχη (Meacham και συνεργάτες, 2003). Παρόλα αυτά θεωρείται μια πολύ καλή μέθοδος τυποποίησης διαφορετικών στελεχών με σκοπό την ομαδοποίησή τους (Van Belkum και συνεργάτες, 2007).

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για την ενίσχυση των συγκεκριμένων ERIC αλληλουχιών που σύμφωνα με πρόσφατη βιβλιογραφία φαίνεται να δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά την τυποποίηση στελεχών *E. coli* αλλά και γενικότερα την οικολογία του βακτηρίου, όπως την πηγή προέλευσης. Συγκεκριμένα το 2009 δημοσιεύθηκε στο περιοδικό Environmental Microbiology μία ανασκόπηση εργασιών (Ishii και Sadowsky, 2009), που χρησιμοποιούν την αντίδραση rep-PCR ως τυποποιητική μέθοδο για τη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας πολλών προκαρυωτικών μικροοργανισμών αλλά και τη μελέτη της Μικροβιακής Οικολογίας αλλά και Εξέλιξης, διότι η τεχνική αυτή μπορεί να διαχωρίζει τους μικροοργανισμούς σε επίπεδο στελέχους. Για παράδειγμα, ενώ το *E. coli* χρησιμοποιείται ως δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης, η πιθανή πηγή προέλευσης του βακτηρίου αυτού στο περιβάλλον δεν είναι γνωστή. Η αντίδραση rep-PCR μπορεί να ξεχωρίσει μεταξύ των πολύ κοντινών γενετικά βακτηρίων, αυτά που έχουν διαφορετικά οικολογικά χαρακτηριστικά, προερχόμενα από διάφορους ξενιστές ζωικής προέλευσης. Επίσης προσφάτως χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί η απώλεια των λοιμογόνων γονιδίων του *E. coli* στο περιβάλλον. (Ishii & Sadowsky, 2009)

Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκαν και τα 117 στελέχη *E. coli* που είχαν αρχικά ταυτοποιηθεί, με τη χρήση του ζεύγους εκκινητών σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. (Rademaker και de Brujin, 1997)

Από αυτά το 90% (105) τυποποιείται επιτυχώς και ομαδοποιούνται σε 15 προφίλ ζωνών βάσει την αντίδραση ERIC-PCR. Το υπόλοιπο 10% (26 στελέχη) περιλαμβάνει στελέχη, τα οποία δεν τυποποιούνται με τη συγκεκριμένη μέθοδο. Η τυποποιητικότητα της μεθόδου είναι υψηλή καθώς υπολογίζεται στο 90%, που σημαίνει ότι η συγκεκριμένη μέθοδος ομαδοποιεί ικανοποιητικά τα στελέχη του *E. coli*. Η διακριτική ικανότητα της μεθόδου είναι D= 0,94, που σημαίνει ότι η μέθοδος έχει υψηλή ικανότητα να διαχωρίζει τα στελέχη με βάση της γενετική τους ποικιλομορφία. (Van Belkum και συνεργάτες , 2007).

Τα αποτελέσματα της εργασίας βρίσκουν συμφωνία με αποτελέσματα πρόσφατα δημοσιευμένα, όπως οι Mohapatra και συνεργάτες, οι οποίοι εφάρμοσαν 5 διαφορετικές εφαρμογές της αντίδρασης PCR σε 271 στελέχη *E. coli* από υδάτινα περιβάλλοντα. Μία από αυτές ήταν και η αντίδραση ERIC-PCR, η οποία κατάφερε να ομαδοποιήσει τα στελέχη αυτά σε 23 προφίλ, δίνοντας διακριτική ικανότητα ίση με 72,6% (Mohapatra και συνεργάτες, 2008).

Είναι φανερό, τόσο από τη βιβλιογραφία όσο και από την παρούσα εργασία, ότι η μέθοδος χαρακτηρίζεται από υψηλή διακριτική ικανότητα ακόμα και σε μεγάλο αριθμό στελεχών, γεγονός που την καθιστά κατάλληλη για την μελέτη γενετικής ποικιλομορφίας σε υδάτινα περιβάλλοντα.

Σε μία άλλη εργασία, η Casarez και οι συνεργάτες (2007), μελέτησαν 555 στελέχη *E. coli* που απομόνωσαν από φυσικά νερά. Με την αντίδραση ERIC- PCR τα στελέχη αυτά ομαδοποιήθηκαν σε 175 γονότυπους εκ των οποίων το 63% (109/175) αντιπροσωπεύονταν από ένα στέλεχος, ενώ 2 γονότυποι περιελάμβαναν το 37% των στελεχών (83 και 124 στελέχη αντίστοιχα). Είναι φανερή η υψηλή ποικιλομορφία που εμφανίζεται στα περιβαλλοντικά στελέχη E. coli , κάτι που διαπιστώθηκε και στην παρούσα εργασία.

Οι Baldy-Chuzdic και συνεργάτες (2001) μελέτησαν την εφαρμογή της αντίδρασης rep-PCR(ERIC) για την αποτύπωση του γονιδιώματος στελεχών *Escherichia coli* στις λίμνες Wojnowskie Wschodnie και Wojnowskie

Zachodnie. 46 στελέχη *E. coli* απομονώθηκαν και μελετήθηκαν με την εφαρμογή της αντίδρασης ERIC-PCR. Διαπιστώθηκε η γονιδική ποικιλομορφία των στελεχών αυτών στο υδάτινο περιβάλλον, ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκε μία γρήγορη και ποιοτική μελέτη της ποιότητας του νερού.

Συμπερασματικά, η χρήση τυχαίων εκκινητών από την αντιδραση ERIC-PCR οδηγεί στην ανάγκη σύγκρισης των αποτελεσμάτων της με άλλες τυποποιητικές μεθόδους, όπως είναι η μέθοδος της Pulsed Field Gel Electrophoresis. Έχει διαπιστωθεί από διάφορες εργασίες, ότι τις περισσότερες φορές τα αποτελέσματα της αντίδρασης ERIC-PCR επιβεβαιώνονται από τα αποτελέσματα της μεθόδου Pulsed Field gel electrophoresis με μικρές αποκλίσεις, παρόλο που η πρώτη έχει χαμηλότερη διακριτική ικανότητα (Olive και Bean, 1999 και Matsumoto και συνεργάτες, 2001, Casarez και συνεργάτες, 2007β).

4.3 Συσχέτιση απομονωθέντων στελεχών με τις γεωγραφικές περιοχές

Τα στελέχη απομονώθηκαν από δείγματα νερού 12 διαφορετικών περιοχών (Πίνακας 3.3). Από αυτές, η Λίμνη του Μαραθώνα και η Εύβοια έδωσαν το υψηλότερο ποσοστό απομονωθέντων στελεχών (21%) : 25/117. Ακολουθεί η η Μεσσηνία με ποσοστό 15% (18/117).

Το χαμηλότερο ποσοστό απομονωθέντων στελεχών, ήταν στην περιοχή των Τρικάλων με 1/117 με ποσοστό 0,9%.

Οι διαφορές στα ποσοστά σε αυτές τις περιοχές, ίσως να οφείλονται σε 2 παραμέτρους. Κατ' αρχήν, στον αριθμό των δειγμάτων, καθώς από τις 3 περιοχές με το υψηλότερο ποσοστό απομονωθέντων στελεχών έγιναν περισσότερες δειγματοληψίες από ότι στις υπόλοιπες περιοχές.

Επιπλέον, οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται στην διαφορετικότητα του οικοσυστήματος και στην ύπαρξη ή μη χλωρίου σε αυτά. (Πίνακας 3.1) Όσον αφορά την Λίμνη του Μαραθώνα, η απομόνωση υψηλού αριθμού στελεχών ήταν αναμενόμενη, καθώς πρόκειται για τεχνητή λίμνη και αποτελεί υποδοχέα

λυμάτων ποικίλης προέλευσης. Από την άλλη το ποσοστό απομόνωσης στελεχών *E. coli* από τα Δίκτυα Ύδρευσης, εξαρτάται πλέον και από την παρουσία ή μη χλωρίου. Το αναμενόμενο είναι ότι σε δείγματα χλωριωμένα, το ποσοστό των απομονωθέντων στελεχών θα πρέπει να είναι χαμηλότερο ,από αυτό των μη χλωριωμένων. Παρ' όλα αυτά, στην παρούσα εργασία παρατηρείται ότι στα δείγματα από το Δ.Υ του νομού Ευβοίας, βρέθηκε το 2 υψηλότερο ποσοστό απομόνωσης στελεχών παρ' όλο που το υπολειματικό χλώριο ήταν στα φυσιολογικά όρια. Αυτό ίσως οφείλεται στο ότι είτε η χλωρίωση δεν είναι ο καταλληλότερος τρόπος απολύμανσης, είτε το χλώριο δρα σαν μεταλλαξιογόνος παράγοντας κι έχει δημιουργήσει ανθεκτικά στελέχη τα οποία έχουν προσαρμοστεί σε αυτό το περιβάλλον.

4.4 Τυποποιήση στελεχών *E. coli*

Στη συγκεκριμένη εργασία για την ομαδοποίηση των 105 στελεχών (65% από Δ.Υ., 22% από Κ.Δ και 13% από Λ. Μαραθώνα), έγινε στατιστική ανάλυση με το πρόγραμμα Phylip 3.6.1, το οποίο ομαδοποιεί τα στελέχη βάση του αριθμού των ζωνών ηλεκτροφόρησης. Η ανάλυση στελεχών με υπολογιστικά προγράμματα όπως το Phylip 3.6.1 είναι ιδιαίτερα χρήσιμη, ειδικά σε περιπτώσεις που μελετάται μεγάλος αριθμός στελεχών. Επειδή, η ηλεκτροφορητική εικόνα που προκύπτει από μια αντίδραση ERIC-PCR εξαρτάται από πολλούς παράγοντες (μέθοδος απομόνωσης, συνθήκες αντίδρασης, εκκινητής κ.λ.π.) τα κριτήρια που τίθενται για την κατανόηση των αποτελεσμάτων πρέπει να είναι αρκετά αυστηρά. Προηγούμενες εργασίες έχουν δείξει ότι στελέχη που διαφέρουν κατά μία ή δυο ζώνες ηλεκτροφόρησης δεν θεωρούνται διαφορετικά στελέχη και έτσι δεν κατατάσσονται σε διαφορετικούς γονότυπους (Van Belkum . και Tassios, 2007 και Matsumoto και συνεργάτες, 2001)

1. Από τη μελέτη των αποτελεσμάτων της γονιδιακής ανάλυσης των στελεχών φαίνεται, ότι στελέχη διαφορετικής **γεωγραφικής προέλευσης** έχουν ίδιο προφίλ ζωνών βάσει της αντίδρασης ERIC-PCR (E3, E4, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, E13, E14, E15). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το E11 προφίλ, το οποίο έχει δημιουργηθεί από στελέχη από 7 διαφορετικές

περιοχές, άρα παρατηρείται μία μεγάλη διασπορά του κλώνου στα διάφορα περιβάλλοντα.

Υπάρχουν όμως και ERIC προφιλ πχ Ε1 και Ε2 που έχουν δημιουργηθεί από στελέχη απομονωμένα από την ίδια γεωγραφικη περιοχή, από το Δ.Υ της Μεσσηνίας και από την Λίμνη του Μαραθώνα αντίστοιχα.

Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν εργασίες οι οποίες να έχουν μελετήσει 3 διαφορετικά οικοσυστήματα αλλά αρκετοί έχουν ασχοληθεί με τη μελέτη ποικιλομορφίας *E. coli* από 2 διαφορετικά σημεία του ίδιου οικοσυστήματος. Σε κάποιες περιπτώσεις τα συμπεράσματα συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ενώ σε κάποιες άλλες τα στελέχη από το ένα μέρος του υδάτινου οικοσυστήματος ομαδοποιούνται και έχουν διαφορετικά ERIC προφίλ σε σχέση με τα στελέχη από ένα διαφορετικό μέρος του ίδιου οικοσυστήματος. (Baldy-Chuzdic και συνεργάτες, 2003, Dos Angos Borges και συνεργάτες, 2003, McLellan, 2004, Kon και συνεργάτες, 2007, Ibenyassin και συνεργάτες, 2006, Orsi και συνεργάτες, 2007)

Οι Baldy-Chuzdic και συνεργάτες, 2003, μελέτησαν και τη χρησιμότητα της αντίδρασης rep / ERIC- PCR σαν εργαλείο για την ανάλυση γονιδικής ποικιλομορφίας σε απομονωθέντα είδη *Escherichia coli* σε υδατικά περιβάλλοντα. Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η γονιδιακή ποικιλότητα σε 93 στελέχη *E. coli*, τα οποία απομονώθηκαν από 2 διαφορετικά βάθη νερού λίμνης. Χρησιμοποιώντας τους εκκινητές για την αντίδραση rep-PCR πήραν πολύπλοκα μοτίβα γονιδιακού αποτυπώματος αυξάνοντας την διακριτική ικανότητα της ανάλυσης, ενώ χρησιμοποιώντας τους primers για την ERIC- PCR, πήραν ένα λιγότερο πολύπλοκο μοτίβο γονιδιακού αποτυπώματος και αυτό ήταν πιο εύκολο να το ερμηνεύσουν. (Baldy - Chudzik και συνεργάτες, 2003)

Στα ίδια αποτελέσματα κατέληξε και ο Dos Angos Borges και συνεργάτες, 2003), ο οποίος χαρακτήρισε και μελέτησε με αντίδραση rep-PCR, στελέχη *E. coli* που είχαν απομονωθεί από μολυσμένα νερά της νοτίου Βραζιλίας. 98 διαφορετικές απομονώσεις αναγνωρίστηκαν από δείγματα από 5 περιοχές, εκ

των οποίων η μία περιοχή είχε υψηλή ποικιλομορφία σε σχέση με τις υπόλοιπες.

Η Ibenyassin και οι συνεργάτες της (2006), χρησιμοποιώντας την αντίδραση ERIC-PCR μελέτησαν 75 στελέχη εντεροπαθογόνου *E. coli* τα οποία απομονώθηκαν από λαχανικά, χώμα και αρδρευτικό νερό, με το οποίο είχαν ποτιστεί. Τα αποτελέσματα της αντίδρασης ERIC-PCR έδειξαν ομοιότητες μεταξύ των στελεχών από τα 3 διαφορετικά αυτά δείγματα. Επίσης, τα στελέχη *E. coli*, τα οποία απομονώθηκαν από τα λαχανικά σε διαφορετικές περιόδους έχουν το ίδιο ERIC προφίλ. Είναι φανερό ότι η αντίδραση ERIC PCR αποτέλεσε σημαντικό «εργαλείο» στην διερεύνηση της συγκεκριμένης επιδημίας.

Ο Kon και οι συνεργάτες του (2007), μελέτησαν την γενετική ποικιλότητα με αντίδραση rep-PCR, στελεχών *E. coli* από δείγματα νερού από την αμμώδη παραλία στην νοτιανατολική ακτή της λίμνης Huron, στο Οντάριο, στον Καναδά. Στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν από την ίδια περιοχή, αρκετά συχνά είχαν τα ίδια ή πολύ όμοια rep προφίλ, ενώ τα στελέχη από πιο διαφορετικές τοποθεσίες δειγματοληψίας παρουσίαζαν διαφοροποίηση στους rep τύπους.

Σε μία άλλη εργασία χρησιμοποιήθηκαν 2 δεξαμενές νερού στην Βραζιλία για να μελετήσουν την ποικιλομορφία της *E. coli.* Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση rep –PCR ως τυποποιητική μέθοδος. Παρόλο που και στις δύο δεξαμενές νερού το ποσοστό γενετικής ποικιλομορφίας ήταν σχεδόν ίδιο, τυχαίες διαδικασίες επιλογής έδειξαν ότι απομονώσεις από την ίδια δεξαμενή συσχετίζονταν περισσότερο. (Orsi και συνεργάτες, 2007)

2. Από την ανάλυση του φυλογεννετικού δέντρου παρατηρήθηκε ομαδοποιήση των στελεχών ανάλογα με **την πηγή προέλευσης του δείγματος και την ύπαρξη ή μη χλωρίου.** Προφίλ ζωνών βάσει της αντίδρασης ERIC-PCR έχουν δημιουργηθεί από στελέχη που έχουν προέλθει μόνο ή στην πλειοψηφία τους μόνο από ένα τύπο δείγματος νερού (χλωριωμένο ή μη), ενώ υπάρχουν κι ERIC προφίλ ζωνών τα οποία έχουν

δημιουργηθεί από στελέχη που έχουν προέλθει και από τα 2 είδη δείγματος σε περίπου ίδια ποσοστά.

Άρα είναι σημαντικό ότι 7 από τα 15 ERIC προφίλ που έχουν δώσει τα 105 στελέχη παρουσιάζονταιι μόνο ή στην πλειοψηφία τους από στελέχη που έχουν απομονωθεί από χλωριωμένα δείγματα. Το αποτέλεσμα αυτό ίσως αποτελεί μία ένδειξη δημιουργίας καινούριων στελεχών *E. coli* ανθεκτικών στο χλώριο.

Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν ενδείξεις ότι η χλωρίωση του νερού δημιουργεί stress στο *E. coli*, με αποτέλεσμα την δημιουργία καινούριων στελεχών ανθεκτικά στο χλώριο (Arana και συνεργάτες, 1999, Saby και συνεργάτες του, 1999, Wang και συνεργάτες, 2006, Bore και συνεργάτες, 2007)

Η έκθεση των στελεχών στο χλώριο δεν είναι κάτι απόλυτο. Πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν και ο χρόνος της έκθεσης αλλά και η συγκέντρωση του χλωρίου. Έχουν γίνει πειράματα και μελέτες οι οποίες έχουν ασχοληθεί με τον χρόνο έκθεσης βακτηρίων *E. coli.* Ο Zhao και οι συνεργάτες του, το 2001 μελέτησαν 6 στελέχη *E. coli* O157:7 κι ένα στέλεχος αναφοράς *E. coli*. Τα εξέθεσαν όλα σε διάφορες συγκεντρώσεις ελεύθερου χλωρίου, με σκοπό την αδρανοποίηση τους. Ένα στέλεχος *E. coli* O157:7, έδειξε ασυνήθιστη ανθεκτικότητα στο χλώριο και αναζωογονήθηκε μετά από έκθεση ενός λεπτού σε υψηλή συγκέντρωση ελεύθερου χλωρίου.

Αρκετοί επιστήμονες έχουν ασχοληθεί με την επίδραση του χλωρίου στο *E. coli:.*

Οι Arana και συνεργάτες (1999) συνέκριναν την επάρκεια των μεμβρανών του *Escherichia coli* μετά από την επίδραση χλωρίου και όζοντος. Μετά την επίδραση του χλωρίου τα κύτταρα του *E. coli* έχουν την τάση να δημιουργούν συσσωματώματα. Μία λογαριθμική μείωση των αποικιιών που καταγράφτηκε, χωρίς όμως τραυματισμό του κυτταροπλάσματος, μπορεί να οφείλεται στον σχηματισμό των συσσωματωμάτων.

Ο Saby και οι συνεργάτες του (1999) μελέτησαν την ανθεκτικότητα στο χλώριο του *E. coli* αλλά και την σύνθεση γλουταθειόνης σαν απόκριση σε συνθήκες

πίεσης (stress) από έλλειψη θρεπτικών συστατικών και αυξημένης οξυγόνωσης. Η αυξημένη παροχή οξυγόνου του φυσικού τύπου *E. coli,* οδηγεί στην αυξημένη σύνθεση της γλουταθειόνης κι επομένως στην ανοχή στο χλώριο. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το *E. coli* έχει μία γενική απόκριση στο οξειδωτικό stress, η οποία είναι ανεξάρτητη από την φύση του οξειδωτικού και ότι η ομοιόσταση της γλουταθειόνης κατέχει ένα ρόλο-κλειδί στην διέγερση αυτού του μηχανισμού. Η γλουταθειόνη μπορεί να προστατεύσει το *E. coli* από την χλωρίωση και προφανώς να διεγείρει κάποιους αμυντικούς μηχανισμούς.

Αλλαγές στην μορφολογία του κυττάρου του *E. coli* παρατηρήθηκαν μετά από έκθεση 30 δευτερολέπτων στο χλώριο. Η επέκταση του χρόνου έκθεσης στα 120 δευτερόλεπτα δεν προκάλεσε περαιτέρω μορφολογικές αλλαγές, οι οποίες προκλήθηκαν από καταστροφές στη επιφάνεια του κυττάρου (Wang και συνεργάτες, 2006).

Ο Bore και οι συνεργάτες του (2007) μελέτησαν την ανθεκτικότητα που απέκτησαν στελέχη *E. coli* K-12 μετά από έκθεση σε χλωριούχο βενζαλκόνιο (ΧΒ), Μελέτησαν τις αλλαγές του επιπέδου έκφρασης στο μεταγραφικό και πρωτεομικό επίπεδο του βακτηρίου, το οποίο σταδιακά προσαρμόστηκε σε ένα επίπεδο ανθεκτικότητας στο ΧΒ 7-8 φορές μεγαλύτερο από την αρχική τιμή. Συγκεκριμένα η *E. coli* K-12 προσαρμόστηκε σε μεγαλύτερη αντοχή στο ΧΒ αποκτώντας μερικούς γενικούς μηχανισμούς αντίστασης, π.χ αντοχή σε αντιβιοτικά και προστασία έναντι στο οξειδωτικό stress. Επίσης αυξήθηκε η έκφραση ορισμένων ρυθμιστικών γονιδίων. Κάποιες πρωτείνες της εξωτερικής μεμβράνης έδειξαν ελαττωμένη έκφραση (Omps, OmpF, OmpT) ενώ σε κάποιες άλλες παρατηρήθηκε υπερέκφραση (OmpC). Επίσης στα βακτήρια αυτά παρατηρήθηκε αυξημένη αντοχή σε ορισμένα αντιβιοτικά. Συμπερασματικά τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν στην εργασία αυτή δείχνουν μεγάλες αλλαγές στην έκφραση κάποιων γονιδίων των βακτηρίων που έδειξαν αυξημένη αντοχή στο ΧΒ σε σχέση με τα βακτήρια άγριου τύπου, μετά από επαναλαμβανόμενα πειράματα.

Από την παραπάνω βιβλιογραφία φαίνεται ότι η χλωρίωση είναι στρεσογόνος παράγοντας που δεν έχει σαν αποτέλεσμα πάντα τον θάνατο των βακτηρίων.

Το αποτέλεσμα αυτό εξαρτάται από το χρόνο έκθεσης των βακτηρίων στο χλώριο. Ορισμένα από τα βακτήρια αυτά προσαρμόζονται και επιβιώνουν στις καινούριες αυτές περιβαλλοντικές συνθήκες. Η έκθεση των κυττάρων *E. coli* στους στρεσογόνους αυτούς παράγοντες φαίνεται να έχει μεταλλαξιογόνο δράση. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για την ικανότητα μετάλλαξης των μικροοργανισμών σε συνθήκες πίεσης. Το συμπέρασμα αυτό είναι ιδιαίτερα ενδιαφερον σε παθογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι δημιουργούν σοβαρά προβλήματα Δημόσιας Υγείας μέσω υδατογενούς μετάδοσης.

Σε συνθήκες πίεσης (stress) οι οργανισμοί εκτός από εκτός από την άμεση κυτταρική προσαρμογή, μπορούν να προσαρμοστούν στις καινούριες συνθήκες, μέσω αλλαγών στο γενετικό τους υλικό. Οι αλλαγές αυτές μπορούν να γίνουν μέσω της μετάλλαξης ή της απόκτησης λειτουργιών, των οποίων η εκκίνηση είχε προηγηθεί μέσω της οριζόντιας μεταφοράς. Ο Taddei και οι συνεργάτες του μελέτησαν αποδείξεις από την γενετική βακτηρίων, από τις οποίες φαίνεται ότι η συχνότητα τέτοιων γεγονότων αυξάνεται σαν απόκριση σε συνθήκες πίεσης ενεργοποιώντας μηχανισμούς μεταλλαξιογένεσης (πχ ο μηχανισμός SOS). Η φυσική επιλογή, μπορεί να θεωρηθεί μία από τις αιτίες πρόκλησης τέτοιων αλλαγών. Οι μηχανισμοί μεταλλαξιογένεσης μερικές φορές μπορεί να ενεργοποιούνται πολύ συγκεκριμένα, αν και τυφλά, στις προκλήσεις του περιβάλλοντος. Οι μεταλλάξεις αυτές που προκαλούνται από περιβαλλοντικές συνθήκες πίεσης ενισχύουν τον πολυμορφισμό, ο οποίος είναι το δομικό στοιχείο του φραγμού της γενετικής ανταλλαγής (Taddei και συνεργάτες, 1997).

Οι Bjedov και συνεργάτες, 2003 δημοσίευσαν στο περιοδικό Science μία μελέτη, σύμφωνα με την οποία η εξελικτική σημασία της μεταλλαξιογένεσης είναι μεγάλη.

Η ανάλυση των μοριακών μηχανισμών δείχνει ότι αύξηση της μεταλλαξιογένεσης μπορεί να είναι ένα παραπροιόν της απάντησης του μικροοργανισμού σε συνθήκες πίεσης. Προσομοιώσεις στον υπολογιστή και ανάλυση των επηρεασμένων από τις συνθήκες stress φαινοτύπων ανάμεσα σε απομονώσεις *E. coli* από το φυσικό περιβάλλον υποδεικνύουν ότι αυτού

του είδους η μετάλλαξη μπορεί να είναι το αποτέλεσμα επιλογής των επωφελών μεταλλάξεων, που προκαλούνται από μία τέτοια διαδικασία.Η αύξηση της γενετικής ποικιλομορφίας παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των βακτηρίων (Tenallion και συνεργάτες, 2003).

Τα βακτήρια για να προσαρμοστούν και να επιβιώσουν σε συνθήκες πίεσης (stress), έχουν καθολικούς μηχανισμούς οι οποίοι έχουν σαν αποτέλεσμα τις αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση και στον μεταβολισμό. Οι αποκρίσεις αυτές ελέγχονται από κύριους ρυθμιστές, στους οποίους περιλαμβάνονται οι RpoS and RpoH. Οι αποκρίσεις αυτές συχνά επικαλύπτονται και επηρεάζονται σε διαφορετικό βαθμό από τις ίδιες συνθήκες περιβαλλοντικής πίεσης. Οι συνθήκες αυτές μπορεί να είναι έλλειψη τροφής, καταστροφή DNA, αλλαγή θερμοκρασίας και έκθεση στα αντιβιοτικά. Όλοι αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν λειτουργίες οι οποίες αυξάνουν την γενετική ποικιλία. Το αποτέλεσμα είναι ότι κάτω από ποικίλες στρεσογόνους συνθήκες, προκαλούνται στα βακτήρια γενετικές αλλαγές. Η παροδική αυτή κατάσταση μετάλλαξης μπορεί να είναι σημαντική για την εξέλιξη λόγω προσαρμογής. (Foster, 2007)

Καταλήγωντας είναι σημαντικό να τονιστεί ότι στη συγκεκριμένη εργασία έγινε μια πρώτη προσπάθεια καταγραφής των μοριακών τύπων περιβαλλοντικών στελεχών *E. coli*, τα οποία απομονώθηκαν από 3 διαφορετικά οικοσυστήματα (Κολυμβητικές Δεξαμενές, Δίκτυα Ύδρευσης από όλη την Ελλάδα και από τη Λίμνη του Μαραθώνα) που δεν έχουν μελετηθεί ξανά στον Ελλαδικό χώρο. Στελέχη που είχαν προέλθει από χλωριωμένα δείγματα νερού είχαν ίδιο προφίλ ζωνών με βάση την αντίδραση ERIC-PCR με στελέχη που είχαν απομονωθεί από μη χλωριωμένα δείγματα και σε πολλές περιπτώσεις από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές αρκετά απομακρυσμένες μεταξύ τους. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελεί το προφίλ Ε7, το οποίο έχει δημιουργηθεί από 10 στελέχη, 4 προερχόμενα από χλωριωμένα νερά και 6 από μη χλωριωμένα και από 4 διαφορετικές περοχές (Λ. Μαραθώνα, Δ.Υ Εύβοιας, Δ.Υ Ζακύνθου και Κ.Δ Χαιδαρίου).

Το παράδειγμα αυτό αποτελεί μία ένδειξη δημιουργίας αλλά και διασποράς καινούριων κλώνων ανθεκτικών στο χλώριο.

Η μελέτη αυτή θα μπορούσε να βοηθήσει στην προάσπιση της Δημόσιας Υγείας, μελετώντας όχι μόνο την διασπορά του *E. coli* και συνεπώς και κάποιων παθογόνων αλλά και την πηγή προέλευσής τους (αν είναι υδατογενής), που είναι πολύ βασικό σε περίπτωση κάποιας επιδημίας. Επίσης, είναι σημαντική η μελέτη, η καταγραφή και η δημιουργία τράπεζας καινούριων στελεχών, τα οποία επιβιώνουν σε συνθήκες stress, όπως το χλώριο.

Για τον λόγο αυτό πρέπει να μελετηθούν περισσότερα στελέχη και να χρησιμοποιηθεί και μία μέθοδος φαινοτυπικής τυποποίησης όπως αντιβιοανθεκτικότητα ή μία δεύτερη μοριακή μέθοδος με μεγαλύτερη ειδικότητα, πχ. η μέθοδος PFGE, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω.

Υπάρχουν και σύγχρονες βιβλιογραφικές αναφορές που επιλέγουν την αντίδραση ERIC-PCR χωρίς να τη συγκρίνουν με άλλες μεθόδους, θεωρώντας δεδομένα τα συγκριτικά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες μεθόδους μοριακής τυποποίησης. (Lyautey, 2010)

Το 2010, η Lyautey και οι συνεργάτες μελέτησαν την παρουσία και την ποικιλομορφία στελεχών *E.coli* τα οποία είχαν απομονωθεί από επιφανειακά νερά από πολλές κοίτες ποταμών από την πεδιάδα του South Nation River στο ανατολικό Οντάριο του Καναδά. Από τον Μάρτιο του 2004 ως τον Νοέμβριο του 2007 συλλέχθηκαν συνολικά 2.004 δείγματα επιφανειακών νερών από 24 σημεία δειγματοληψίας. Χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση PCR επαναλαμβανόμενου εξωγονιδιακού παλίνδρομου DNA (repetitive extragenic palindromic PCR-rep PCR) για τον χαρακτηρισμό της ποικιλομορφίας των 21.307 απομονώσεων *E. coli*, επιτρέποντας την ταυτοποιήση 7.325 διακριτών γονοτύπων. Ο πληθυσμός κυριαρχήθηκε χρονικά και τοπικά από μερικούς επικρατείς γονότυπους (ομάδες με πάνω από 500 απομονώσεις) και μερικούς γονότυπους ενδιάμεσου πληθυσμού (ομάδες από 10 έως και 499 απομονώσεις). Απομονώσεις *E. coli* από δείγματα νερού από επικρατείς ή ενδιάμεσου πληθυσμού γονότυπους ομαδοποιήθηκαν με απομονώσεις από δείγματα κοπράνων τα οποία συλλέχθηκαν από την ίδια περιοχή μελέτης , την ίδια χρονική περίοδο και το 90% των απομονώσεων που εξετάστηκαν

αποδείχθηκε ότι έχουν τους ίδιους γονότυπους με τις απομονώσεις από τα κόπρανα. Συνολικά, τα δεδομένα μας υποδεικνύουν ότι η πυκνότητα και η ποικιλομορφία της *E. coli* στην κοίτη του ποταμού είναι ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης. Ανιχνεύθηκαν πληθυσμοί *E. coli* από τα δείγματα νερού που ήταν διαφορετικοί από τις απομονώσεις από τα κόπρανα, και σε αυτήν την περίπτωση, θεωρούνται πιθανά περιβαλλοντικά στελέχη.

Στην Ελλάδα η αντίδραση rep-PCR έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμός της ανθρώπινης ή μη προέλευσης *E.coli* που απομονώνεται από το υδάτινο περιβάλλον (Βενίερη, 2005).

Επίσης έχει δημοσιευθεί η εργασία για την μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας των βακτηρίων της Λίμνης του Μαραθώνα (Λυμπεροπούλου, 2009).

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΑΡΑΣΜΑΤΑ

1. Η ERIC-PCR

   α) Θεωρείται μία γρήγορη και αξιόπιστη μοριακή τυποποιητική μέθοδος για μία πρώτη ομαδοποίηση στελεχών *E.coli*.

   β) Η τυποποιητική της ικανότητα είναι 90%

   γ) Η διακριτική της ικανότητα είναι αρκετά υψηλή D= 0,94

2. Το βακτήριο *E.coli* έχει σταθερή παρουσία τόσο σε χλωριωμένα όσο και σε μη χλωριωμένα δείγματα νερού.

3. Βρέθηκαν 2 πρότυπα με τν αντίδραση ERIC-PCR (E1 και E13), τα οποία ήταν συχνά αναφερόμενα στα 105 στελέχη που μελετήθηκαν.

4. Η παρουσία ίδιων ERIC-PCR προφίλ σε διαφορετικά υδάτινα οικοσυστήματα, τα οποία περιέχουν ή δεν περιέχουν χλώριο, υποδεικνύει την δημιουργία ανθεκτικών στελεχών κάτω από την επιλεκτική πίεση του χλωρίου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ackman D., Marks S., Mack P., Calwell M., Root T. & Birkhead G. **(1997)** Swimming-associated haemorrhagic colitis due to Escherichia coli O157:H7 infection:evidence of prolonged contamination of a fresh water lake. *Epidimiol. Infec*. **119**, 1-8

2. Adwan G.M & Adwan K.M **(2004)** Isolation of shiga toxigenic Escherichia coli from raw beef in Palestine, Journal of Food Microbiology, 97: 1, 81-84

3. Ahmed A., Li J, Shiloach Y., Robbins J. & Szu S. **(2006a)** "Safety and immunogenicity of *Escherichia coli* O157 O-specific polysaccharide conjugate vaccine in 2-5-year-old children". *J Infect Dis* **193** (4): 515–21

4. Ahmed A., Li J., Robbins J.B. & Szu S.C. **(2006b)** Safety and immunogenicity of Escherichia coli O157 O-specific polysaccharide conjugate vaccine in 2-5-year-old children., J Infect Dis **15**;193(4):515-21. Epup

5. Alberts B, Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M.,Roberts K. & Walter P **(2000)** ελληνική μετλαφραση Βασικές αρχές Κυτταρικής Βιολογίας: εισαγωγή στη μοριακή βιολογία του κυττάρου, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη, Αθήνα

6. Alcalde M., Ferrer M., Plou F.J. & Ballesteros A. **(2006)** Environmental biocatalysis : from remediation with enzymes to novel green processes. *Trends in Biotechnology* **24**, 281-287

7. Amábile-Cuevas C.F., Arredondo-García J.L., Cruz A. & Rosas I. **(2010)** Fluoroquinolone resistance in clinical and environmental isolates of Escherichia coli in Mexico City, *J Appl Microbiol*, **108**(1), 158-62.

8. Amann R.I., Ludwig W. & Schleifer K.H. **(1995)** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**, 143-169

9. Anon **(ISO 19458: 2006)** Water quality-Sampling for microbiological analysis

10. Anon (**ISO 9308-1: 2000**) Water quality- Detection and enumeration of Escerichia coli and coliform bacteria – Part 1: Membrane filtration method

11. APHA **(2005):** Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health, Association

12. Arana I., Santorum P., Muela A. & Barcina I. **(1999)** Chlorination and ozonation of waste water : comparative analysis of efficasy through the effect on

Escherichia coli membranes, *Applied and Environmental Microbiology* **8,** 883-888

13. Baldy-Chudzik K, Niedbach J & Stosik M. **(2001)** Application of rep-PCR fingerprinting for genotyping of Escherichia coli strains in Wojnowskie Wschodnie and Wojnowskie Zachodnie lake, *Acta Microbiol Pol* **50**(3-4):233-42.

14. Baldy-Chudzik K., Niedbach J. & Stosk M. **(2003)** REP-PCR fingerprinting as a tool for the analysis of genomic diversity in Escherichia coli strains isolated from an aqueous/freshwater environment, *Cellular and Molecular Biology letters* **8**, 793-798

15. Bentley R & Meganathan R. **(1982)** "Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria", *Microbiol. Rev.* **46** (3): 241–80. PMC281544, PMID6127606

16. Bettelheim, K.A., Kuzevski, A., Gilbert, R.A., Krause, D.O. & McSweeney, C.S. **(2005)** The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. *J Appl Microbio.* **98**, 699-709.

17. Bielaszewska M., Mellmann A., Zhang W., Köck R., Fruth A., Bauwens A., Peters G. & Karch H. **(2011)** Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study, *The Lancet Infectious Diseases*, **11**(9), 671 - 676,

18. Bjedov I, Tenaillon O, Gérard B, Souza V, Denamur E, Radman M &Taddei F, Matic I**. (2003)** Stress-induced mutagenesis in bacteria., *Science* **30**;300(5624):1404-9.

19. Blaount Z.D., Borland C.Z. & Lenski R.E **(2008)** Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population *of Escherichia coli, PNAS* **105**(23) 7899–7906

20. Blattner F.R. & Plunkett G., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J, Mau B. & Shao Y. **(1997)** The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science* **5**;277(5331):1453-62

21. Bohannan B.J.M & Hughes J. **(2003)** New approaches to analyzing microbial biodiversity data, *Current Opinion in Microbiology* **6**, 282-287

22. Bore E.,Hebraud M., Chafsey I., Chambon C., Skjæret C., Moen B., Møretrø T.,Langsrud O., Rudi R. & Langsrud S**. (2007)** Adapted tolerance to benzalkonium chloride in *Escherichia coli* K-12 studied by transcriptome and proteome analyses. *Microbiology* **153**, 935-946

23. Brewster D.H., Brown M.I., Robertson D., Houghton G.L., Bimson J. & Sharp J.C.M. **(1994)** An outbreak of Escherichia coli O157 associated with a children's paddling pool. *Epidemiology and Infection* **112**, 3:441-447

24. Bridson E.Y. **(2006)** The OXOID MANUAL 9th Edition

25. Bryan, A., Shapir, N. & Sadowsky M.J. **(2004)** Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 2503-2507.

26. Brzuszkiewicz E.,Thurmer A., Schuldes J., Leimbach A., Liesegang H., Meyer F.-D., Boelter J., Petersen H., Gottschalk G. & Daniel R. **(2011)** Genome sequence analyses of two isolates from the recent Escherichia coli outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic Escherichia coli (EAHEC), *Arch Microbiol,* **193**, 883–891

27. Casarez E.A., Pillai S.D. & Di Giovanni G.D**. (2007α)** Genotype diversity of Escherichia coli isolates in natural waters determined by PFGE and ERIC PCR. *Warer Research*, **41**:3643-3648

28. Casarez EA., Pillai S.D. and Di Giovanni D.G C,Mott J.B., Vargas M., Dean K.E. & Di Giovanni G.D**. (2007β)** Direct comparison of four bacterial source tracking methods and use of composite data sets., *J Appl Microbiol*., **103**(2):350-64.

29. Centers of Disease Control and Prevention **(2004)** Surveillance for waterborn-disease outbreaks associated with recreational water and drinking water-United States,2001-2002. *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep*, **53**,No SS-8, 1-48

30. Centers of Disease Control and Prevention **(2011)** Investigation Update: Outbreak of Shiga toxin-producing *E. coli* O104 (STEC O104:H4) Infections Associated with Travel to Germany

31. Chen T., Li L., Hao H. & Qiao Y. **(2011)** Preparation of monomeric B27 Lys destripeptide insulin by intein mediated expression in Escherichia coli. *Protein Expr Purif*., **80**(1), 152-6.

32. Choi S., Bang J., Kim H., Beuchat L.R. & Ryu J.H **(2011)** Survival and colonization of Escherichia coli O157:H7 on spinach leaves as affected by inoculum level and carrier, temperature and relative humidity. *J Appl Microbiol.*, **111**(6):1465-72.

33. Clifford J.H.**(1999):** Chlorine Inactivation of Escherichia coli O157:H7, Emerging Infectious Diseases

34. Coallier J., Prvost M., Rompre A. & Duchesne D. **(1994)** The optimization and application of two direct viable count methods for bacteria in distributed drinking water. *Canadian Journal of Microbiology*, **40**, 830-836

35. Cockerill III, F.R. **(1999)** Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 199-212.

36. Colwell R.R., Clayton R.A., Ortiz-Conde B.A., Jacobs D. & Russek-Cohen E. **(1995)** The microbial species concept and biodiversity (pp 3-15). In *Microbial Diversity and Ecosystem Function*. Allsopp, D., Colwell, R.R & Hawksworth D.L. (Eds), CAB International, Oxon

37. Cornelis P. **(2000)** Expressing genes in different Escherichia coli compartments. *Curr Opin Biotechnol.* **11**(5):450-4.

38. Dev V.J, Main M., & Gould I. **(1991)** Waterborne outbreak of Escherichia coli O157:H7. *Lancet* **337**:1412

39. Dos Anjos Borges L.G., Vechia V.D. & Corcao G. **(2003)** Characterisation and genetic diversity via REP-PCR of Escerichia coli isolates frompolluted waters in southern Brazil, *FEMS Microbiology Ecology* **45**, 173-180

40. Durso L.M., Smith D. & Hutkins R.W. **(2004)** Measurements of fitness and competition in commensal *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Applied and Environmental Microbiology* ***11****, 6466-6472*

41. Dutil S., Tessier S. , Veillette M. , Laflamme C. , Me´riaux A. , Leduc A. ,J. Barbeau J. & Duchaine C. **(2006)** Detection of Legionella spp. by fluorescent in

situ hybridization in dental unit waterlines, *Journal of Applied Microbiology* **100**, 955–963

42. Felsenstein, J. **(2007)** PHYLIP -- Phylogeny Inference Package (Version 3.67). Distributed by the author. Department of Genom Sciences, University of Washington, Seattle.

43. Foster PL. **(2007)** Stress-induced mutagenesis in bacteria. Crit Rev Biochem *Mol Biol.* **42**(5):373-97.

44. Friedman M.S, Roels T., Koehler J.E., Feldman L., Bibb W.F. & Blake P. **(1999)** Escherichia coli O157H:7 Outbreak associated with an improperly chlorinated swimming pool, *Clinical Infectious diseases* **29**, 298-303

45. Fux C.A, Shirtliff M, Stoodley P & Costerton J.W. **(2005)** Can laboratory reference strains mirror "real-world" pathogenesis? *Trends Microbiol,* **13**(2):58-63

46. Gaston K.J. & Spicer J.I. **(1998)** Biodiversity : an introduction. Oxford. Blackwell Science, Malden, MA, USA

47. Gazouli M., Tzouvelekis L.S., Prinarakis E., Miriagou V. & Tzelepi E. **(1996)** Transferable Cefoxitin resistance in *Enterobacteria* from Greek hospitals and characterization of a plasmid-mediated group 1 β-Lactamase (LAT-2), *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 1736-1740.

48. Gillespie S. & Bamford K. **(2000)** Medical Microbiology and Infection at a glance. Blackwell science, ISBN 960-394-116-6

49. Glick B.R & Pasternak J.J. **(2003)** Molecular Biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA, ASM Press, American Society for Microbiology, USA

50. Goldwater P.N.& Bettelheim K.A. **(2000)** *Escherichia coli* 'O' group serology of a haemolytic uraemic syndrome (HUS) epidemic. *Scand J Infect Dis*. **32**(4), 385-94.

51. Grabow W.O.K **(1991)** New trends in infections associated with swimming pools, ISSN, 17, 2, 173-177

52. Grozdanov L., Raasch C., Schulse J., Sonnenborn U., Gottschak G., Hacker J. & Dobrindt U. **(2004)** Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917. *J. Bacteriol*. **186**(16), 5432-41

53. Hansen D.L., Ishii S., Michael J. Sadowsky M.J. & Hicks R.E **(2009)** *Escherichia coli* Populations in Great Lakes Waterfowl Exhibit Spatial Stability and Temporal Shifting, *Applied and Environmental Microbiology* **75**(6), 1546–1551

54. Hart T. & Sheans P. **(2000),** Έγχρωμος Άτλας Ιατρικής Μικροβιολογίας , Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας

55. Haught, C., Wilkinson, D.L, Zgafas, K. & Harrison, R.G**. (1994)** A method to insert a DNA fragment into a doublestranded plasmid. *Biotechniques* **16**, 46–48.

56. Hayashi T., Makino K.,, Ohnishi M., Kurokawa K, Ishii K., Yokoyama K., Han C.-G., Ohtsubo E., Nakayama K., Murata T., Tanaka M., Tobe T., Iida T., Takami H., Honda T., Sasakawa C., Ogasawara N., Yasunaga T., Kuhara S., Shiba T., Hattori M. & Shinagawa M. **(2001)** Complete Genome Sequence of Enterohemorrhagic *Eschelichia coli* O157:H7 and Genomic Comparison with a Laboratory StrainK-12**,** DNA Research **8**, 11–22

57. Hayes, J.R., English, L.L., Carr, L.E., Wagner, D.D. & Joseph, S.W. **(2004)** Multiple- antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from commercial poultry production environments. *Appl Environ Microbiol,* **70**, 6005-6011.

58. Hilborn ED, Mermin JH, Mshar PA, Hadler JL, Voetsch A & Wojtkunski C. **(1999)** A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Arch Intern Med* **159**:1758–64.

59. Hulton C.S.J., Higgings C.F. & Sharp P.M., **(1991)** ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of Escherichia coli, Salmonella typhimurium and other bacteria, Moecularl. Microbiology **5**, 825-834

60. Hunter-Cevera J.C. **(1998)** The value of microbial diversity. *Current opinion in Microbiology* **1**, 278-85

61. Ibeneyassine K., AitMhand R., Karamoko Y., Cohen N. & Ennaji M.M**. (2006)** Use of repetitive DNA sequences to determine the persistence of

enteropathogenic Escherichia coli in vegetables and in soil grown in fields treated with contaminated water., *Lett. Appl. Microbiol*. **43**(5), 528-33

62. Ishii S. & Sadowsky M.G. **(2009)** Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environmental Microbiology* **11(**4), 733–740

63. Ishii S., Hansen D.L., Hicks R. & Dadowsky M.J. **(2007)** Beach Sand and Sediments are Temporal Sinks and Sources of *Escherichia coli* in Lake Superior. *Environ. Sci. Technol*. **41**, 2203-2209

64. Ishii S., Ksoll W.B., Hicks R.E. & Sadowsky M.J. **(2006)** Presence and Growth of Naturalized *Escherichia coli* in Temperate Soils from Lake Superior Watersheds. *Applied and environmental Microbiology* **72**(1), 612–621

65. Kamada N., Inoue N., Hisamatsu T., Okamoto S., Matsuoka K., Sato T., Chinen H., Hong K.S., Yamada T., Suzuki Y., Suzuki T., Watanabe N., Tsuchimoto K. & Hibi T. **(2005)** Nonpathogenic Escherichia coli strain Nissle1917 prevents murine acute and chronic colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 11(5):455-63

66. Kamada N.,Maeda K.,Inoue N.,Hisamatsu T., Okamoto S., Hong K.S.,Takaya Yamada T.,Watanabe N.,Tsuchimoto K.,Haruhiko Ogata H. & Toshifumi Hibi T. **(2008)** Nonpathogenic Escherichia coli Strain Nissle 1917 Inhibits Signal Transduction in Intestinal Epithelial Cells. *Infection and Immunity* **76**(1):214–220

67. Kariuki S., Gilks C., Kimari J., Obanda A., Muyodi J., Waiyaki P. & Hart C.A. **(1999)** Genotype analysis of *Escherichia coli* strains isolated from children and chickens living in close contact. *Appl Environ Microbiol* **65**, 472-476.

68. Keene W.E., McAnulty J.M., Hoesly F.C., Williams L.P., Hedberg K., Oxman G.L., Barett T.J., Pfaller M.A. & Fleming D.W. **(1994)** A Swimming-Associated Outbreak of Hemorrhagic Colitis Caused by Escherichia coli O157:H7 and Shigella Sonnei. *N Engl J Med* **331**:579-584

69. Kemp P.F. & Aller J.Y **(2004)** Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology Ecology* **47, 161-177**

70. Khan A., Das S.C., Ramamurthy T., Sikdar A., Khanam J., Yamasaki S., Takeda Y. & BalakrishNair G. **(2002)** Antibiotic Resistance, Virulence Gene, and Molecular Profiles of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Diverse Sources in Calcutta, India. *J Clin Microbiol* **40**, 2009-2015.

71. Kon T, Weir SC, Howell ET, Lee H &Trevors JT. **(2007)** Genetic relatedness of Escherichia coli isolates in interstitial water from a Lake Huron (Canada) beach. *Appl Environ Microbiol*. **73**(6):1961-7

72. Konstantinidis K.T. & Tiedje J.M. **(2005)** Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA* **102**, 2567-2572

73. Ksoll W.B., Ishii S., Sadowsky M.J. & Hicks R.E. **(2007)** Presence and Sources of Fecal Coliform Bacteria in Epilithic Periphyton Communities of Lake Superior. *Appl Environ Microbiol* **73** (12), 3771–3778

74. Laing C.R., Zhang Y., Gilmour M.W., Allen V., Johnson R., Thomas J.E. & Gannon V.P. **(2012)** A Comparison of Shiga-Toxin 2 Bacteriophage from Classical Enterohemorrhagic Escherichia coli Serotypes and the German E. coli O104:H4 Outbreak Strain. *PLoS One*, 7(5):e37362

75. Lawrence J.G. & Ochman H. **(1998)** Molecular archaeology of *Escherichia coli* genome. *Proc.Natl. Acad. Sci.USA* **95,** 9413-9417

76. Lee Lang A., Tsai Y.L., Mayer C.L., Patton K.C. & Palmer C.J. **(1996)** Multiplex PCR for detection of the heat labile toxin gene and shiga-like toxin I and II genes in Escherichia coli isolated from natural waters, Applied and Environmental Microbiology **6**, 3145-3149

77. Lira, W.M., Macedo, C. & Marin, J.M. **(2004)** The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* with mastitis in Brazil. *J Appl Microbiol* **97**, 861-866.

78. Liu Y., Gilchrist A., Zhang J.& Li X.-F. (2008) Detection of Viable but Nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 Bacteria in Drinking Water and River Water, *Applied and Environmental Microbiology*, **74** (5), 1502-1507Tarraga J., Medina I., Arbiza L., Huerta-Cepas J., Gabaldon T., Dopazo J. & Dopazo H (2007) Phylemon: a suite of web tools for molecular evolution, phylogenetics and phylogenomics, *Nucleic Acids Research*, **35**, 38-42

79. Loukiadis E. , Kerouredan M., Beutin L., Oswald E. & Hubert Brugere **(2006)** Characterization of Shiga Toxin Gene (*stx*)-Positive and Intimin Gene (*eae*)-Positive *Escherichia coli* Isolates from Wastewater of Slaughterhouses in France, *Applied and Environmental Microbiology*, **72** (5), 3245–3251

80. Lourencetti C, Grimalt J.O, Marco E., Fernandez P., Font-Ribera L., Villanueva C.M., Kogevinas M. **(2012)** Trihalomethanes in chlorine and bromine disinfected swimming pools: Air-water distributions and human exposure. *Environ Int*, 45, 59-67

81. Lupski J.R.& Weinstock G.M. **(1992**) Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol*. **174**, 4525-4529.

82. Lyautey E., Lu z., Lapen D.R., Wilkes G., Scott A., Berkers T., Edge T.A. & Topp E. **(2010)** Distribution and Diversity of *Escherichia coli* Populations in the South Nation River Drainage Basin, Eastern Ontario, Canada. *Applied and environmental Microbiolgy* **76**(5), 1486–1496

83. Mandilara G., Smeti E.M., Mavridou A.T., Lambiri M.P., Vatopoulos A.C. & Rigas F.P. **(2006)** Correlation between bacterial indicators and bacteriophages in sewage and sludge. *FEMS Microbiol. Lett.* **263**, 119-126

84. Matsumoto M., Suzuki Y., Miyazaki Y., Tanaka D., Yasuoka T., Mashiko K., Ishikita R. & Baba J. **(2001)** Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-based PCR (ERIC-PCR); its ability to differentiate Streptococcus pyogenes strains and applicability to the study of outbreaks of Streptococcal infection, *The Tohoku Journal of experimental medicine* **194**(4), 205-212

85. Mavridou A., Spiropoulou M., Zacharopoulos A., Manthilara G., Papadopoulou A., Georgiou P. & Kourea-Kremastinou J., **(1999)** A twelve-year (1987-1998) sanitary survey for control of swimming pools in Attica. *Journal Acta Microbiologica Hellenica* **44**(3), 276-285

86. Mavridou A., Vagiona A., Boufa P., Vantarakis A., Roussia V. & Papapetropoulou M **(2005)** Assessment of the quality of pool water in Greece using various microbial indicators. International Conference on health and Wtaer Quality Aspects of the Man Made Recreational Water Environment. Budapest, 10-11 March 2005.

87. Mavridou A, Smeti E, Mandilara G., Boufa, Vagiona-Arvanitidou M., Vantarakis A., Vassilandonopoulou G.,Pappa O., Roussia V., Tzouanopoulos A., Livadara M., Aisopou I., MarakaV., Nikolaou E. & Karaouli V. **(2010)** Equivalency testing of TTC Tergitol 7 agar (ISO 9308-1:2000) with five culture media for the detection of E. coli in watersamples in Greece, *Water Science and Technology*, IWA Publishing, p 67-76

88. Maynard, C., Bekal, S., Sanschagrin, F., Levesque, R.C., Brousseau, R., Masson, L., Lariviere, S. & Harel, J. **(2004)** Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *J Clin Microbiol* **42**, 5444-5452.

89. McLellan S.L. **(2004)** Genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from urban rivers and beach water. *Applied and Environmental Microbiology* **8**, 4658-4665

90. Meacham K.J., Zhang L., Foxman B., Bauer R.J. & Marrs C.F. **(2003)** Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **41**,11:.5224-5226

91. Meintanis C, Chalkou K.I., Kormas K.A., Lymperopoulou D.S., Katsifas E.A., Hatzinikolaou D. G. & Karagouni A.D. **(2007)** Application of rpoB sequence similarity analysis, REP-PCRand BOX-PCR for the differentiation of species within the genus Geobacillus, *Appl. Microbio*. **46**, 395–401.

92. Mellmann A., Harmsen D., Cummings C. A., Zentz E. B., Leopold S. R., Rico A. Prior K., Szczepanowski R., Yongmei JiY., Zhang W., McLaughlin S. F., Henkhaus J. K., Leopold B., Bielaszewska M., Prager R., Brzoska P.M., Moore R. L., Simone Guenther S., Rothberg J. M. & Karch H. **(2011)** Prospective Genomic Characterization of the German Enterohemorrhagic Escherichia coli O104:H4 Outbreak by Rapid Next Generation Sequencing Technology PLoS ONE, **6** (7), e22751

93. Mir J., Morato J.& Ribas F**. (1997)** Resistance to chlorine of freshwater bacterial strains, *Journal of Applied Microbiology* **82**, 7-18

94. Mohapatra B.R & Mazumder A. **(2008)** Comparative efficacy of five different rep-PCR methods to discriminate Escherichia coli populations in aquatic environments, *Water Sci technol* **58**(3), 537-47

95. Mohapatra B.R, Broersma K. & Mazumder A. **(2007)** Comparison of five rep-PCR genomic fingerprint methods for differentiation of fecal Escherichia coli from humans, poultry and wild birds, *Fems Microbio. Lett.* **277**(1), 98-106

96. Mora, A., Blanco, M., Blanco, J.E., Alonso, M.P., Dhabi, G., Thomson-Carter, F., Usera, M.A., Bartolome, R., Prats, G. & Blanco, J. **(2004)** Phage types and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from humans and animals in Spain: identification and characterization of two predominating phage types (PT2 and PT8). *J Clin Microbiol* **42**, 4007-4015.

97. Nataro J.P. & Kaper J.B. **(1998)** Diarrheagenic *Escherichia coli. Clin. Microbiol. Rev.* **11,** 142-201

98. Neidhardt, F.C. **(1996)** Escherichia coli and Salmonella - Cellular and molecular biology. ASM PRESS – second edition.

99. Nikam A.K. **(2004)** Genomic fingerprinting of Escherichia coli strains using repetitive sequence based polymerase chain reaction, Gujarat Agriculture University, Ph.D Thesis

100. Nwachuku N. & Gerba C.P. (2008) Occurrence and persistence of Escerichia coli O157:H7 in water. Rev. In Environ. Sci. Biotechnol.7, 267-273

101. Olive D.M. & Bean P. (1999) Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms, journal of Clinical Microbiology, 37, 6:1661-1669

102. Oppegaard, H., Steinum, T.M. & Wasteson, Y. (2001) Horizontal transfer of a multi-drug resistance plasmid between coliform bacteria of human and bovine origin in a farm environment. Appl Environ Microbiol 67, 3732-3734.

103. Orsi R.H., Stoppe N.C., Sato M.I., Gomes T.A., Prado P.I., Manfio G.P. & Ottoboni L.M. (2007) Genetic variability and pathogenicity potential of Escherichia coli isolated from recreational water reservoirs. Res Microbiol, .158(5), 420-7

104. Papadopoulou C., Economou V., Sakkas H., Gousia P., Giannakopoulos X., Dontorou C., Filiousis G., Gessouli H., Karanis P. & Leveidiotou S. (2008) Microbiological quality of indoor and outdoor swimming pools in Greece:

Investigation of the antibiotic resistance of the bacterial isolates. Int J Hyg Environ Health 211(3-4), 385-97.

105. Pappa O., Mandilara G., Karagouni A., Vatopoulos A. & Mavridou A. (2009) Typing of environmental strains of Pseudomonas aeruginosa by Serotyping and Random Amplified Polymorphic DNA.Naxos, Conf Abst.,p 79-81

106. Patel J., Millner P., Nou X. & Sharma M. (2010) Persistence of enterohaemorrhagic and nonpathogenic E. coli on spinach leaves and in rhizosphere soil. Journal of Applied Microbiology 108, 1789-1796

107. Paton J. C. & Paton A.W. (1998) Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections. Clinical Microbiology Reviews 11(3), 450-479

108. Pearce M.C., Jenkins C., Vali L., Smith A.W., Knight H.I., Cheasty T., Smith H.R., Gunn G.J., Woolhouse M.E.J., Amyes S.G.B. & Frankel G. (2004) Temporal shedding patterns and virulence factors of Escherichia coli serogroups O26, O103, O111, O145, and O157 in a cohort of beef calves and their dams. Appl Environ Microbiol 70, 1708-1716.

109. Pearson H. (2007) The dark side of E. coli. Nature 4;445(7123):8-9.

110. Perna N.T, Plunkett G., Burland V., Mau B., Glasner J.D , Rose D.J, Mayhew G.F, Evans P.S., Gregor J., Kirkpatrick H.A., Pósfai G, Hackett J., Klink S., Boutin A., Shao Y., Millel L., Grotbeck E. J., Davis N. W, Lim A., Dimalanta E. T., Potamousis K.D., Apodaca J., Thomas S. Anantharaman T.S., Lin J, Yen G., Schwartz D. C., Welch R.A., & Blattner F. R. (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7, Nature, 409, 529-533

111. Perrière, G. & Gouy, M. (1996) WWW-Query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. Biochimie 78, 364-369.

112. Pitkänen T., Paakkari P., Miettinen I T., Heinonen-Tanski H., Paulin L., Hänninen M.L. (2007) Comparison of media for enumeration of coliform bacteria and Escherichia coli in non-disinfected water, J Microbiol Methods,68(3):522-9.

113. Rademaker J.L.W. & de Bruijn F.J. (1997) Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprintingand computer-assisted pattern

analysis. In DNAMarkers: Protocols, Applications and Overviews. ed. Caetano-Anolle´s, G. and Gresshoff, P.M. pp. 1–26. New York, NY:John Wiley & Sons, Inc.

114. RademakerJ.L.W., Louws F.J, Versalovic J.V. & de Bruijn F.J. (2008) Characterization of the diversity of ecological important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting.In Molecular Microbial Ecology Manual. Kowalchuck G.A., de Bruijn F.J., Head I.M., Akkermans A.D.L. and van Elsas J.D (eds.) Dordrecht, the Netherlands: Springer, pp. 611-664

115. Rangel J.M., Sparling P.H., Crowe C., Griffin P.M. & Swerdlow D.L. (2005) Epidemiology of Escherichia coli O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002., Emerg Infect Dis.11(4):603-9.

116. Rigas F., Mavridou A. & Zacharopoulos A. (1998) Water quality of swimming pools in Athens area, International Journal of Environmental Health Research 8(3), 253-260

117. Riley M., Abe T., Arnaud M.B., Berlyn M.K., Blattner F.R., Chaudhuri R.R., Glasner J.D., Horiuchi T., Keseler I/M/, Kosuge T/, Mori H/, Perna N.T., Plunkett G. 3rd, Rudd K.E., Serres M.H., Thomas G.H., Thomson N.R., Wishart D. & Wanner B.L. (2006) Escherichia coli K-12: a cooperatively developed annotation snapshot--2005. Nucleic Acids Res., 5;34(1):1-9.

118. Rosselo-Mora R. & Amann R.I. (2001) The species concept for prokaryotes, FEMS Microbiology 14, 150-157

119. Saby S., Leroy P. and Block J.C. (1999) Escherichia coli resistance to chlorine and glutathione synthesisin response to oxygenation and starvation, Applied and Environmental Microbiology 65(12), 5600-5603

120. Saenz Y., Zarazaga M., Brinas L., Lantero M., Ruiz-Larrea F. & Torres, C. (2001) Antibiotic resistance in Escherichia coli isolates obtained from animals, food and humans in Spain. Int J Antimicrob Agents 18, 353-358.

121. Samadpour M., Roberts M.C., Kitts C., Mulugeta W. & Alfi, D. (2005) The use of ribotyping and antibiotic resistance patterns for identification of host sources of Escherichia coli strains. Lett Appl Microbiol, 40, 63-68.

122. Sambrook J., Fritsch E.M. & Maniatis T. (1989) Molecular Cloning, A laboratory manual, Second edition, Chapter 6: Gel electrophoresis of DNA

123. Sazakli E. (2005) Comparative typing of Pseudomonas spp isolated from the aquatic environment in Greece by SDS-page and RAPD analysis, Journal of Applied Microbiology 90, 1191-1203

124. Schaechter, M. (2001) Escherichia coli and Salmonella 2000: the view from here. Microbiol Mol Biol Rev. 65, 119-130.

125. Schubert S., Darlu P., Clermont O., Wieser A., Magistro G., Hoffmann C., Weinert K., Tenaillon O., Matic I. & Denamur E. (2009) Role of intraspecies recombination in the spread of pathogenicity islands within the Escherichia coli species. PLoS Pathog, 5(1), e1000257

126. Shelton D.R., Karns J.S., Hoggins J.A., Van Kessel J.A.S, Perdue M.L., Belt K.T., Russel-Annelli J. & DebRoy C. (2006) Impact of microbial diversity on rapid detection of enterohrmorrhagic Escherichia coli in surface waters, FEMS Microiol. Let., 261, 95-101

127. Shields J.M., Hill V.R., Arrowood M.J. & Beach M.J. (2008) Inactivation of Cryptosporidium parvum under chlorinated recreational water conditions, Journal of Water and Health, IWA Publishing, 513-520

128. Singh A., Yu F.P. & Mc Feters G.A. (1990) Rapid detection of chlorine-induced bacterial injury by the direxl viable count method using image analysis. Applied and Environmentall Microbiology 56, 389-394

129. Sleigh J.D & Timbury M.C (1998) Notes on Medixal Bacteriology , Churcill Livongstone, fifth edition.

130. Sobsey M.D. (1989) Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. Water Science and Technology 21, 179-195

131. Souza V., Rocha M., Valera A. & Eguiarte, L.E (1999) Genetic structure of natural populations of Escherichia coli in wild hosts on different continents. Appl Environ Microbiol. 65, 3373-3385.

132. Spicer W.J (2000) Ιατρική Βακτηριολογία , Μυκητολογία και Παρασιτολογία, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού Α.Ε, ISBN 044304365

133. Stewart P.S., Griebe T. & Srinivassan R. (1994) Comparison of respiratory activity and culturability during monochloramine disinfection of binary population biofilms. Applied and Environmental Microbiology 62, 1690-1692

134. Stoeckel D.M., Mathes M.V., Hyer K.E., Hagedorn C., Kator H., Lukasik J., O'Brien T.L., Fenger T.W., Samadpour M., Strickler K.M. & Wiggins, B. (2004) Comparison of seven protocols to identify fecal contamination sources of Escherichia coli. Environ Sci Technol 38, 6109-6117.

135. Stumph A.N., Roggenkamp A. & Hoffmann H. (2005) Specificity of ebterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction for the detection of clonality within the Enterobacter cloacae complex, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 53, 9-16

136. Swerdlow D.L., Woodruff B.A. & Rrady R.C. (1992) A waterborne outbreakin Missouri of Escherichia coli O:157:H7 associated with bloody diarrhea and death. Ann Intern Med, 116:812-9

137. Taddei F., Vulić M., Radman M. & Matić I. (1997) Genetic variability and adaptation to stress. EXS 83, 271-90.

138. Tarraga J., Medina I., Arbiza L., Huerta-Cepaw J., Gebaldon T., Dopazo J. & Dopazo H. (2007) Phylemon : a suite of web tools for molecular evolution, phylogenetics nd phylogenomics, Nucleic Acids Research, 7 (5), 38-42

139. Tashiro Y., katabami A., Saito K. & Umeno D. (2012) A System for the Rapid Determination of the Mutation Spectrum in Escherichia coli. Anal Sci., 28(2):95.

140. Tenaillon O., Denamur E. & Matic I. (2004) Evolutionary significance of stress-induced mutagenesis in bacteria. Trends Microbiol. 6, 264-70.

141. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H. & Swaminathan B. (1995) Interpreting Chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing, Journal of Clinical Microbiology 33, 9:2233-2239

142. Tortora G.J, Funk B.R. & Case C.L (2009) Microbiology : an Introduction, Pearson Education Inc. 9th Edition, ISBN 0-8053-4791-7

143. Touchon M., Hoede C., Tenaillon O., Barbe V., Baeriswyl S., Bidet P., Bingen E., Bonacorsi S., Bouchier C., Bouvet O., Calteau A., Chiapello H., Clermont O., Cruveiller S., Danchin A., Diard M., Dossat C.,El Karoui M.,Frapy E., Garry L., Ghigo J.M., Gilles A.M, Johnson J., Le Bouguenec C., Lescat M., Mangenot S., Martinez-Jehanne V, Matic I., Nassi X., Oztas S., Petit M. A., Pichon C., RouZ.,Saint Ruf C.S., Schneider D., Tourret J., Vacherie B., Vallenet D., Medigue C., Rocha E.P.C.& Denamur E. (2009) Organised Genome Dynamics in the Escherichia coli Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths, PLoS Genetics, 5(1), e1000344

144. Tsen H.Y., Lin C.K. & Chi W.R. (1998) Development and use of 16S rRNA gene targeted PCR primers for the identification of Escherichia coli cells in water, Applied and Environmental Microbiology 85, 554-560

145. Turner R. (1999) Environmental and ecological economic perspective (pp. 1001-1036). In Handbook of environmental and resource economics. Van den Bergh J. C.J.M.(Ed.) Edward Elgar, Northampton, Massachusetts.

146. Van Belkum A., Tassios P.T, Dijkshoorn, Haeggman S., Cookson B., Fry N.K, Fussing V., Green J., Gerner-Smidt P., Brisse S. & Struelens M. (2007) Guideleines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology, Clinical Microbiology and Infectious Diseases 13, 1-46

147. Verma A., Bolton F.J., Fiefield D., Lamp P., Woloscin E, Smith N. & McCann R. (2007) An outbreak of E.coli O157associated with a swimming pool: an unusual vehicle of transmission, Epidemiology and Infection 136, 2:287

148. Versalovic J., de Bruin F.J. & Lupski J.R. (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR), Methods in Cell and Molecular Biology 5, 25-40

149. Wang H., Feng H., Maclaren S. & Luo Y. (2006) Examination of cell morphological changes of Escherichia coli treated with acidic electrolysed water, peroxyacetic acid and chlorine using a MFP-3DTM atomic force microscope, Annual Meeting of the Institute of Food Technologist 003a, 16.

150. Ward D.M., Cohan F.M., Bhaya D., Heidelberg J.F., Kühl M & Grossman A. (2008) Genomic, environmental genetics and the issue of microbial species. Heredity 100, 207-219

151. Ward D.M., Ferris M.J., Nold S.C. & Bateson M.M. (1998) A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62, 1353-1370

152. Wellington E.M.H & Williams S.T. (1978) Preservation of actinomycete inoculums in frozen glycerol. Microbiology Letters 6, 151-157

153. White D.G., Hudson C., Maurer J.J., Ayers S., Zhao S., Lee M.D., Bolton L., Foley T. & Sherwood J. (2000) Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in Escherichia coli associated with bovine diarrhea. J Clin Microbiol 38, 4593-4598

154. WHO (2006) Guidelines for safe recreational water environments, Volume 2: Swimming pools, spas and similar recreational environments. Geneva

155. Wiggins B.A., Cash P.W., Creamer W.S., Dart S.E., Garcia P.P., Gerecke T.M., Han J., Henry B.L., Hoover K.B., Johnson E.L., Jones K.C., McCarthy J.G., McDonough J.A., Mercer S.A., Noto M.J., Park H., Phillips M.S., Purner S.M., Smith B.M., Stevens E.N. & Varner A.K. (2003) Use of antibiotic resistance analysis for representativeness testing of multiwatershed libraries. Appl Environ Microbiol 69, 3399-3405

156. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. & Tingey S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18, 6531-6535.

157. Wilson L.A. & Sharp P.M. (2006) Enterobacterial repetitive intergenic ronsensus (ERIC) Sequenses in Escherichia coli: Evolution and Implications dor ERIC-PCR, Molecular Biology and Evolution 23(6), 1156-1168

158. Wilson T. & Carson J. (2001) Rapid, high-throughput extraction of bacterial genomic DNA from selective enrichment culture media. Letters in Applied Microbiology 32, 326-330

159. Xiong Y., Wang P., Lan R., Ye C., Wang H., Ren J., Jing H., Wang Y, Zhou Z., Bai X., Cui Z., Luo X., Zhao A., Wang Y., Zhang S., Sun H., Wang L., Xu (2012) A Novel Escherichia coli O157:H7 Clone Causing a Major Hemolytic Uremic Syndrome Outbreak in China, PLoS ONE , 7(4), e36144

160. Zhao T., Doyle M.P., Zhao., Blake P. & Wu F-M. (2001) Chlorine Inactivation of Escherichia coli O157:H7 in Water, Journal of Food Protection 64(10), 1607-1

Ελληνική Βιβλιογραφία

1. Αρσένη Α. **(1994**) Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων. ΖΗΤΑ Ιατρικές Εκδόσεις. Τέταρτη έκδοση.

2. Βενίερη Δ. **(2005)** Προσδιορισμός της ανθρώπινης ή μη προέλευσης του κολοβακτηριδίου που απομονώνεται από το υδάτινο περιβάλλον με καλλιεργητικές και μοριακές τεχνικές, Διδακτορική Διατριβή , Παν. Πάτρας

3. Καραγκούνη - Κύρτσου Α.Δ **(1999)** Μικροβιολογία. Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα

4. Καραγκούνη - Κύρτσου Α.Δ. **(2001)** Εργαστηριακές ασκήσεις Γενικής Μικροβιολογίας. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα

5. Κολιάλης **(1992)** Μικροβιολογία, University Studio Press.

6. Λεγάκης Ν., Αντωνιάδη Α., Αντωνιάδης Γρ, Τσελέντης Ι. **(1999)** Ιατρική Μικροβιολογία, Ιατρ. Εκδόσεις Πασχαλίδη

7. Λυμπεροπούλου Δέσποινα **(2009)** Μελέτη της ποικιλότητας των βακτηρίων τεχνητής λίμνης: ποιοτική και ποσοτική εποχιακή διακύμανση των μικροβιακών πληθυσμών Διδακτορική Διατριβή Εθνικό και καποδοστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

8. Μαυρίδου Θ. Α, Καμπούρης Ε. Μ. και Νικολαΐδου Λ.Α. **(2012)** Γενική Μικροβιολογία, Θεωρία και Εργαστηριακές Ασκήσεις, Εκδόσει Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα

9. Μεϊντάνης Χ.Κ. **(2005)** Μελέτη ποικιλότητας προκαρυωτικών οργανισμών (Αρχαίων και Βακτηριακών προκαρυωτικών οργανισμών) στη σαντορίνη. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Αθηνών

10. Παπαπετροπούλου Μ., Μαυρίδου Α. **(1995)** Μικροβιολογία του υδάτινου περιβάλλοντος- Βασικές αρχές, εκδ. Τραυλός, Αθήνα

11. Πόγγας Ν. **(2008)** Ιατρική Μικροβιολογία, Βακτηριολογία, εκδόσεις Οδυσσέας, Αθήνα

12. Χαρβάλου Α. **(2007)** Πρωτόκολλα Κλινικής Μικροβιολογίας ¨Η κλινική βακτηριολογία στην πράξη», Ιατρ. Εκδόσεις, Πασχαλίδη ISBN

Αναφορές από το διαδίκτυο

http://www.who.int

http://www.cfsan.fda.gov

http://www.ncbi.nlm.nih.gov

http://en.wikipedia.org

http://evolution.genetics.washington.edu

http://www.genome.wisc.edu

http: //ecoli.bham.ac.uk/ path/sero.html 2005

www.fda.gov

http://evolution.genetics.washington.edu .

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

α) ΟΜΙΛΙΕΣ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

1. Papatzitze O., Pappa O., Karagouni A.D., Lymperopoulou D.S., Kalkani E., Sagkana D.E., Papanastasiou A. and Mavridou A **(2009)**, Study of the diversity of *E.coli* strains isolated from swimming pool waters, *International Conference Swimming Pool and Spa, London,* Conference Abstracts p17-18.

2. **Όλγα Παπατζιτζέ** [1,2] , Όλγα Παππά Ο [1,4] , Αμαλία Καραγκούνη[3] , Δέσποινα Λυμπεροπούλου [3], Ελένη Καλκάνη[1], Γρηγόρης Σπανάκος [4], Ευμορφία Σαγκανά [2] , Ανδρέας Παπαναστασίου[2], Αθηνά Μαυρίδου Α (2010), Μελέτη βιοποικιλότητας στελεχών Ε. coli που έχουν απομονωθεί σε υδάτινα περιβάλλοντα, *8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δημόσιας Υγείας & Υπηρεσιών Υγείας «Κοινωνικές Επιδημίες», Αθήνα,* Βιβλίο πρακτικών σελ.116

β) ΑΝΗΡΤΗΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

1. Papatzitze O., Pappa O., Karagouni A.D., Lymperopoulou D.S., Kalkani E., Sagkana D.E., Papanastasiou A. ,Spanakos G. and Mavridou A **(2009)** Study of the diversity of *E.coli* strains isolated from aquatic environments, *15th Inrernational Symposium of the Health Related-Water Microbiology Symposium*, *Naxos Island*, Conference Proceedings p.248-253

2. Papatzitze O, Pappa O., Karagouni A.D., Lymperopoulou D.S., Kalkani E., Papanastasiou A., Spanakos G. , Keramydas D. and Mavridou **(2011),** Study of the diversity of *E.coli* strains isolated from aquatic environments, *4th International Conference Swimming Pool and Spa, Porto*, Conference Proceedings p 155-157

15th International Symposium of the Health-Related Water Microbiology Group
31.05 - 05.06.2009, Naxos, Greece

STUDY OF THE DIVERSITY OF *E.coli* STRAINS ISOLATED FROM AQUATIC ENVIRONMENTS

Papatzitze O.[2], Pappa O.,[1] Karagouni A.D.[3], Lymperopoulou D.S.[3], Kalkani E.[1], Sagkana D.E.[2], Papanastasiou A.[2] Spanakos G.[4] and Mavridou A.[1]

1 Department of Medical Laboratories, Technological Educational Institute Athens, 2 West Attica General Hospital, 3 Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, 4 National School of Public Health of Athens.

INDRODUCTION

E.coli It is used as a microbiological indicator for faecal contamination. It is normal flora of the gut in humans and animals, but it can also be found in aquatic environments such as swimming pools, lakes, water supply networks, saline water and in bottled water.

It is well-known that there is a correlation between the degree of faecal contamination and contamination from bathers and risk of illness from swimming activities .Chlorine is the most common disinfection procedures that are used.

AIMS OF THE STUDY

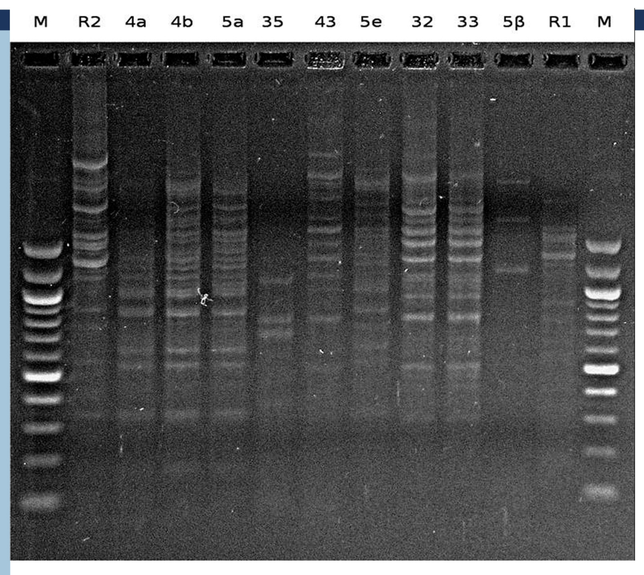
To assess the impact of the water's chlorination on the diversity of *E. coli*

To determine the genetic diversity and the possible clone similarities among *E. coli* strains isolated from pool waters.

MATERIALS AND METHODS

From 100 water samples 134 isolates were confirmed as *E.coli*. Among these strains, 60 isolates were randomly selected for genomic fingerprinting using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence polymerase chain reaction (ERIC-PCR). 31 were isolated from chlorinated waters and 29 from non-chlorinated waters. The amplification products were electrophorised in a 1.2% agarose gel. The fingerprintig patterns were analysed statistically by visual observation and by PHYLIP 3.6.1, analysis software.

Escerichia coli

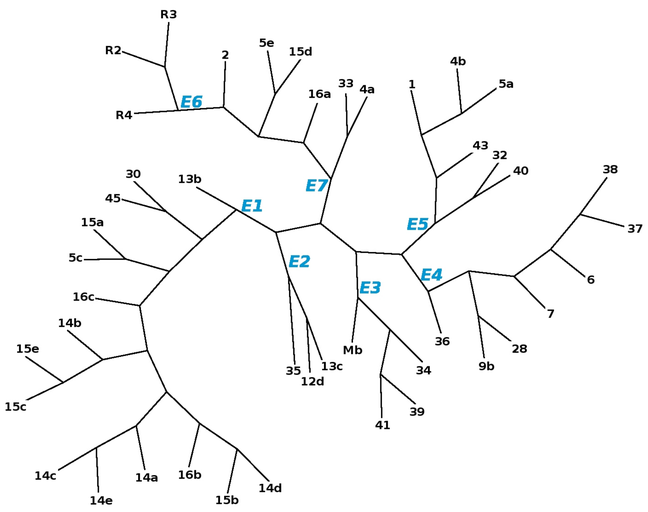


Fingerprinting pattern on an agarose gel 1%

RESULTS

ERIC-TYPES	STRAINS
E1	**2** chlorinated and **13** non chlorinated
E2	**3** non- chlorinated
E3	**1** chlorinated and **3** non-chlorinated
E4	**4** chlorinated and **3** non chlorinated
E5	**4** chlorinated and **2** non-chlorinated
E6	**3** non-chlorinated (Reference Materials)
E7	**4** chlorinated and **2** non-chlorinated
Non-Typeable	**17** chlorinated and **4** non-chlorinated

E7 seems to be a very eterogenic group and for the time being it cannot be clustered because of the small number of the strains and the research should be continued.



UPGMA Dendrogram using Phylip software suite

DISCUSSION

There is an indication of the generation of new *E. coli* types resistant to chlorine.The 5 strains isolated from non-chlorinated samples(E4, E5) the have exposed to previously chlorinated swimming pools Thus it is why are clustering in the same group with starins isolated from chlorinated samples.

1. Van Belkum A., Tassios P.T, Dijkshoorn, Haeggman S., Cookson B., Fry N.K, Fussing V., Green J., Gerner-Smidt P., Brisse S. And Struelens (2007) : Guideleines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology, Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 13: 1-46

2. Matsumoto M., Suzuki Y., Miyazaki Y., Tanaka D., Yasuoka T., Mashiko K., Ishikita R., Baba J.(2001) Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-based PCR (ERIC-PCR); its ability to differentiate Streptococcus pyogenes strains and applicability to the study of outbreaks of Streptococcal infection, Tohoku J. Exp. Med.,

FOURTH INTERNATIONAL CONFERENCE SWIMMING POOL & SPA

RESEARCH AND DEVELOPMENT ON HEALTH, AIR AND WATER QUALITY ASPECTS OF THE MAN-MADE WATER ENVIRONMENT

ADMINISTRAÇÃO REGIONAL DE SAÚDE DO NORTE – ARSN
FACULDADE DE DESPORTO DA UNIVERSIDADE DO PORTO – FADEUP
INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO PORTO – ISEP.IPP

PORTO
15—18 Mar
2011

STYDY OF THE DIVERSITY OF *E.coli* STRAINS ISOLATED FROM AQYATIC ENVIRONMENTS

Papatzitze O.*[2,3] , Pappa O.[4],Karagouni A.D.[3], Lymperopoulou D.S.[3], Kalkani E.[1], Papanastasiou A.[2] ,Spanakos G.[4], Keramydas D.[5] and Mavridou A.[1]

1.Department of Medical Laboratories, Technological Educational Institute Athens, 2.West Attica General Hospital, 3., Laboratory of Microbiology, Faculty of Biology, Department of Botany, University of Athens, . 4 Central Public Health Laboratory, Hellenic Centre for Diseases Control and Preven-

INDRODUCTION

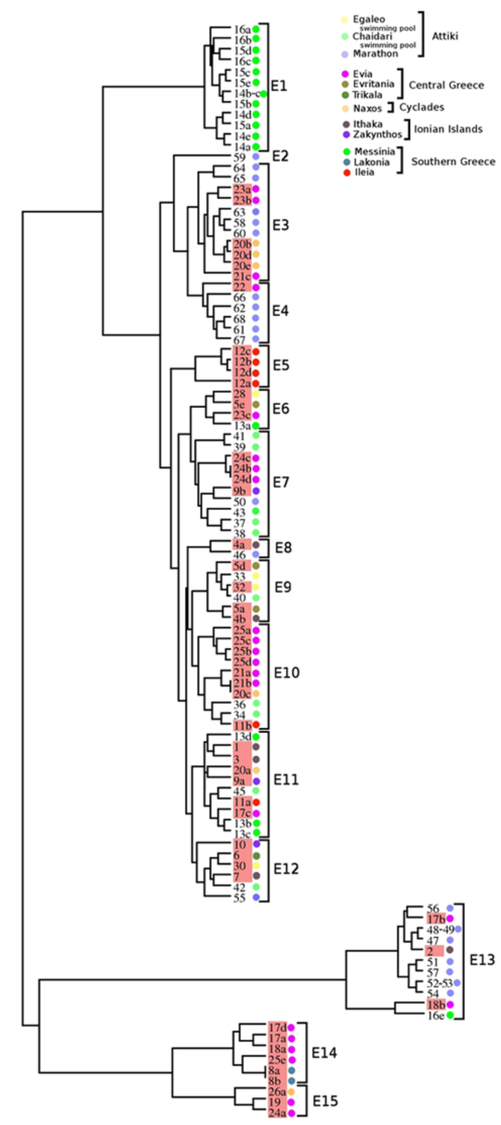
The study of bacterial diversity assesses the relationships between culturable bacteria and environmental factors. The use of molecular methods in the study of the diversity of microorganisms has revealed new insights in the composition of microbial communities. The importance of *E. coli* as a bacterial indicator of water quality has long being appreciated. *E. coli* strains are often isolated from water sources contaminated by sewage outlets. Chlorination is one of the most commonly used disinfection procedures for drinking and swimming pool waters.

AIMS OF THE STYDY

The isolation of *E. Coli* strains from chlorinated and non chlorinated water samples.To assess the impact of the water's chlorination on the diversity of *E. coli* .To determine the genetic diversity and the possible clone similarities among *E. coli* strains depending on the chlorine presence in the water and the geographical distribution .

MATERIALS AND METHODS

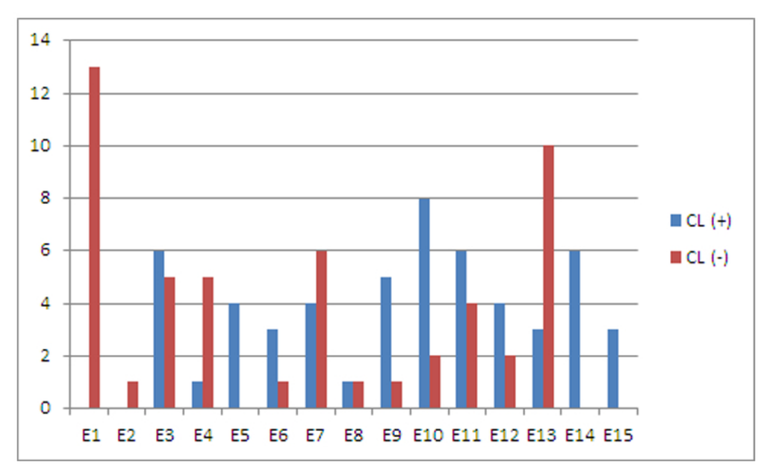
Sampling: 101 water samples were collected from swimming pool and mains waters (chlorinated) and from the Marathon lake (non chlorinated). **Identification:** 62 strains were isolated from chlorinated waters and 55 from non-chlorinated waters. **Typing:** Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence polymerase chain reaction (ERIC PCR). The amplification products were electrophorised in a 1.2% agarose gel. **Statistical analysis:** Visual observation and Phylip 3.6.1 Analysis Software.



Phylogenetic Dendrogram using Phylip software suite

RESULTS

The Phylip program gave 15 genotypes. 11 Eric types (E1, E2, E4, E5, E6, E9, E10, E12,E13, E14, E15) consisted only or mainly of strains isolated from one type of water source (chlorinated or not) and 4 ERIC types consisted equally of strains from chlorinated and non-chlorinated water sources. Some Eric types consisted of strains isolated from the same geographical area (E1 from the water supply network from Messinia. E4 mostly from lake Marathon) but others included strains geographically dispersed.



DISCUSSION

E14 and 15 consist of strains all isolated from chlorinated samples but from various geographical regions and E14 consists of 4 strains isolated from Evoia island and 2 from Lakonia, which are areas situated in a long distance one from the other. This fact might be an indication of distribution of this strain in more than one areas and possibly the formation of a new clone resistant to chlorine. Similar phenomena indicating the formation of clones appear in other ERIC types

To conclude the clustering the *E. coli* strains according to geographical distribution and the exposure to chlorine seems to lead to the creation of clones possibly dispersing around the country.

1. Van Belkum A., Tassios P.T, Dijkshoorn, Haeggman S., Cookson B., Fry N.K, Fussing V., Green J., Gerner-Smidt P., Brisse S. And Struelens (2007) : Guideleines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiol-