



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

“ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)”

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

**Αντοχή στα αντιβιοτικά στελεχών
Escherichia coli που απομονώνονται
από πόσιμο νερό**



ΚΑΖΑΤΖΗ ΙΩΑΝΝΑ

Επιβλέπων Καθηγητής: Σακκάς Ηρακλής, Λέκτορας Μικροβιολογίας

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
“ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)”
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

**Αντοχή στα αντιβιοτικά στελεχών
Escherichia coli που απομονώνονται
από πόσιμο νερό**



ΚΑΖΑΤΖΗ ΙΩΑΝΝΑ

Επιβλέπων Καθηγητής: Σακκάς Ηρακλής, Λέκτορας Μικροβιολογίας

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018

« Η έγκριση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32 άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

ΟΝΟΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ: Καζατζή Ιωάννα

**Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης: «Αντοχή στα αντιβιοτικά στελεχών
Escherichia coli που απομονώνονται από πόσιμο νερό»**

Ημερομηνία παρουσίασης: 18/12/2018

Επιβλέπων Καθηγητής: Σακκάς Ηρακλής, Λέκτορας Μικροβιολογίας

Εξεταστική επιτροπή:

Παπαδοπούλου Χρυσάνθη: Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα: Επίκουρος καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Σακκάς Ηρακλής, Λέκτορας Μικροβιολογίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας, του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Επιβλέποντες, τους οποίους και ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγησή τους, ήταν οι: Σακκάς Ηρακλής, Λέκτορας Μικροβιολογίας, Παπαδοπούλου Χρυσάνθη, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας και Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, Επίκουρος καθηγήτρια Μικροβιολογίας.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου, που με στήριξε και με παρότρυνε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. Αντιβιοτικά	9
1.2. Αντιμικροβιακή αντοχή	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: <i>Escherichia coli</i>	21
2.1. Περιγραφή	21
2.2. Καλλιεργητικά χαρακτηριστικά και βιοχημικές ιδιότητες	22
2.3. Αντιγονική δομή – Οροτυπία	23
2.4. Γενετική	24
2.5. Οικολογία - Παθογένεση	26
2.6. Πρόληψη-Θεραπεία	29
2.7. Αντοχή στα αντιβιοτικά	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΝΕΡΟ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ	32
3.1. Το νερό και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του	32
3.2. Μικροβιολογικοί δείκτες	36
3.3. Νομοθετικό πλαίσιο	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΔΑΤΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΚΑΙ <i>E.coli</i>	40
4.1. Γενικά	40
4.2. Πόσιμο νερό και παρουσία ανθεκτικών στελεχών <i>E. coli</i>	44
4.3. Επιδημιολογικά δεδομένα	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΕΠΙΔΗΜΙΩΝ ΑΠΟ <i>E.coli</i> ΣΕ ΠΟΣΙΜΟ ΝΕΡΟ	49
5.1. Διεθνείς αναφορές	49
5.2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση για την Ελλάδα	56
Συμπεράσματα	60
Περίληψη - Abstract	62-63
Βιβλιογραφία	64

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

_____Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται μια συνεχής αύξηση της επίπτωσης των υδατογενών λοιμώξεων, τόσο στις αναπτυσσόμενες όσο και στις αναπτυγμένες χώρες, σε πλήρη συσχέτιση με την παγκοσμιοποίηση και τις κλιματικές αλλαγές, αλλά και τα πεπαλαιωμένα δίκτυα ύδρευσης και αποχέτευσης σε πολλά αστικά και ημιαστικά κέντρα. Οι δυσκολίες πρόσβασης σε πόσιμο νερό από ένα μεγάλο μέρος του ανθρώπινου δυναμικού του πλανήτη, η συσσώρευση και η μαζική μετακίνηση προς τα αστικά κέντρα, η γήρανση του πληθυσμού και η αύξηση κατά συνέπεια των ανοσοκατεσταλμένων ασθενών, αλλά και η καλύτερη επιτήρηση και καταγραφή των επιδημιών, είναι μερικοί από τους παράγοντες που συμπορεύονται με τις επιδημικές εξάρσεις των υδατογενών λοιμώξεων. Το νερό μπορεί να μολυνθεί από πολλούς παθογόνους μικροοργανισμούς (βακτήρια, ιούς και παράσιτα), η δε μετάδοση της λοίμωξης γίνεται μέσω επαφής ή/και κατανάλωσης νερού, ή εισπνοής αερολυμάτων. Στα πλαίσια της επιδημιολογικής διερεύνησης των υδατογενών επιδημιών από πόσιμο νερό, η *Escherichia coli* αποτελεί ένα από τα συχνά βακτηριακά αίτια, που απομονώνονται από τον εργαστηριακό έλεγχο. Επιπρόσθετα, η εμφάνιση ανθεκτικών κλινικών στελεχών που παράγουν ευρέος φάσματος β-λακταμάσες αλλά και καρβαπενεμάσες, ενισχύουν τους φόβους για περαιτέρω διασπορά τους στο περιβάλλον. Η μόλυνση του περιβάλλοντος, μέσω ανεπεξέργαστων λυμάτων και της φαρμακευτικής βιομηχανίας, αυξάνει την εμφάνιση πολυανθεκτικών βακτηρίων στο περιβάλλον, καθιστώντας την αντιμικροβιακή αντοχή ως το βασικότερο πρόβλημα δημόσιας υγείας του 21^{ου} αιώνα. Στην παρούσα ανασκόπηση γίνεται αναφορά στις υδατογενείς λοιμώξεις από πόσιμο νερό που οφείλονται σε *E. coli*, στον έλεγχο ευαισθησίας των απομονωθέντων στελεχών στα αντιβιοτικά, στο ρόλο που διαμορφώνουν στην αύξηση της αντιμικροβιακής αντοχής γενικότερα, καθώς και στα επιδημιολογικά δεδομένα που αφορούν στη χώρα μας αλλά και στον παγκόσμιο χάρτη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά αποτελούν φυσικά παράγωγα μικροοργανισμών με δράση έναντι άλλων μικροοργανισμών (αντι-βιοτικά), ωστόσο περιεκτικότερος όρος συνιστά το «αντιμικροβιακό φάρμακο» που περιλαμβάνει εκτός των φυσικών, ημισυνθετικά ή συνθετικά παράγωγα (χημειοθεραπευτικά) με ανάλογη δράση. Από την πρώτη παρατήρηση ότι ορισμένα βακτήρια διαθέτουν αντιμικροβιακή δράση (Pasteur, 1877) και την ανακάλυψη της πενικιλίνης (Fleming, 1929) έως τα συγγενή παράγωγα αμπικιλίνη, αμοξυκιλίνη, βενζυλοπενικιλίνη, μεσολάβησε ένας αιώνας που ανέδειξε τις τεράστιες δυνατότητες αλλά και τους περιορισμούς της αντιμικροβιακής θεραπείας (Λεγάκης και συν, 2008). Η εισαγωγή των αντιβιοτικών στην ιατρική ανέδειξε τον τρόπο της θεραπευτικής αντιμετώπισης των μολυσματικών ασθενειών. Μεταξύ 1945 και 1972, το μέσο ανθρώπινο προσδόκιμο ζωής αυξήθηκε κατά οκτώ χρόνια, καθώς τα αντιβιοτικά άρχισαν να χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία λοιμώξεων που ήταν πιθανό να έχουν θανατηφόρο έκβαση.

Τα περισσότερα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται σήμερα παράγονται από ενώσεις που συνήθως προέρχονται από τη φύση κι είτε παράγονται από μικροοργανισμούς που δρουν ανταγωνιστικά έναντι άλλων μικροοργανισμών (Πίνακας 1), είτε συντίθενται στο εργαστήριο, αποτελώντας μια από τις πιο κοινές κατηγορίες φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην ιατρική (Baquero et al, 2008, Auerbach-Nevo et al, 2016, Walsh & Wenciewicz, 2016, Kohanski et al, 2017).

Πίνακας 1: Μικροοργανισμοί που παράγουν αντιβιοτικά (Λεγάκης, 2008)

ΜΙΚΡΟΒΙΑ	ANTIBIOTIKA
AKTINOMYKHTEΣ	<i>Streptomyces spp</i> Στρεπτομυκίνη, καναμυκίνη, τομπραμυκίνη, τετρακυκλίνη, θειεναμυκίνη, κλαβουλανικό οξύ, βανκομυκίνη, ριφαμυκίνη, στρεπτογραμίνες, αμφοτερικίνη Β, χλωραμφενικόλη, φωσφομυκίνη, λινκομυκίνη Κεφαμυκίνες, νοκαρδισίνη
	<i>Nocardia spp</i> Γενταμικίνη
	<i>Micromonospora purpurea</i> Τειχομυκίνη
	<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>
BAKTHPIA	<i>Bacillus spp</i> Πολυμυξίνη, Βακιτρακίνη, Γραμικιδίνη

	<i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Gluconobacter spp</i>	Μονοβακτάμες
ΜΥΚΗΤΕΣ	<i>Penicillium notatum</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicillin G, V
	<i>Acremonium chrysogenum</i>	Κεφαλοσπορίνη C
	<i>Penicillium spp</i>	Γκριζεοφουλβίνη

Υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί με τους οποίους τα αντιμικροβιακά εκδηλώνουν τη δράση τους. Μερικοί διακόπτουν μοναδικές μεταβολικές οδούς των μικροοργανισμών (π.χ. επίδραση σε επίπεδο αναπαραγωγής), ενώ άλλοι εμποδίζουν την κατασκευή των βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων, διακόπτουν τη μεταγραφή ή/και τη μετάφραση μικροβιακών γονιδίων ή καταστρέφουν την τριτοταγή δομή του βακτηριακού DNA (Bannister et al, 2008, Martinez, 2009). Οι διαδικασίες αυτές βοηθούν το φυσικό ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού να καταπολεμήσει τη βακτηριακή λοίμωξη. Προκειμένου να είναι χρήσιμα στη θεραπεία των λοιμώξεων του ανθρώπου, τα αντιβιοτικά πρέπει να στοχεύουν επιλεκτικά στα βακτηρίδια για την καταστροφή τους και όχι στα κύτταρα του ξενιστή. Πράγματι, τα σύγχρονα αντιβιοτικά δρουν είτε σε διεργασίες που είναι μοναδικές στα βακτηρίδια – όπως η σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων ή του φυλλικού οξέος – ή και σε διαδικασίες που είναι κοινές τόσο στα βακτήρια όσο και στα ανθρώπινα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένης της αντιγραφής πρωτεΐνης ή DNA (Yah, et al, 2007, Baquero, et al, 2008, Starr, et al, 2016).

Η πενικιλίνη, το πρώτο ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό, αποτρέπει το τελικό στάδιο σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης, με αποτέλεσμα ένα πολύ εύθραυστο κυτταρικό τοίχωμα που διασπάται, σκοτώνοντας τελικά το βακτήριο. (Baquero, et al, 2008, Walsh & Wenciewicz, 2016). Τα σουλφοναμίδια, όπως η σουλφαμεθοξαζόλη, έχουν παρόμοια δομή με το παρα-αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA), μια ένωση απαραίτητη για τη σύνθεση του φυλλικού οξέος. Η δράση τους βασίζεται στην αναστολή του PABA σε διυδροπτεροϊκό οξύ, σημαντική πρόδρομη ένωση του φυλλικού οξέος, το οποίο είναι υπόστρωμα στη σύνθεση του DNA (Spellberg, et al, 2013, Butler, et al, 2016).

Η τετρακυκλίνη, αναστέλλει επίσης την ανάπτυξη των βακτηρίων σταματώντας τη σύνθεση πρωτεϊνών. Η τετρακυκλίνη μπορεί να διεισδύσει στις

μεμβράνες των βακτηρίων και να συσσωρευτεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια δεσμεύεται σε μια μοναδική θέση στο ριβόσωμα, τη ριβοσωματική υπομονάδα 30S, και αποκλείει μια αλληλεπίδραση RNA, η οποία κλείνει την αλυσίδα πρωτεϊνών που επιμηκύνεται. Σε ανθρώπινα κύτταρα, ωστόσο, η τετρακυκλίνη δεν συσσωρεύεται σε επαρκείς συγκεντρώσεις για να σταματήσει την πρωτεϊνική σύνθεση (Kümmerer, 2009).

Αντίστοιχα, οι κινολόνες δρουν σε επίπεδο σύνθεσης του DNA τροποποιώντας το ένζυμο DNA-γυράση, οι ριφαμυκίνες δρουν αναστέλλοντας τη DNA-εξαρτώμενη πολυμεράση του RNA, εμποδίζοντας τη μεταγραφή του γενετικού κώδικα σε mRNA, ενώ οι μακρολίδες αναστέλλουν την RNAεξαρτώμενη πρωτεϊνοσύνθεση στο 50S ριβόσωμα (Yun-Jian & Dong-Ke, 2008) (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Μηχανισμοί δράσης και αντοχής αντιβιοτικών (Λεγάκης, 2008)

Αντιβιοτικά	Μηχανισμός δράσης	Μηχανισμοί αντοχής
β-Λακταμικά	Σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος	B-λακταμάσες, Τροποποίηση PBPs, ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα, ενεργητική απέκκριση
Αμινογλυκοσίδες	Πρωτεϊνική σύνθεση	Τροποποιητικά ένζυμα, ριβοσωμιακές αλλαγές, ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα, ενεργητική απέκκριση
Γλυκοπεπτίδια	Σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος	Τροποποίηση στόχου
Κινολόνες	Σύνθεση DNA	Τροποποίηση DNA γυράσης, τοπ IV, ενεργητική απέκκριση
Μακρολίδες	Πρωτεϊνική σύνθεση	Τροποποίηση στόχου, ενεργητική απέκκριση
Οξάζολιδινόνες	Πρωτεϊνική σύνθεση	Τροποποίηση στόχου, ενεργητική απέκκριση
Πολυμυξίνες	Κυτταρική μεμβράνη	Τροποποιήσεις λιποπολυσακχαριτών
ΡΙφαμυκίνες	Σύνθεση RNA	Τροποποίηση β-υπομ RNA πολυμεράσης, ενεργητική απέκκριση
Σουλφοναμίδες	Μεταβολισμός φυλλικού	Τροποποίηση στόχου, ενεργητική απέκκριση, παράκαμψη στόχου
Στρεπτογραμίνες	Πρωτεϊνική σύνθεση	Τροποποίηση στόχου
Τετρακυκλίνες	Πρωτεϊνική σύνθεση	Τροποποίηση στόχου, ενεργητική απέκκριση
Τριμεθοπρίμη	Μεταβολισμός φυλλικού	Ενεργητική απέκκριση, παράκαμψη στόχου
Χλωραμφενικόλη	Πρωτεϊνική σύνθεση	Ενεργητική απέκκριση, τροποποιητικά ένζυμα (ακετυλοτρανσφεράση)

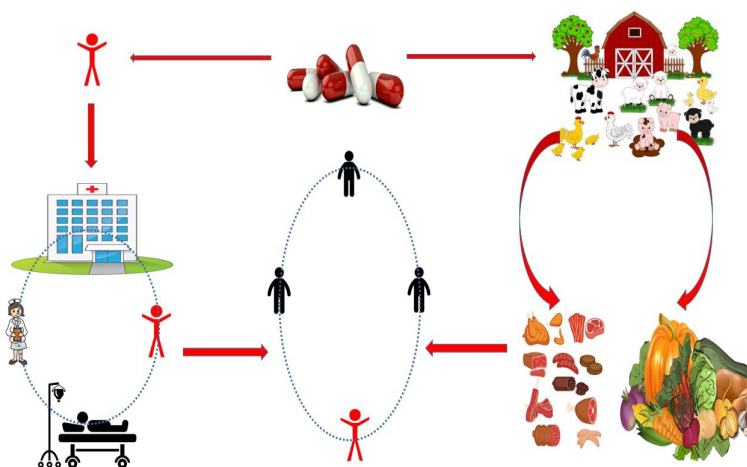
1.2. Αντιμικροβιακή αντοχή

Όταν τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται καθ' υπερβολή ή λανθασμένα, υπάρχει ο κίνδυνος τα βακτήρια να γίνουν ανθεκτικά, καθώς το αντιβιοτικό γίνεται λιγότερο αποτελεσματικό έναντι των συγκεκριμένων στελεχών (Aminov, 2009, Butler, et al,

2016). Η αντιμικροβιακή αντοχή (AMA), προϊόν φυσικής επιλογής, αποτελεί το βασικότερο πρόβλημα δημόσιας υγείας του 21^{ου} αιώνα η οποία συνδέεται με παράγοντες που σχετίζονται με την υπερβολική ή κακή χρήση των αντιμικροβιακών στην Ιατρική και Κτηνιατρική πράξη, καθώς και με την περιβαλλοντική ρύπανση. Η απομόνωση ιδιαίτερα των πολυανθεκτικών βακτηριακών παθογόνων (ESKAPE),

- *Enterococcus faecium*,
- *Staphylococcus aureus*,
- *Klebsiella pneumoniae*,
- *Acinetobacter baumannii*,
- *Pseudomonas aeruginosa*,
- *Enterobacter species*,

που αποτελούν παγκοσμίως τα βασικά αίτια νοσοκομειακών λοιμώξεων με περιορισμένες ή και μηδαμινές επιλογές αντιμικροβιακής θεραπείας, είναι μείζονος σημασίας (Σχήμα 1).



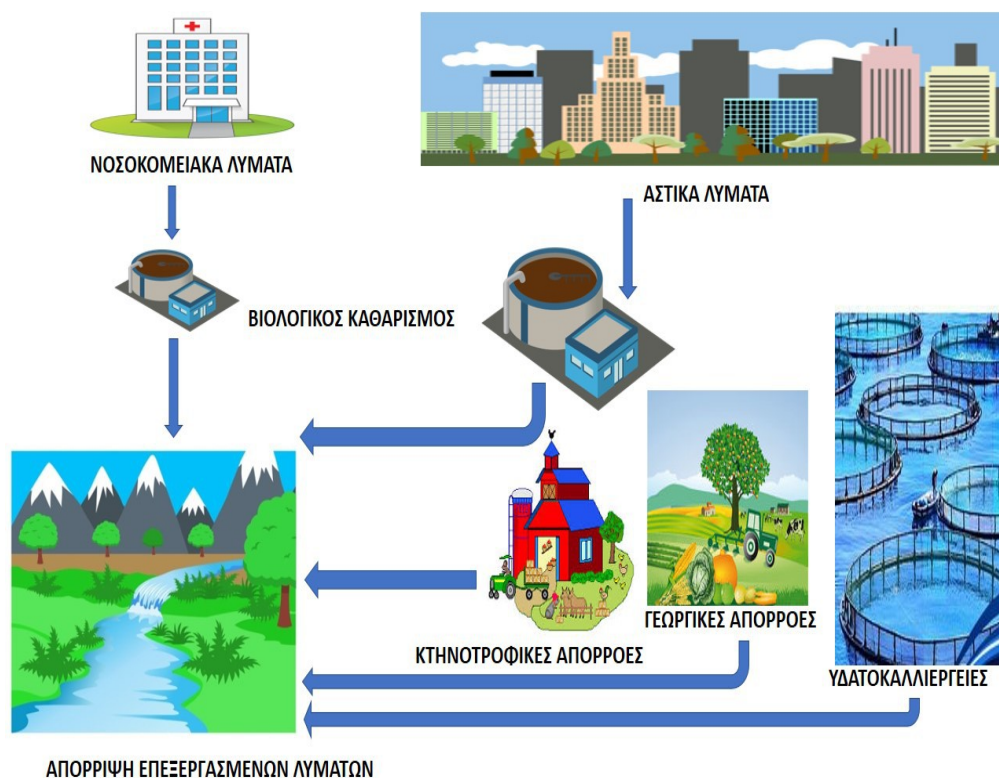
Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση μετάδοσης αντιμικροβιακής αντοχής.

Το 1952 αποδείχθηκε ότι υπήρχαν βακτήρια ανθεκτικά στην πενικιλίνη πριν από την εφαρμογή της στη θεραπευτική και επίσης προϋπάρχουσα βακτηριακή αντοχή στη στρεπτομυκίνη. Το 1962, η παρουσία πενικιλινάσης ανιχνεύθηκε σε αδρανή ενδοσπόρια του *Bacillus licheniformis*. Ωστόσο, δεν υπάρχουν ισχυρές αποδείξεις σχετικά με τους παράγοντες ή τις οδούς που οδηγούν στην ανάδυση και

μετάδοση ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών στους ανθρώπους μέσω της αλυσίδας «παραγωγικά ζώα – τρόφιμα - περιβάλλον». Πιθανολογείται ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες ίσως να εμπλέκονται στη διατήρηση ή ανάμιξη γενετικών χαρακτηριστικών (π.χ. γονιδίων αντοχής) και διαβίβασή τους από ανθεκτικά βακτήρια σε μη ανθεκτικά βακτήρια της κοινότητας, οδηγώντας έτσι στην εμφάνιση AMA.

Η AMA είναι ευρέως διαδεδομένη στα θαλάσσια σπονδυλωτά που μπορεί να αποτελούν σημαντικές «δεξαμενές» ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων στο θαλάσσιο περιβάλλον (Wilson, 2013). Επίσης τα παραγωγικά ζώα μπορεί να λειτουργούν ως δεξαμενή AMA ως απόρροια γενετικής επιλογής λόγω της πίεσης που ασκείται στο μικροβίωμά τους εξαιτίας της υπερβολικής χρήσης αντιβιοτικών στην εντατική κτηνοτροφία. Πρέπει να τονιστεί ότι τα αντιμικροβιακά φάρμακα που χορηγούνται στα ζώα εντατικής εκτροφής, είναι είτε παρόμοια είτε ανήκουν στις ίδιες κατηγορίες αντιμικροβιακών ουσιών με αυτές που χρησιμοποιούνται στην ιατρική θεραπευτική πράξη. Συνεπώς για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της AMA είναι πολύ σημαντικό να εντοπιστούν οι παράγοντες και οι μηχανισμοί που το προκαλούν (Yah et al, 2007, Sana & Monack, 2016, Davis et al, 2017) (Σχήμα 2).

Η μόλυνση του περιβάλλοντος, ιδίως μέσω των σημείων ενδιαφέροντος, όπως τα νοσοκομειακά και τα αστικά λύματα που δεν υποβάλλονται σε επεξεργασία, είναι ένα αυξανόμενο και σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας. Τα αντιβιοτικά ρυπαίνουν το περιβάλλον με την εισαγωγή τους μέσω των ανθρώπινων (φάρμακα, γεωργία), των ζωικών και των φαρμακευτικών αποβλήτων – δηλαδή της φαρμακευτικής βιομηχανίας. Μαζί με τα απόβλητα αντιβιοτικών, περιλαμβάνονται και ανθεκτικά βακτήρια, τα οποία εισάγονται έτσι στο ευρύτερο περιβάλλον (Wilson, 2013).



Σχήμα 2: Διασπορά της αντιμικροβιακής αντοχής στο περιβάλλον.

Οι εντερόκοκκοι παρουσιάζουν εγγενή και επίκτητη αντοχή σε διάφορα αντιβιοτικά, ιδιαίτερα στη βανκομυκίνη (Economou et al, 2017). Οι ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη εντερόκοκκοι (VRE) που μεταφέρουν γονίδια ανθεκτικότητας (VanA, VanB) σε ευαίσθητα σε βανκομυκίνη στελέχη έχουν πλέον παγκόσμια διασπορά, ενώ σε αρκετές χώρες της ΕΕ, συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας, τα ποσοστά τους υπερβαίνουν το 10% (Sidler et al, 2014, Falcone et al, 2015).

Η *K. pneumoniae* εμφανίζει υψηλά ποσοστά αντοχής στις καρβαπενέμες, που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη θεραπεία λοιμώξεων από πολυανθεκτικά Gram αρνητικά βακτήρια (Findlay et al, 2017). Το αυξανόμενο ποσοστό της αντοχής των κλεμπσιελλών στις καρβαπενέμες αποτελεί σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας στις χώρες της ΕΕ, ιδιαίτερα στην Ελλάδα, με ποσοστό που ανέρχεται στο 60,5% των κλινικών στελεχών (2012) (ECDC, 2015). Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για την αντοχή στελεχών *K. pneumoniae* από παραγωγικά ζώα ή το περιβάλλον, καθώς και για τους μηχανισμούς μετάδοσης της στον άνθρωπο (Holt et al, 2015, Runcharoen et al, 2017).

Το *Acinetobacter baumannii* και η *Pseudomonas aeruginosa* απομονώνονται ολοένα και συχνότερα στις νοσοκομειακές λοιμώξεις με αυξημένα ποσοστά αντοχής

στα διαθέσιμα θεραπευτικά σχήματα (Howard et al, 2012). Τα κλινικά στελέχη *Enterobacter* spp. έχουν επίσης αναπτύξει επαρκείς μηχανισμούς αντίστασης στα αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων των ευρέως φάσματος β-λακταμασών (ESBL) και των καρβαπενεμασών (Esposito & De Simone, 2017).

Για το *Campylobacter* spp., που αποτελεί επί του παρόντος την κύρια αιτία διάρροιας στους ανθρώπους, με τα πουλερικά να θεωρούνται η κύρια δεξαμενή (EFSA, 2016), δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία σε ότι αφορά την συσχέτισή του με περιβαλλοντικούς παράγοντες. Στην Ελλάδα, στελέχη *C. jejuni* που απομονώθηκαν από κοτόπουλα παρουσιάζουν υψηλή αντοχή στη σιπροφλοξασίνη, το ναλιδιξικό οξύ και τις τετρακυκλίνες (Economou & Gousia, 2015).

Ανθεκτικά στελέχη εντεροβακτηριακών έχουν απομονωθεί από ανθρώπους και παραγωγικά ζώα, αλλά η δυνατότητα μετάδοσης αυτών των στελεχών και / ή των γονιδίων ανθεκτικότητας μεταξύ ζώων, ανθρώπων και περιβάλλοντος δεν έχει διευκρινισθεί.

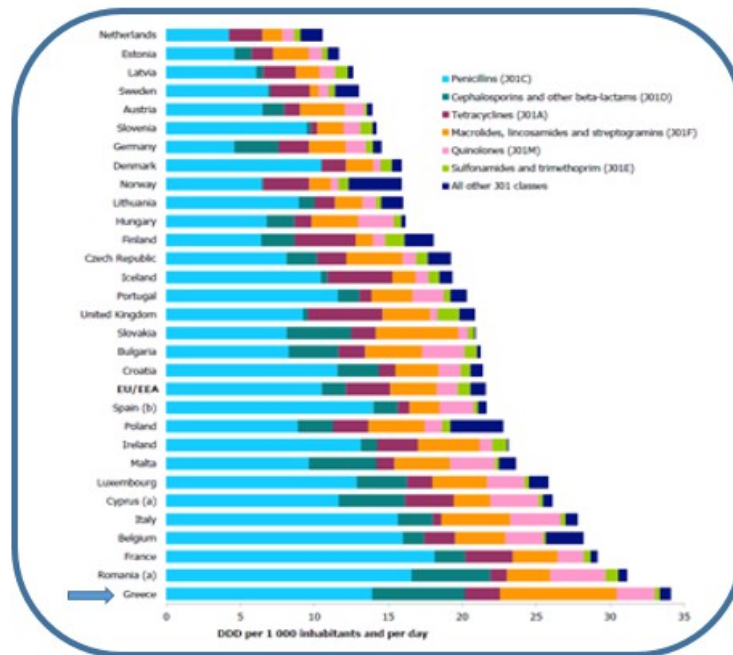
Τα ποσοστά των μεθικιλίνη ανθεκτικών σταφυλοκόκκων (MRSA) στην ΕΕ (συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας) εκτιμώνται πάνω από 25% στους ανθρώπους. Ο MRSA είναι ευρέως διαδεδομένος στα πουλερικά και είναι το μοναδικό παθογόνο για το οποίο έχει αποδειχθεί η μετάδοση από ζώα στον άνθρωπο (Economou & Gousia, 2015), αλλά τα δεδομένα σχετικά με τον επιπολασμό του MRSA στα εκτρεφόμενα ζώα και στο περιβάλλον στην Ελλάδα είναι σπάνια.

Η υπερβολική χρήση των αντιμικροβιακών φαρμάκων παγκοσμίως συμβάλλει ολοένα και περισσότερο στην αύξηση του αριθμού των βακτηριακών λοιμώξεων που γίνονται ανθεκτικές σε αυτά. Οι λόγοι για την ευρεία χρήση των αντιβιοτικών περιλαμβάνουν:

- Την αυξανόμενη παγκόσμια διαθεσιμότητα με την πάροδο του χρόνου από τη δεκαετία του 1950
- Την ανεξέλεγκτη πώληση σε πολλές χώρες χαμηλού ή μέσου βιοτικού επιπέδου, όπου μπορούν να ληφθούν χωρίς ιατρική συνταγή, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε άσκοπη χρήση αντιβιοτικών (Yang & Tao, 2009), κάτι που είχε προβλεφθεί νωρίτερα από τον Φλέμινγκ, ο οποίος είχε αναφέρει ότι:

«Μπορεί να έρθει η ώρα που η πενικιλίνη θα μπορεί να αγοραστεί από οποιονδήποτε στα καταστήματα» (Spellberg, et al, 2013).

Σύμφωνα με τα Εθνικά Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών αποτελεί ένα ιδιαίτερο πρόβλημα στη Νοτιοανατολική Ευρώπη (Chan, et al, 2012) (Σχήμα 3).



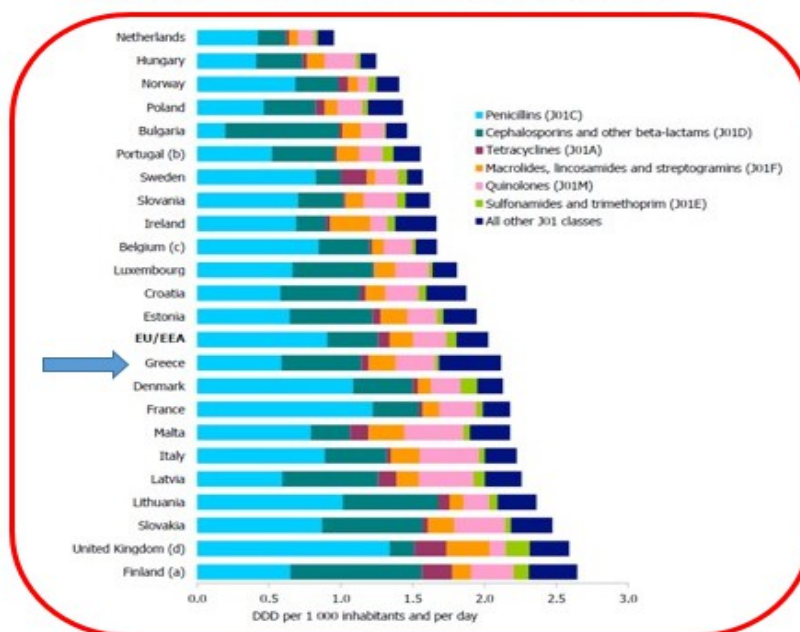
Σχήμα 3: Κατανάλωση αντιβιοτικών στους ασθενείς κοινότητας, στις ευρωπαϊκές χώρες (ECDC, 2015).

Αντίστοιχα, σύμφωνα με το ECDC η AMA εξακολουθεί να αποτελεί σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως, ενώ κάθε χρόνο στην Ευρωπαϊκή Ένωση πεθαίνουν 25.000 άνθρωποι από βακτηριακές λοιμώξεις με πολυανθεκτικά στελέχη στα αντιβιοτικά (ECDC, 2015). Στις Ηνωμένες Πολιτείες, τουλάχιστον 2 εκατομμύρια άνθρωποι μολύνονται από βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά και τουλάχιστον 23.000 άνθρωποι πεθαίνουν κάθε χρόνο ως άμεσο αποτέλεσμα αυτών των λοιμώξεων (WHO, 2014) (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Εκτίμηση των άμεσων επιπτώσεων της AMA σε διεθνές επίπεδο (WHO 2014).

	Ευρωπαϊκή Ένωση πληθυσμός 500εκ	ΗΠΑ πληθυσμός 300εκ	Ταϊλάνδη πληθυσμός 70εκ
Θάνατοι	25.000	>23.000	>38.000
Νοσηλεία	2,5 εκ. επιπλέον ημέρες νοσηλείας	>2 εκ ημέρες νοσηλείας	>3,2 εκ ημέρες νοσηλείας
Συνολικό κοινωνικό κόστος	€1.5 δισ ετησίως	> \$20 δισ άμεσο κόστος	US\$ 84.6–202.8 εκ. άμεσο κόστος
		> \$35 δισ έμμεσο κόστος	>US\$1.3 δισ έμμεσο κόστος

Τα νέα δεδομένα του ECDC δείχνουν ότι τα τελευταία χρόνια παρατηρείται σημαντική αύξηση της αντοχής, ειδικά νοσοκομειακών στελεχών *E. coli* και *K. pneumoniae* σε συνδυαστικά σχήματα αντιβιοτικών σε πάνω από το ένα τρίτο των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ενώ η κατανάλωση καρβαπενεμών, μιας μεγάλης κατηγορίας αντιβιοτικών τελευταίας γραμμής, αυξήθηκε σημαντικά από το 2007 έως το 2010 (Martinez, 2009, ECDC, 2015) (Σχήμα 4).



Σχήμα 4: Νοσοκομειακή κατανάλωση αντιβιοτικών στις ευρωπαϊκές χώρες για το 2014 (ECDC, 2015).

Σε μια πολυκεντρική μελέτη, στο 36% των ασθενών με ιογενή λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος χορηγήθηκαν αντιβιοτικά, αυξάνοντας παράλληλα την επίπτωση δευτερογενών βακτηριακών επιπλοκών (Yah, et al, 2007). Περίπου το ένα τρίτο των συνταγών αντιβιοτικών που χορηγήθηκαν σε εξωτερικούς ασθενείς στις Ηνωμένες Πολιτείες δεν ήταν κατάλληλες, για το 2010 και το 2011. Οι γιατροί στις Η.Π.Α. χορήγησαν 506 ετήσιες συνταγές αντιβιοτικών για κάθε 1.000 άτομα, και μόνο για τα 353 ήταν ιατρικά αναγκαίες (Yang & Tao, 2009).

Η Ολλανδία έχει το χαμηλότερο ποσοστό συνταγογράφησης αντιβιοτικών στον ΟΟΣΑ, με ρυθμό 11,4 καθορισμένων ημερησίων πράξεων (Κ.Η.Π) ανά 1.000 άτομα την ημέρα το 2011. Η Γερμανία και η Σουηδία έχουν επίσης χαμηλά ποσοστά συνταγογράφησης, ενώ το ποσοστό της Σουηδίας μειώνεται από το 2007. Αντιθέτως, η Ελλάδα, η Γαλλία και το Βέλγιο έχουν υψηλά ποσοστά συνταγογράφησης άνω των 28 Κ.Η.Π.

Τα αντιβιοτικά πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο όταν απαιτείται, όπως προδιαγράφεται από τους επαγγελματίες υγείας. Ο ιατρός που συνταγογραφεί φάρμακα, θα πρέπει να τηρεί πιστά τα πέντε δικαιώματα χορήγησης φαρμάκων: τον κατάλληλο ασθενή, το σωστό φάρμακο, τη σωστή δόση, τη σωστή οδό και τον σωστό χρόνο. Τα αντιβιοτικά ευρέος φάσματος θα πρέπει να αποφεύγονται όταν είναι εφικτό, καθώς η στόχευση με αποτελεσματικό και ακριβή τρόπο συγκεκριμένων μικροοργανισμών είναι λιγότερο πιθανό να δημιουργήσει αντοχή. Για τους ασθενείς που λαμβάνουν αντιβιοτικά στο σπίτι, η εκπαίδευση σχετικά με τη σωστή χρήση είναι απαραίτητη. Οι πάροχοι υγειονομικής περίθαλψης μπορούν να ελαχιστοποιήσουν την εξάπλωση των ανθεκτικών λοιμώξεων με τη χρήση κατάλληλης υγιεινής εντός και εκτός νοσοκομειακού περιβάλλοντος. Σήμερα, τα αντιβιοτικά αυξάνουν την επιλεκτική πίεση στους βακτηριδιακούς πληθυσμούς, προκαλώντας τον θάνατο ευπαθών βακτηρίων. Αυτό αυξάνει το ποσοστό των ανθεκτικών βακτηριδίων που συνεχίζουν να αναπτύσσονται. Με την αντίσταση στα αντιβιοτικά να γίνεται ολοένα και συχνότερη, υπάρχει μεγαλύτερη ανάγκη για εναλλακτικές θεραπείες.

Αναζητούνται νέες θεραπείες αντιβιοτικών, αν και η νέα ανάπτυξη φαρμάκων γίνεται όλο και πιο σπάνια (Baquero, et al, 2008).

Σύμφωνα με έκθεση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ) που δημοσιεύθηκε τον Απρίλιο του 2014, αυτή η σοβαρή απειλή δεν είναι πλέον προβλέψιμη για το μέλλον. Οι αυξανόμενες δημόσιες προσκλήσεις για παγκόσμια συλλογική δράση για την αντιμετώπιση της απειλής περιλαμβάνουν προτάσεις για διεθνείς συνθήκες για την AMA. Η παγκόσμια αντοχή στα αντιβιοτικά δεν έχει χαρτογραφηθεί πλήρως, αλλά οι φτωχότερες χώρες με αδύναμα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης επηρεάζονται περισσότερο. Υπάρχουν πολλαπλά εθνικά και διεθνή προγράμματα επιτήρησης πολυανθεκτικών βακτηρίων όπως οι MRSA, οι ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη *S. aureus* (VRSA), οι VRE, τα εντεροβακτηριακά που παράγουν ESBL και καρβαπενεμάσες και τα πολυανθεκτικά αζυμωτικά *P. aeruginosa* και *A. baumannii* (Baquero, et al, 2008).

Τα τελευταία χρόνια, οι ομάδες αντιμικροβιακής διαχείρισης στα νοσοκομεία ενθάρρυναν τη βέλτιστη χρήση των αντιμικροβιακών ουσιών. Οι στόχοι της αντιμικροβιακής διαχείρισης είναι να βοηθήσουν τους επαγγελματίες να επιλέξουν το σωστό φάρμακο στη σωστή δοσολογία και διάρκεια της θεραπείας, αποτρέποντας παράλληλα την κακή χρήση και ελαχιστοποιώντας την ανάπτυξη αντοχής. Λόγω του όγκου της περίθαλψης που παρέχεται στην πρωτοβάθμια περίθαλψη (γενική πρακτική), οι πρόσφατες στρατηγικές επικεντρώθηκαν στη μείωση της περιττής συνταγογράφησης αντιβιοτικών στις δομές της. Οι απλές παρεμβάσεις, όπως οι γραπτές πληροφορίες που εξηγούν τη μη αναγκαιότητα των αντιβιοτικών για κοινές λοιμώξεις όπως οι λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, έχουν αποδειχθεί ότι μειώνουν τη συνταγογράφηση αντιβιοτικών (Zhang, et al, 2009).

Έχουν αυξηθεί επίσης οι δημόσιες προσκλήσεις και η παγκόσμια συλλογική δράση για την αντιμετώπιση της απειλής, συμπεριλαμβανομένης της πρότασης για μια διεθνή συνθήκη για την AMA. Χρειάζονται ακόμη περισσότερες λεπτομέρειες και προσοχή προκειμένου να αναγνωριστούν και να μετρηθούν οι τάσεις της ανθεκτικότητας σε διεθνές επίπεδο. Η ιδέα ενός παγκόσμιου συστήματος παρακολούθησης έχει προταθεί αλλά η υλοποίησή της δεν είναι ακόμη εφαρμόσιμη. Ένα τέτοιο σύστημα θα παρέχει πληροφορίες για περιοχές υψηλής ανθεκτικότητας καθώς και πληροφορίες απαραίτητες για την αξιολόγηση των προγραμμάτων και

άλλες αλλαγές που γίνονται για την καταπολέμηση ή αντιστροφή της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.

Στις 27 Μαρτίου του 2015, οι ΗΠΑ δημοσίευσαν ένα περιεκτικό σχέδιο για την αντιμετώπιση της AMA. Το σχέδιο αυτό περιγράφει τα μέτρα που έχει λάβει η κυβέρνηση για τα επόμενα πέντε χρόνια που απαιτούνται για την πρόληψη και τον περιορισμό της AMA, ώστε να διατηρηθεί η αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών που κυκλοφορούν ήδη στην αγορά και να βοηθήσει στην ανάπτυξη μελλοντικών διαγνωστικών μέσων, αντιβιοτικών και εμβολίων (Butler, et al, 2016).

Ο Π.Ο.Υ στα τέλη του 2015 καθιέρωσε την πρώτη «παγκόσμια εβδομάδα ευαισθητοποίησης για την ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών». Σύμφωνα με την έκθεση, που εκδόθηκε τον Ιανουάριο του 2016, οι πέντε σημαντικές στρατηγικές που απαιτούνται για την ελαχιστοποίηση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά είναι οι εξής:

- Ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών για τη διατήρηση της αποτελεσματικότητας των υφιστάμενων και μελλοντικών αντιβιοτικών
- Ορθολογική συνταγογράφηση
- Ανάπτυξη και έγκριση δέκα νέων αντιβιοτικών μέχρι το 2020
- Ανάπτυξη νέων μοριακών τεχνικών για την ανίχνευση γονιδίων αντοχής
- Οικονομική ενίσχυση και θέσπιση προγραμμάτων επιτήρησης της AMA (Starr, et al, 2016).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: *Escherichia coli*

2.1. Περιγραφή

Η *Escherichia coli* είναι ένα αρνητικό κατά Gram, προαιρετικά αναερόβιο βακτηρίδιο, του γένους *Escherichia*, της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών (Enterobacteriaceae), το οποίο αποτελεί μέρος της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου των θηλαστικών. Είναι περίτριχος και κατά πλειοψηφία κινούμενος μικροοργανισμός, μήκους περίπου 2,0 μm και διαμέτρου 0,25-1,0 μm , με κυτταρικό όγκο 0,6-0,7 μm^3 , και ικανότητα παραγωγής προσκολλητινών και συζευκτικών ινιδίων, όπως και πολλά άλλα μέλη της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών (Εικόνα 1). Η κλασσική δομή του κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηριδίων, συμπληρώνεται με την παραγωγή ενός λεπτού ελύτρου στα κινούμενα στελέχη, που στα ακίνητα διαφοροποιείται σε παχύτερη κάψα (Tourret, et al, 2016).



Εικόνα 1: *Escherichia coli* (www.cdc.gov/ecoli/index.html)

Τα περισσότερα στελέχη της *E. coli* είναι δυνητικά ή ευκαιριακά παθογόνοι μικροοργανισμοί, αλλά ορισμένοι ορότυποι μπορούν να αποτελέσουν σημαντικούς παράγοντες λοιμογονικότητας προκαλώντας εντερικές ή εξωεντερικές λοιμώξεις. Τα μη παθογόνα στελέχη, αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου και μπορούν να ωφελήσουν τους ξενιστές τους με την παραγωγή βιταμίνης K και να

αποτρέψουν τον αποικισμό του εντέρου με παθογόνα βακτήρια, δημιουργώντας έτσι μια συμβιωτική σχέση (Tourret, et al, 2016).

Τα στελέχη *E. coli* αποτελούν περίπου το 0,1% της χλωρίδας του εντέρου και η μετάδοσή τους μέσω της εντεροστοματικής οδού, αποτελεί την κύρια οδό μέσω της οποίας τα παθογόνα στελέχη προκαλούν νόσο. Έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν στο εξωτερικό περιβάλλον για βραχύ χρονικό διάστημα έως και παρατεταμένες περιόδους, γεγονός που τα καθιστά μικροβιακούς δείκτες για τον έλεγχο των περιβαλλοντικών δειγμάτων που μολύνονται από κόπρανα (Payne, et al, 2016).

2.2. Καλλιεργητικά χαρακτηριστικά και βιοχημικές ιδιότητες

Το βακτήριο μπορεί να καλλιεργηθεί εύκολα στο εργαστήριο, ενώ παράλληλα μελέτες έξι και πλέον δεκαετιών το καθιστούν τον ευρύτερα μελετημένο μικροοργανισμό προκαρυωτικού μοντέλου, με εφαρμογές στους τομείς της βιοτεχνολογίας και της εφαρμοσμένης μικροβιολογίας καθώς και σε ερευνητικές μελέτες με ανασυνδυασμένο DNA. Η βέλτιστη ανάπτυξη της *E. coli* παρατηρείται στους 37°C, αλλά ορισμένα εργαστηριακά στελέχη μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε θερμοκρασίες μέχρι τους 49°C. Αναπτύσσεται σε όλα τα κοινά θρεπτικά υποστρώματα και σε αρκετά εκλεκτικά, βασικά συστατικά των οποίων αποτελούν μια ποικιλία θρεπτικών συστατικών. Στο MacConkey άγαρ που περιέχει πεπτόνη, λακτόζη, χολικά άλατα, χλωριούχο νάτριο, ουδέτερο ερυθρό και κρυσταλλικό ιώδες σχηματίζει ερυθρές αποικίες από τη ζύμωση της λακτόζης με ταυτόχρονη αλλαγή του χρώματος του δείκτη (ουδέτερου ερυθρού) (Αρσένη, 1994) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: MacConkey agar

Επιπλέον ο ορότυπος *E. coli* O157:H7, αναπτύσσεται σε MacConkey άγαρ με σορβιτόλη, δίνοντας άχρωμες σορβιτόλη-αρνητικές αποικίες, αφού σε αντίθεση με τους υπόλοιπους οροτύπους δεν ζυμώνει τη σορβιτόλη. Η ανάπτυξη της *E. coli* επιτυγχάνεται τόσο αεροβίως, όσο και αναεροβίως, γεγονός που επιτρέπει την επιβίωσή τους σε περιβάλλοντα με χαμηλή περιεκτικότητα έως και απουσία οξυγόνου, π.χ υδάτινα οικοσυστήματα (Kamarthapu, et al, 2016). Μια σειρά βιοχημικών δοκιμασιών, κάνουν δυνατή τη διάκριση του είδους από άλλα εντεροβακτηριακά, καθώς και βιοτύπων του ίδιου είδους (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Κύριες βιοχημικές ιδιότητες *E. coli*.

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ
ΙΝΔΟΛΗ	(+)
ΚΑΤΑΛΑΣΗ	(+)
ΓΛΥΚΟΖΗ-ΑΕΡΙΟ	(+)
ΛΑΚΤΟΖΗ	(+)
M.R	(+)
V.P	(-)
PPA	(-)

ONPG	(+)
ΛΥΣΙΝΗ	(+)
ΚΙΤΡΙΚΑ	(-)

2.3. Αντιγονική δομή – Οροτυπία

Ένα κοινό σύστημα διάκρισης της *E. coli* που δεν προκύπτει από την εξελικτική συγγένεια, βασίζεται στην οροτυπία, με χαρακτηρισμό των τριών κυρίαρχων επιφανειακών αντιγόνων:

- αντιγόνα Ο-σωματικά
- αντιγόνα Η-βλεφαριδικά
- αντιγόνα Κ-ελύτρου ή κάψας

Επί του παρόντος, περίπου 190 οροομάδες είναι γνωστές (Deatherage, et al, 2017) (Πίνακας 5). Η λοίμωξη με πολλά από αυτά τα στελέχη συνήθως εκδηλώνεται κλινικά με βασικό σύμπτωμα τη διάρροια που συχνά είναι αυτοπεριοριζόμενη στους υγιείς ενήλικες, αλλά είναι συχνά θανατηφόρα για τα παιδιά στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Τα πιο λοιμογόνα στελέχη, όπως η *E. coli* O157: H7, προκαλούν σοβαρή ασθένεια ή θάνατο στους ηλικιωμένους, τους πολύ νέους ή τα άτομα με ανοσοκαταστολή (Potrykus & Cashel, 2016).

Πίνακας 5: Ενδεικτικοί ορότυποι παθογενετικών ομάδων *E. coli*: Εντεροτοξινογόνος (ETEC), Εντεροπαθογόνος (EPEC), Εντεροδιαιδδυτική (EIEC), Εντεροαιμορραγική (EHEC) ή Βεροτοξινογόνος (VTEC), Εντεροαθροιστική (EAggEC) (Greenwood, et al, 2011)

ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ ΟΡΟΤΥΠΟΙ

ETEC	O6:H16, O8:H9, O8:H2, O11:H27, O85:H7, O148:H28, O149:H4, O166:H27
EPEC	O26, O55, O86, O111, O26:H11, O86:H2, O142:H6, O158:H23, O114, O125, O126, O127, O128, O142
EIEC	O75, O115, O148, O153, O159, O167, O55:H7
VTEC	O157:H7, O163, O115, O118, O121, O26, O28ac,

Οι διαφορετικοί ορότυποι της *E. coli* εμφανίζουν συχνά εκλεκτικότητα έναντι των ξενιστών τους, καθιστώντας δυνατό τον προσδιορισμό της προέλευσης της πηγής μόλυνσης στα περιβαλλοντικά δείγματα και ειδικότερα στα υδάτινα οικοσυστήματα (McGann, et al, 2016).

2.4. Γενετική

Η *E. coli* περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό στελεχών που παρουσιάζουν πολύ υψηλό βαθμό γενετικής και φαινοτυπικής ποικιλομορφίας. Η αλληλούχιση γονιδιώματος ενός μεγάλου αριθμού απομονωθέντων στελεχών της *E. coli*, έχει κατά καιρούς απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα για την αναγκαιότητα μιας νέας συστηματικής ταξινόμησης, αφού μόλις το 20% των γονιδίων σε ένα τυπικό γονιδίωμα *E. coli* είναι ίδιο μεταξύ όλων των στελεχών (Norville, et al, 2016).

Αυτές οι διαφορές είναι συχνά ανιχνεύσιμες μόνο σε μοριακό επίπεδο, ωστόσο μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στη φυσιολογία ή τον κύκλο ζωής του βακτηρίου. Για παράδειγμα, ένα στέλεχος μπορεί να αποκτήσει παθογόνο ικανότητα, ικανότητα να χρησιμοποιεί μια μοναδική πηγή άνθρακα, ικανότητα να αναλαμβάνει μια συγκεκριμένη οικολογική θέση ή ικανότητα να αντιστέκεται σε αντιμικροβιακούς παράγοντες (McGann, et al, 2016).

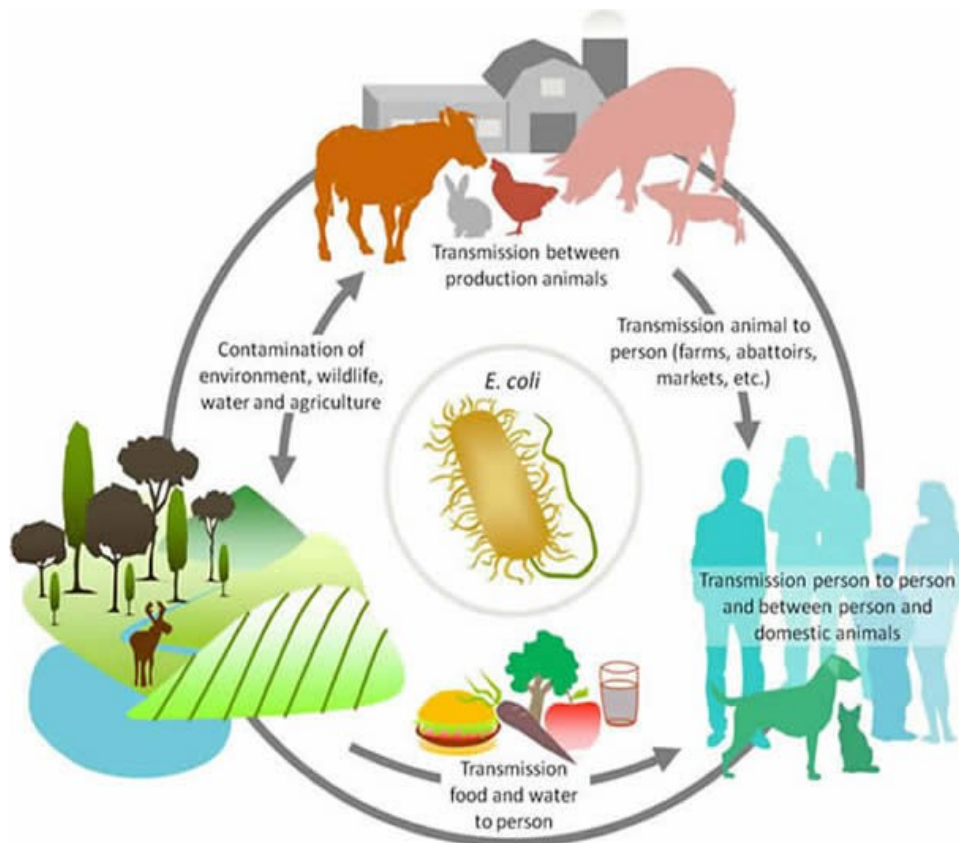
Όπως προκύπτει από τη χρήση αλληλουχιών ολόκληρου γονιδιώματος βάσει της οποίας έχουν ταυτοποιηθεί πέντε υποείδη της *E. coli* (Potrykus & Cashel, 2016), η σχέση μεταξύ της φυλογενετικής συγγένειας και της παθογόνου δράσης κάθε οροτύπου είναι δυσδιάκριτη. Η πρώτη πλήρης αλληλουχία DNA ενός γονιδιώματος *E. coli* δημοσιεύθηκε το 1997. Βρέθηκε τότε, ότι ήταν ένα κυκλικό μόριο DNA μήκους 4,6 εκατομμυρίων ζευγών βάσεων, που περιείχε 4288 κωδικοποιημένα γονίδια πρωτεϊνών (οργανωμένα σε 2584 οπερόνια), επτά ριβοσωμικά οπερόνια RNA (rRNA) και 86 γονίδια μεταφοράς RNA (tRNA). Παρά το γεγονός ότι αποτέλεσαν αντικείμενο εντατικής γενετικής ανάλυσης για περίπου 40 χρόνια, πολλά από αυτά τα γονίδια ήταν προηγουμένως άγνωστα. Η πυκνότητα κωδικοποίησης βρέθηκε να είναι πολύ υψηλή, με την μέση απόσταση μεταξύ γονιδίων να είναι μόνο 118 ζευγών

βάσεων. Το γονιδίωμα παρατηρήθηκε ότι περιείχε σημαντικό αριθμό μεταλλασσόμενων γενετικών στοιχείων, επαναλαμβανόμενων στοιχείων, κρυφούς προφάγους και υπολείμματα βακτηριοφάγων (Watson, et al, 2016).

Σήμερα, είναι διαθέσιμες αρκετές εκατοντάδες πλήρεις αλληλουχίες γονιδιώματος *E. coli*. Η σύγκριση αυτών των αλληλουχιών παρουσιάζει αξιοσημείωτη ποικιλομορφία. Μόνο περίπου το 20% του κάθε γονιδιώματος αντιπροσωπεύει αλληλουχίες που υπάρχουν σε κάθε ένα από τα απομονωμένα στελέχη, ενώ περίπου το 80% του κάθε γονιδιώματος μπορεί να ποικίλει μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών. Κάθε μεμονωμένο γονιδίωμα περιέχει περίπου 4.000 με 5.500 γονίδια, όμως ο συνολικός αριθμός διαφορετικών γονιδίων μεταξύ όλων των στελεχών της αλληλουχίας της *E. coli* υπερβαίνει τα 16.000 γονίδια. Αυτή η πολύ μεγάλη γονιδιακή ποικιλότητα ερμηνεύει ότι τα δύο τρίτα του γονιδιώματος της *E. coli* προέρχεται από άλλα είδη που προέκυψαν μέσω της διαδικασίας οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς (Schmidt, et al, 2016).

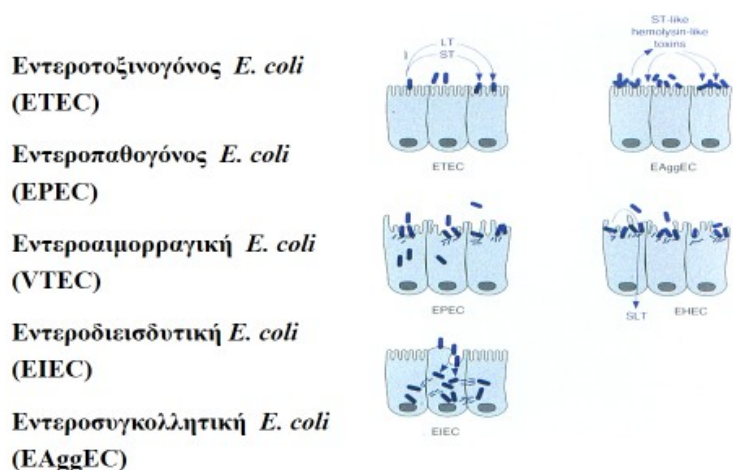
2.5. Οικολογία-Παθογένεση

Η *E. coli* αποτελεί μέλος και αποικιστή της φυσιολογικής χλωρίδας και κοιλοτήτων του ανθρώπινου σώματος καθώς και των ζώων, ενώ βρίσκεται σε αφθονία στο περιβάλλον και στην τροφική αλυσίδα (Σχήμα 5).



Σχήμα 5: Οικολογία- Παθογένεση *E. coli* (Laboratoire de reference pour *Escherichia coli*, Universite de Montreal, www.ecl-lab.com)

Αν και πολλά στελέχη *E. coli* δεν είναι παθογόνα, λοιμώξεις όπως γαστρεντερίτιδα, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, νεογνική μηνιγγίτιδα, αιμορραγική κολίτιδα μπορεί να προκληθούν ως αποτέλεσμα διαφόρων παθογενετικών μηχανισμών που ενισχύουν την επιθετικότητα ή αντίστοιχα την αντοχή του μικροοργανισμού έναντι του ξενιστή (Σχήμα 6).



Σχήμα 6: Παθογενετικοί μηχανισμοί *E. coli* (Greenwood, et al, 2011)

Η πηγή της λοίμωξης μπορεί να είναι ενδογενής (εντερική χλωρίδα, αποικισμός) ή εξωγενής (πάσχων φορέας, τροφιμογενής, υδατογενής) (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Τροφιμογενής προέλευση *E. coli* (Παπαδοπούλου, 2014a)

ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ	ΥΠΟΠΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ
ETEC	Τυριά (γαλλικά τύπου Camembert), γιαούρτια Κρέατα και κρεατοσκευάσματα Νερά
EPEC	Βρεφικό γάλα από σκόνη γάλακτος (ανάμιξη με μολυσμένο νερό) Μαλακά τυριά, βούτυρο (αpasteurized γάλα) Κρύο χοιρινό κρέας, κρεατόπιτες Πόσιμο νερό (ατελής χλωρίωση)
EIEC	Μαλακά τυριά Ανεπεξέργαστο πόσιμο νερό
VTEC	Ωμά κρέατα (μοσχαρίσιο, χοιρινό, αρνίσιο) Μπιφτέκια (hamburgers), μοσχαρίσιο πατέ Κρύα προψημένα κρέατα, φιλέτο γαλοπούλας

Μη παστεριωμένα γαλακτομικά

Τα κοινά σημεία και συμπτώματα των λοιμώξεων του γαστρεντερικού περιλαμβάνουν πυρετό, κοιλιακό άλγος, διάρροιες, εμέτους και σε σπανιότερες περιπτώσεις νέκρωση και διάτρηση του εντέρου, περιτονίτιδα, σηψαιμία. Αν και η μεγαλύτερη επίπτωση αφορά στις ακραίες ηλικίες και σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα, υγιείς όλων των ηλικιακών ομάδων διατρέχουν κίνδυνο λοίμωξης ποικίλης προέλευσης (McGann, et al, 2016) (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Κλινικά σύνδρομα από *E. coli* (Αρσένη, 1994)

ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΛΟΙΜΩΞΗΣ	ΚΛΙΝΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ
ΕΝΤΕΡΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ	Γαστρεντερίτιδα βρεφών (EPEC) Χολεροειδής εντερίτιδα (ETEC) Νόσος ταξιδιωτών (ETEC) Δυσεντεροειδές σύνδρομο (EIEC) Αιμορραγική κολίτιδα (VTEC) Αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (VTEC)
ΕΞΩΕΝΤΕΡΙΚΕΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ	Ουρολοίμωξη Ευκαιριακές λοιμώξεις Λοιμώξεις ΚΝΣ Σηψαιμία Ενδοτοξική καταπληξία Πυώδεις φλεγμονές Αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο

Ορισμένα στελέχη της *E. coli* ευθύνονται για σοβαρές λοιμώξεις, όπως για παράδειγμα το O157: H7 που προκαλεί αιμορραγική κολίτιδα και αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS) σαν συνέπεια της δράσης της παραγόμενης Vero-τοξίνης (VT). Οι λοιμώξεις αυτές εμφανίζονται είτε σαν σποραδικά κρούσματα είτε σπανιότερα σαν περιορισμένες ή εκτεταμένες επιδημίες. Σε αντίθεση με τα περισσότερα στελέχη της *E. coli* που αποτελούν τμήμα της φυσιολογικής χλωρίδας

του εντέρου, η VT προκαλεί φλεγμονώδη απόκριση στα κύτταρα-στόχους του εντέρου και τελικά οξεία νεφρική ανεπάρκεια, θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα και μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία. Στο 25% των ασθενών με HUS, εμφανίζονται επιπλοκές από το ΚΝΣ (Watson, et al, 2016).

Τον Μάιο του 2011, ένα στέλεχος *E. coli*, O104: H4, αποτέλεσε αίτιο τροφιμογενούς επιδημίας HUS που ξεκίνησε στη Γερμανία. Η επιδημία επεκτάθηκε σε 11 ακόμη χώρες, ενώ το Γερμανικό Ομοσπονδιακό Ινστιτούτο Αξιολόγησης Κινδύνων, που ελέγχεται από το Υπουργείο Τροφίμων, Γεωργίας και Προστασίας των Καταναλωτών, ανακοίνωσε ότι σπόρια τριγωνέλλας από την Αίγυπτο ήταν πιθανόν η αιτία της επιδημίας από το EHEC (Watson, et al, 2016).

2.6. Πρόληψη - Θεραπεία

Ο βασικός άξονας της θεραπείας είναι η αξιολόγηση της αφυδάτωσης, η χορήγηση υγρών και αποκατάσταση ηλεκτρολυτών. Η χρήση αντιβιοτικών αποτελεί αντικείμενο διαφωνιών, εξαιτίας της τοξικότητας και της ανάπτυξης αντοχής. Ωστόσο ως χημειοπροφύλαξη χορηγούνται αρκετά αντιμικροβιακά (π.χ. φθοριοκινολόνες, τριμεθοπρίμη, δοξυκυκλίνη) με στόχο την ελάττωση της έντονης συμπτωματολογίας, ιδιαίτερα του διαρροϊκού συνδρόμου των ταξιδιωτών (Mironov, et al, 2017).

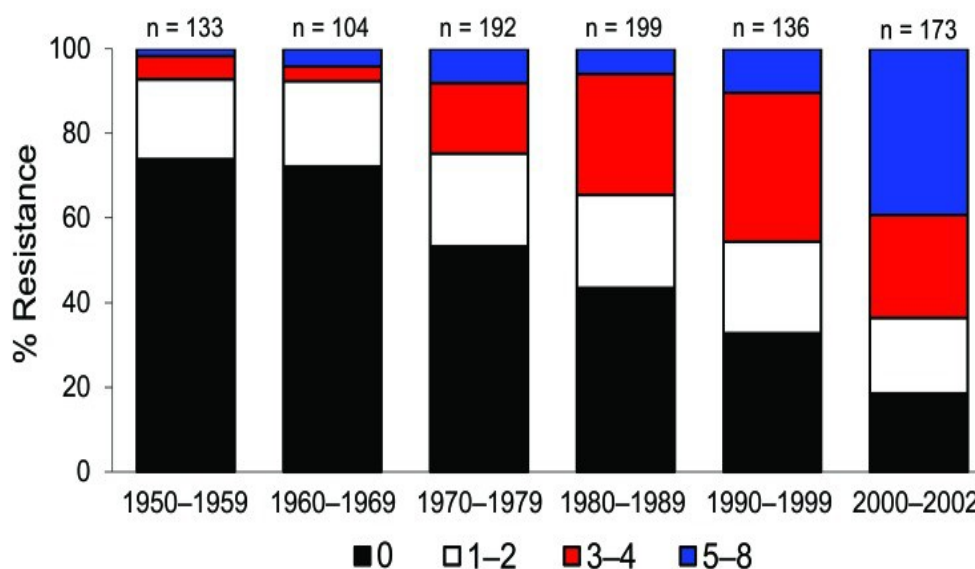
Το εντεροτοξινογόνο *E. Coli* (ETEC) είναι ο ορότυπος στον οποίο επικεντρώνονται οι περισσότερες προσπάθειες ανάπτυξης εμβολίου. Τα αντισώματα έναντι των θερμοευαίσθητων τοξινών (LT) και των κύριων παραγόντων αποικισμού (CF) του ETEC, παρέχουν προστασία έναντι των ομόλογων CF που παράγουν LT. Η ανάπτυξη και η δοκιμή αποτελεσματικών εμβολίων βρίσκεται σε εξέλιξη, χωρίς ωστόσο να υπάρχει εγκεκριμένη μορφή. Οι πλέον εκτενείς μελέτες χρήσης αφορούν κυρίως σε ζώα, ενώ δοκιμάζονται στοματικά αδρανοποιημένα εμβόλια, που αποτελούνται από αντιγόνο τοξίνης και ολόκληρα κύτταρα. Ένα τέτοιο εμβόλιο, που αποτελείται από τη μη τοξική B υπομονάδα της LT (rCTB-WC) παρείχε υψηλή (85-100%) βραχυπρόθεσμη ανοσία σε κλινικές μελέτες. Ένα εμβόλιο ETEC που αποτελείται από rCTB και αδρανοποιημένα βακτήρια *E. coli* που εκφράζουν τους CF, έχει αποδειχθεί σε κλινικές δοκιμές ότι είναι ασφαλές, ανοσογόνο και αποτελεσματικό στην αντιμετώπιση του διαρροϊκού συνδρόμου σε Αμερικανούς ταξιδιώτες, όχι όμως και κατά της διάρροιας που προκαλείται από ETEC σε μικρά παιδιά στην Αίγυπτο. Τέλος, ένα τροποποιημένο εμβόλιο ETEC που αποτελείται από

ανασυνδυασμένα στελέχη *E. coli* που εκφράζουν τους κύριους CF και ένα υβριδικό τοξικοειδές (LCTBA), βρίσκεται σε στάδιο κλινικών δοκιμών (McGann, et al, 2016).

Άλλες αποδεδειγμένες μέθοδοι πρόληψης για τη μετάδοση της *E. coli* περιλαμβάνουν την τήρηση των κανόνων προσωπικής υγιεινής, καθώς επίσης το προσεκτικό μαγείρεμα του κρέατος, την αποφυγή της κατανάλωσης ακατέργαστων, μη παστεριωμένων ροφημάτων (χυμοί, γάλα) και ανεπεξέργαστου νερού, καθώς και της μόλυνσης των σκευών και των επιφανειών προετοιμασίας και παρασκευής τροφίμων (Παπαδοπούλου, 2014a).

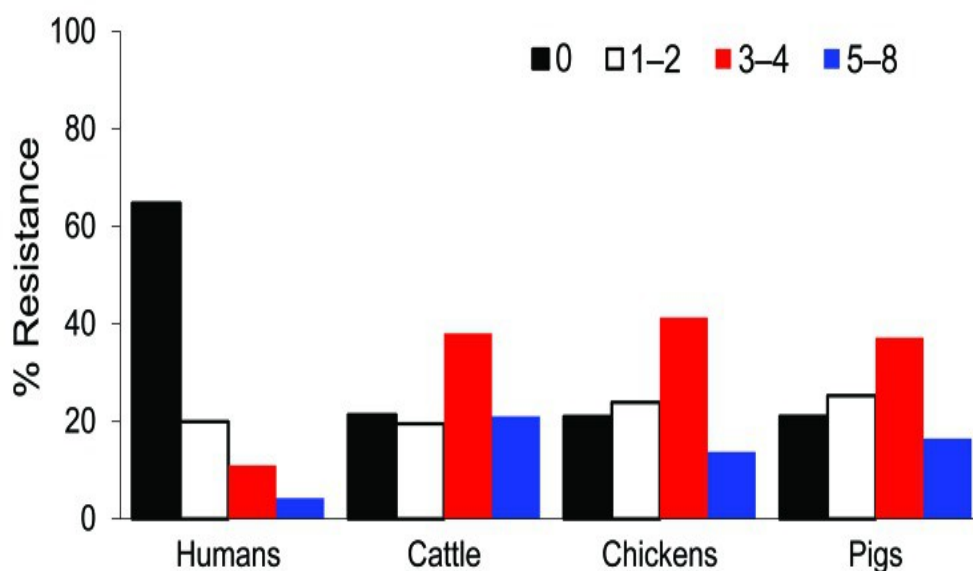
2.7. Αντοχή στα αντιβιοτικά

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών τα ποσοστά αντοχής της *E. coli* στα αντιβιοτικά εμφανίζουν ραγδαία αύξηση, ειδικά σε ότι αφορά τα β-λακταμικά (Σχήμα 7). Παραδόξως, τα περισσότερα από αυτά τα στελέχη προέρχονται κυρίως από την κοινότητα και σε μικρότερο βαθμό από το νοσοκομειακό περιβάλλον. Είναι χαρακτηριστικό ότι το 41,5% των κολοβακτηριδίων που απομονώνονται από ασθενείς της κοινότητας εμφανίζουν αντοχή στην αμπικιλίνη, το 22,7% στην κοτριμοξαζόλη, το 12,6% στις κινολόνες, ενώ το 7,5% παράγουν ESBL προσδίδοντας αντοχή σχεδόν σε όλες τις κεφαλοσπορίνες (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2017).



Σχήμα 7: Ποσοστά AMA στελεχών *E. coli* κατά κατηγορίες αντιβιοτικών, ΗΠΑ 1950-2002 (Tadesse, et al, 2012).

Επιπλέον, ανθεκτικά στελέχη προέρχονται από την χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνιατρική (θεραπεία και πρόληψη λοιμώξεων), στην κτηνοτροφία και στη γεωργία. Η άμεση ή έμμεση επαφή με μολυσμένα ζώα και η λήψη επιμολυσμένης τροφής αποτελούν συχνά πηγές απομόνωσης ανθεκτικών στελεχών, ενώ βοοειδή, χοίροι και πουλερικά είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα ζώων με αυξημένα ποσοστά ανθεκτικών *E. coli* (Tadesse, et al, 2012, Mironov, et al, 2017) (Σχήμα 8).



Σχήμα 8: Ποσοστά AMA στελεχών *E. coli* ανθρώπινης και ζωικής προέλευσης κατά κατηγορίες αντιβιοτικών, ΗΠΑ 1950-2002 (Tadesse et al, 2012).

Παρόλο που σε πολλές χώρες, κυρίως αναπτυσσόμενες, η χρήση των αντιβιοτικών λαμβάνει ιδιαίτερα μεγάλες διαστάσεις, εξακολουθεί να αποτελεί μείζον πρόβλημα και στις αναπτυγμένες. Σε μεγάλο αριθμό κοτόπουλων που εκτρέφονται στις ΗΠΑ και στον Καναδά χορηγούνται κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς. Πρόσφατα, όταν ο Food & Drug Administration (FDA) προσπάθησε να περιορίσει τη χρήση των κεφαλοσπορινών στα πουλερικά, η άσκηση πίεσης από συμφέροντα των κλάδων της γεωργίας και της φαρμακοβιομηχανίας οδήγησε στην προσωρινή ματαίωση αυτής της απόφασης (Schmidt, et al, 2016). Οι φθοριοκινολόνες αποσύρθηκαν από τη χρήση πουλερικών στις ΗΠΑ χωρίς σημαντικά προβλήματα παραγωγής.

Στην Αυστραλία, η χρήση φθοριοκινολόνης σε ζώα δεν εγκρίθηκε ποτέ, ωστόσο οι βιομηχανίες κρέατος εξακολουθούν να είναι κερδοφόρες με υψηλούς εξαγωγικούς δείκτες. Παράλληλα, το ποσοστό αντοχής των στελεχών *E. coli* που

απομονώνονται από τρόφιμα ζωικής παραγωγής στις φθοριοκινολόνες είναι σχεδόν μηδενικό, ενώ το αντίστοιχο κλινικών στελεχών δεν υπερβαίνει το 5%, παρά τη χρήση τους τόσο σε ασθενείς όσο και σε κατοικίδια ζώα για τουλάχιστον δύο δεκαετίες, ενισχύοντας τη δυναμική μετάδοσης της AMA μέσω της τροφικής αλυσίδας (McGann, et al, 2016). Αντίθετα, στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου οι πόροι, οι έλεγχοι και η επιτήρηση είναι συνήθως ανύπαρκτοι, παρατηρείται ταχεία αύξηση των ESBL *E. coli*, καθώς και των ανθεκτικών στελεχών στις κινολόνες (Deatherage, et al, 2017).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΝΕΡΟ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

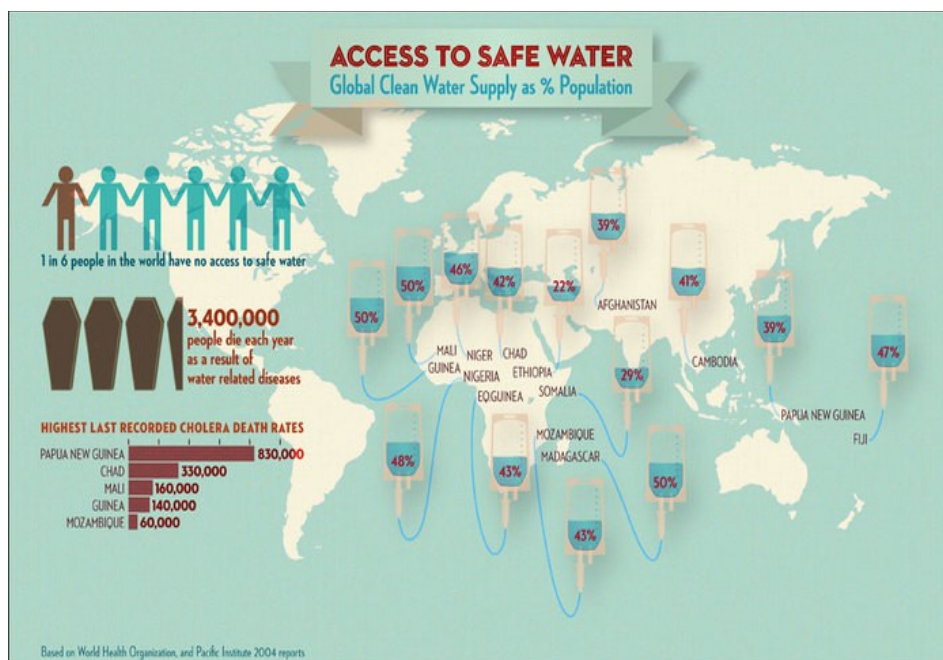
3.1. Το νερό και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του

Το νερό αποτελεί το βασικότερο στοιχείο για την ύπαρξη και διατήρηση της ζωής στον πλανήτη, αποτελώντας το 70% του σωματικού βάρους του ανθρώπου και το 75% του πλανήτη και είναι βασικός παράγοντας της κυκλοφορίας και της ηλεκτρολυτικής ισορροπίας του οργανισμού. Επιπλέον το 80% των ζωντανών οργανισμών ζουν στο υδάτινο περιβάλλον, ενώ το 60% του παγκόσμιου πληθυσμού ζει σε παράκτιες, παραλίμνιες ή παραποτάμιες περιοχές (Παπαδοπούλου, 2014b). Κοινή προέλευση όλων των μορφών ύδατος είναι οι ωκεανοί, από τους οποίους εξατμίζονται τεράστιες μάζες νερού. Οι παραγόμενοι υδρατμοί σχηματίζουν νέφη τα οποία υγροποιούνται και το νερό επανέρχεται και απαντάται στη γη με διάφορες μορφές π.χ. στερεά (πάγος, χιόνι), υγρή (ποτάμια, λίμνες, θάλασσα), αέρια (νέφη) (Σαββαΐδης, 2014) (Σχήμα 9). Τόσο τα υπόγεια όσο και τα επιφανειακά ύδατα, προερχόμενα από λίμνες ή/και ποτάμια, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ανθρώπινη κατανάλωση και περίπου το 0,5% της συνολικής ποσότητάς του στη φύση προορίζεται για αυτό το σκοπό.



Σχήμα 9: Σχηματική απεικόνιση του υδρολογικού κύκλου (Βουδούρης, 2018).

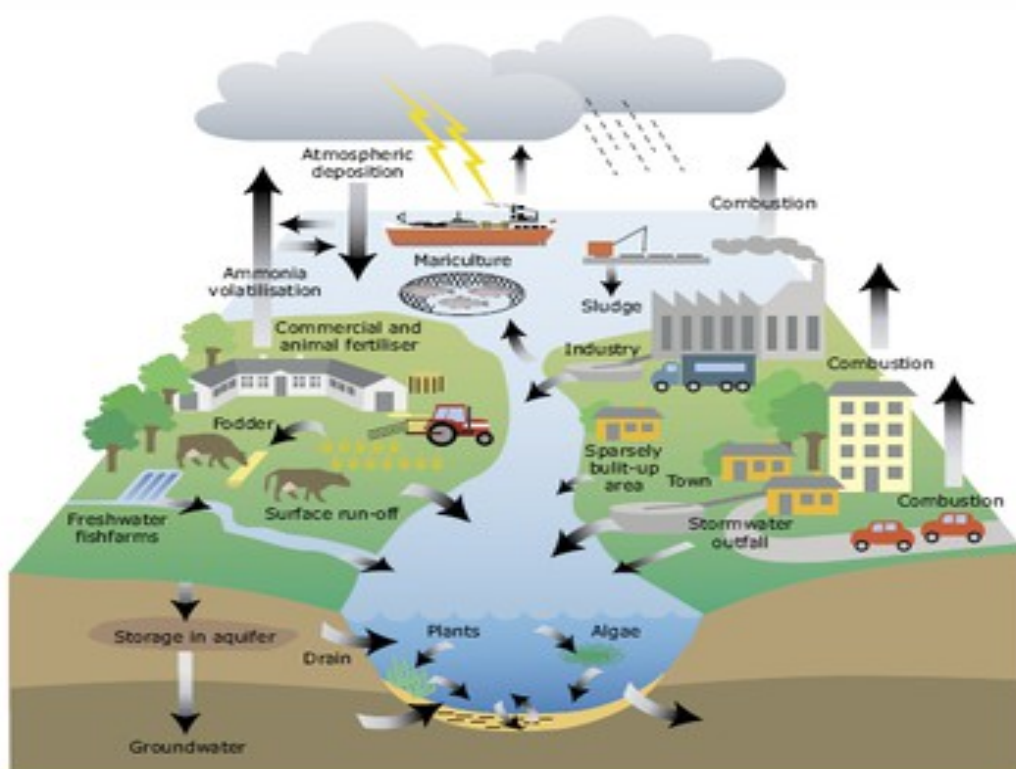
Το φυσικό νερό περιέχει πλήθος ενδογενών μικροοργανισμών, αλλά επιπρόσθετα ένας μεγάλος αριθμός μικροβίων εισέρχεται σε αυτό μέσω της ανθρώπινης δραστηριότητας ή διαφόρων φυσικών φαινομένων. Αυτό το πρόσθετο φορτίο μπορεί να διαταράξει την ικανότητα αυτοκαθαρισμού του φυσικού νερού και έτσι αυτό σταδιακά καθίσταται μολυσμένο (Πιτυρίγκα, 2018). Το πρόβλημα με το νερό στον 21^ο αιώνα παραμένει, δεδομένου ότι 1,5 και 3 δις του πληθυσμού της γης δεν έχει πρόσβαση σε πόσιμο νερό και νερό για προσωπική υγιεινή αντίστοιχα, πάνω από 3 εκατομμύρια άνθρωποι καταλήγουν από λοίμωξη υδατογενούς προέλευσης (Εικόνα 3), περισσότερα από 2 εκατομμύρια τόνοι λυμάτων το χρόνο πέφτουν σε επιφανειακά ύδατα, είναι δε συνάρτηση διαφόρων παραγόντων:



Εικόνα 3: Παγκόσμια πρόσβαση σε «ασφαλές» νερό (WHO & P.I., 2004).

Η ποιότητα του πόσιμου νερού αποτελεί μια αδιαμφισβήτητη πτυχή της κοινωνίας που ευημερεί, εξασφαλίζοντας ανάλογα υψηλό βιοτικό επίπεδο και ποιότητα ζωής. Το νερό που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση πρέπει να είναι αβλαβές για την υγεία, οργανοληπτικά άμεμπτο και απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς και άλλες ουσίες σε συγκεντρώσεις επιβλαβείς για την ανθρώπινη υγεία (Πιτυρίγκα, 2018).

Η ρύπανση των υδάτων σαν αποτέλεσμα της ανθρώπινης δραστηριότητας, προέρχεται κυρίως από αστικά και βιομηχανικά λύματα, καθώς επίσης και από απόβλητα γεωργικών ή κτηνοτροφικών ενασχολήσεων (Σχήμα 10). Έτσι οποιαδήποτε επιμόλυνση του πόσιμου νερού με μικροοργανισμούς ή πρόσμιξή του με επικίνδυνες ουσίες, το καθιστούν ακατάλληλο προς χρήση και επιβλαβές για τη Δημόσια Υγεία (EEA, 2018).



Σχήμα 10: Πηγές ρύπανσης υδάτων (eea.europa.eu).

Ιχνοστοιχεία και βαρέα μέταλλα από τη βιομηχανική παραγωγή (κάδμιο, μόλυβδος, υδράργυρος, χρώμιο, αρσενικό, κυάνιο), αμμωνία, νιτρικά και φωσφορικά προερχόμενα από αστικά απόβλητα και λύματα της κτηνοτροφικής και γεωργικής παραγωγής καθώς και φυτοφάρμακα, λιπάσματα, εντομοκτόνα, ραδιενεργά

κατάλοιπα, αποτελούν επικίνδυνους χημικούς ρυπαντές του νερού, καθιστώντας το υπεύθυνο για πολυσυστηματικές βλάβες. Σπανιότερα το αίτιο της ρύπανσης μπορεί να οφείλεται σε φυσικά φαινόμενα και ατμοσφαιρικούς ρύπους που καταλήγουν στο νερό. Αντίστοιχα μια σειρά μικροοργανισμών κοπρανόδους προέλευσης, προερχόμενων από τις ίδιες πηγές λυμάτων, είναι δυνατό να επιμολύνουν το νερό με συνέπεια την πρόκληση λοιμώξεων κυρίως σε ακραίες ηλικίες, ανοσοκατεσταλμένους και ασθενείς με χρόνια υποκείμενα νοσήματα, (Παπαδοπούλου, 2014b, Πιτυρίγκα, 2018).

3.2. Μικροβιολογικοί δείκτες

Η μικροβιολογική εξέταση του πόσιμου νερού περιλαμβάνει τη δειγματοληψία και την αξιολόγηση των μικροβιολογικών δεικτών, που αποτελούν κοπρανώδεις μικροοργανισμοί, που περνούν προσωρινά στο υδάτινο περιβάλλον και είναι οι παρακάτω:

- *E. coli*
- Enterococci
- Ολικά κολοβακτηριοειδή (*Citrobacter* spp, *Enterobacter* spp, *Hafnia* spp, *Serratia* spp, *Klebsiella* spp)
- *Clostridium perfringens*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- κοινοί αερόβιοι μικροοργανισμοί.

Η *E. coli* αποτελεί τον καλύτερο βιολογικό δείκτη κοπρανόδους μόλυνσης του νερού, προερχόμενο από περιττώματα ζώων ή ανθρώπων, υποδηλώνοντας την πιθανή πρόσμιξη του νερού και με άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς. Οι κοπρανώδεις εντερόκοκκοι των ανθρώπων και των θερμόαιμων ζώων εμφανίζονται ανθεκτικοί στις περιβαλλοντολογικές συνθήκες και πιθανή παρουσία τους στο νερό σε συνδυασμό με την απουσία *E. coli* είναι ενδεικτική παλιάς κοπρανόδους μόλυνσης του νερού. Η παρουσία των κολοβακτηριοειδών (total coliforms) στο νερό δεν είναι απόλυτη ένδειξη κοπρανόδους επιμόλυνσης, καθώς πολλά είδη των βακτηρίων εντοπίζονται στο περιβάλλον, ενισχύει όμως τις υποψίες για αλλοίωση της ποιότητας του νερού

και χρήζει διερεύνησης σε επίπεδο ελέγχου εισροής ξένων σωμάτων και κακής συντήρησης του δικτύου ύδρευσης.

Σύμφωνα με τις ευρωπαϊκές οδηγίες οι παράμετροι ελέγχου της μικροβιολογικής ποιότητας του νερού διακρίνονται σε υποχρεωτικές, που περιλαμβάνουν μη παθογόνα μικρόβια που επισημαίνουν την ενδεχόμενη παρουσία ή δυνατότητα παρουσίας παθογόνων, και στις ενδεικτικές παραμέτρους, που περιλαμβάνουν μικρόβια που παρέχουν σαφείς ενδείξεις μεταβολών της μικροβιολογικής ποιότητας του νερού και την ενδεχόμενη ανάγκη επανορθωτικών δράσεων (Παπαδοπούλου, 2014b, Πιτυρίγκα, 2018) (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Υποχρεωτικές και ενδεικτικές παράμετροι μικροβιολογικής ποιότητας πόσιμου νερού δικτύου ύδρευσης.

ΥΠΟΧΡΕΩΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ
<i>Escherichia coli</i>
Εντερόκοκκοι
ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ
OMX 22°C
OMX 37°C
Ολικά κολοβακτηριοειδή
<i>Clostridium perfringens</i>

3.3. Νομοθετικό πλαίσιο

Το δικαίωμα στην ελεύθερη πρόσβαση σε ασφαλές και υγιεινό νερό είναι αδιαμφισβήτητο και αποτελεί από τις πρωτεύοντες δεσμεύσεις της πολιτείας, η οποία πρέπει να εξασφαλίζει τις υποδομές των δικτύων ύδρευσης, τη συντήρησή τους, λαμβάνοντας μέτρα πρόληψης και αντιμετώπισης δυνητικών κινδύνων επιδημιών, βάσει ενός νομοθετικού πλαισίου προάσπισης της ανθρώπινης υγείας.

Συνολικά το νερό για ανθρώπινη κατανάλωση, με βάση την ισχύουσα νομοθεσία περιλαμβάνει τα παρακάτω:

1. Πόσιμο νερό δικτύου ύδρευσης
2. Εμφιαλωμένο νερό (επιτραπέζιο και φυσικό μεταλλικό)
3. Νερό κολυμβητικών δεξαμενών
4. Επιφανειακό νερό αναψυχής (Σαββαΐδης, 2014).

Σύμφωνα με τον WHO πόσιμο νερό θεωρείται αυτό που κρίνεται κατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση και για όλες τις συνήθεις οικιακές χρήσεις συμπεριλαμβανομένων και της προσωπικής υγιεινής (WHO, 2018). Οι ενέργειες που περιλαμβάνονται στον έλεγχο της ποιότητας και της καταλληλότητας του πόσιμου νερού είναι οι παρακάτω:

- επιτόπια υγειονομική εξέταση
- οργανοληπτικές παράμετροι
- φυσική εξέταση
- χημική εξέταση
- βιολογική έρευνα
- μικροβιολογική εξέταση

Η κοινή υπουργική απόφαση Υ2/2600/2001 – ΦΕΚ-892 Β'/11-7-01 σε συμμόρφωση με την οδηγία 98/83 Ε.Ε, όπως τροποποιήθηκε με την ΚΥΑ 38295/2007 σχετικά με την ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης, ορίζει ως «νερό ανθρώπινης κατανάλωσης»:

- το νερό, είτε στη φυσική του κατάσταση είτε μετά από επεξεργασία, που προορίζεται για πόση, μαγείρεμα, προπαρασκευή τροφής ή άλλες οικιακές χρήσεις, ανεξάρτητα από την προέλευσή του και από το εάν παρέχεται από δίκτυο διανομής, από βυτίο, ή σε φιάλες ή δοχεία.
- το νερό που χρησιμοποιείται στις επιχειρήσεις παραγωγής τροφίμων για την παρασκευή, επεξεργασία, συντήρηση ή εμπορία προϊόντων ή ουσιών που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, εκτός αν οι αρμόδιες εθνικές αρχές κρίνουν ότι η ποιότητα του νερού δεν μπορεί να επηρεάσει την υγιεινή των τροφίμων στην τελική τους μορφή (Παπαδοπούλου, 2014b, Σπηλιοπούλου, 2014).

Σύμφωνα με την Ελληνική Νομοθεσία σε πλήρη εναρμόνιση με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 80/778, το πόσιμο νερό πρέπει να είναι στείρο από ολικά και κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή, στρεπτοκόκκους κοπράνων, θειοαναγωγικά κλωστηρίδια, ενώ σε ειδικές περιστάσεις επιβάλλεται η συμπληρωματική διερεύνηση για την παρουσία άλλων παθογόνων, όπως σαλμονέλλες, σταφυλόκοκκοι, εντεροϊοί, βακτηριοφάγοι, φύκη, παράσιτα και μορφοποιημένα στοιχεία (Παπαδοπούλου, 2014b, Σαββαΐδης, 2014).

Τέλος η υιοθέτηση ενός νέου θεσμικού πλαισίου σε πλήρη εναρμόνιση με την οδηγία 2000/60/EK του Ευρωπαϊκού κοινοβουλίου κρίνεται αναγκαία με γενικούς στόχους τα παρακάτω:

- Μακροπρόθεσμη προστασία των υδάτων
- Πρόληψη της υποβάθμισης, προστασία και αποκατάσταση των άμεσα εξαρτώμενων από τα ύδατα χερσαίων οικοσυστημάτων και υγροτόπων
- Προοδευτική ελάττωση των απορρίψεων και της ρύπανσης των υπογείων υδάτων
- Αποφυγή της περαιτέρω υποβάθμισης καθώς και μετριασμό των επιπτώσεων από πλημμύρες και ξηρασίες (Δακορώνια, 2010).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΔΑΤΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΚΑΙ *E. coli*

4.1. Γενικά

Οι υδατογενείς λοιμώξεις υπολογίζονται στο 6% των νοσημάτων παγκοσμίως, προκαλώντας πάνω από 1,5 εκατομμύριο θανάτους, εμφανίζονται δε είτε ως μεμονωμένα σποραδικά κρούσματα, είτε ως επιδημίες όταν:

- δύο ή περισσότερα άτομα εμφανίζουν παρόμοια συμπτωματολογία μετά την κατάποση πόσιμου νερού ή μετά την έκθεση σε νερό που χρησιμοποιείται για λόγους αναψυχής
- όταν τα επιδημιολογικά και εργαστηριακά δεδομένα στηρίζουν την υπόθεση ότι το νερό είναι η πιθανή πηγή του νοσήματος.

Έτσι, με βάση τα δεδομένα ποιότητας των υδάτων και τα διαθέσιμα επιδημιολογικά δεδομένα οι υδατογενείς επιδημίες ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012) (Πίνακας 9).

Πίνακας 9: Ταξινόμηση υδατογενών επιδημιών με βάση τα δεδομένα ποιότητας των υδάτων και τα διαθέσιμα επιδημιολογικά δεδομένα

Τάξη	Επιδημιολογικά δεδομένα	Δεδομένα ποιότητας ύδατος
I	Επαρκή: δεδομένα αναλυτικής επιδημιολογίας, με RR ή $OR^* \geq 2$ ή διάστημα εμπιστοσύνης που δεν περιλαμβάνει τη μονάδα.	Επαρκή: μπορεί να είναι ιστορικά δεδομένα π.χ. ιστορικό διακοπής ρεύματος ή δυσλειτουργίας ενός χλωριωτή ή εργαστηριακά π.χ. παρουσία κολοβακτηριοειδών στο νερό.
II	Επαρκή: δεδομένα αναλυτικής επιδημιολογίας, με RR ή $OR^* \geq 2$ ή διάστημα εμπιστοσύνης που δεν περιλαμβάνει τη μονάδα.	Απόντα ή ανεπαρκή.
III	Περιορισμένα: περιγραφικά δεδομένα, οι ασθενείς δεν είχαν άλλες κοινές εκθέσεις εκτός από την κατανάλωση νερού.	Επαρκή: μπορεί να είναι ιστορικά δεδομένα π.χ. ιστορικό διακοπής ρεύματος, ή δυσλειτουργίας ενός χλωριωτή ή εργαστηριακά π.χ. παρουσία κολοβακτηριοειδών στο νερό.
IV	Περιορισμένα: περιγραφικά δεδομένα, οι ασθενείς δεν είχαν άλλες κοινές εκθέσεις εκτός από την κατανάλωση νερού.	Απόντα ή ανεπαρκή.

* RR = σχετικός κίνδυνος, OR =σχετικός λόγος συμπληρωματικών πιθανοτήτων

Οι υδατογενείς λοιμώξεις μπορούν να μεταδοθούν:

- με την άμεση επαφή με το νερό
- με την κατανάλωση μολυσμένου νερού
- με εισπνοή αερολυμάτων (υδατοσταγονίδια)
- με εισρόφηση μολυσμένου νερού.

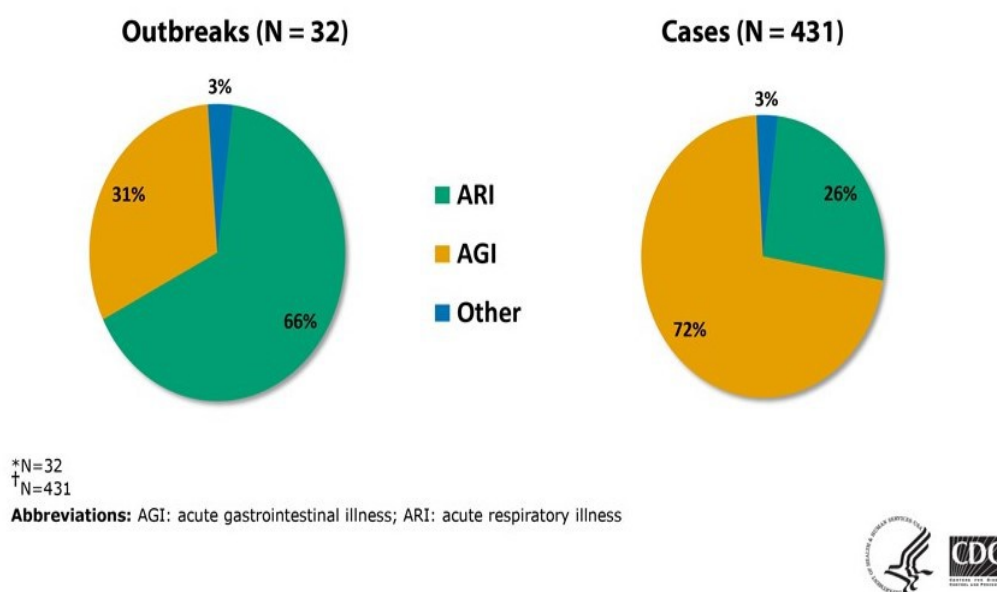
Πολλοί μικροοργανισμοί ενοχοποιούνται για την πρόκληση των συγκεκριμένων λοιμώξεων, που εκδηλώνονται συνήθως με κλινική συνδρομή γαστρεντερίτιδας: βακτήρια, ιοί, πρωτόζωα και έλμινθες, μύκητες. Η λίστα με τα πιθανά παθογόνα ανανεώνεται συνεχώς με την προσθήκη νέων αιτιολογικών παραγόντων, σε συνάρτηση με την ανάπτυξη νέων εργαστηριακών τεχνικών και μεθόδων απομόνωσης (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012) (Πίνακας 10).

Πίνακας 10: Μικροοργανισμοί που ενοχοποιούνται για την πρόκληση υδατογενών λοιμώξεων.

Βακτήρια	<i>Salmonella typhi, Salmonella paratyphi</i> <i>Shigella spp, Escherichia coli</i> <i>Campylobacter spp, Vibrio cholerae</i> <i>Yersinia spp</i> <i>Legionella pneumophila</i> <i>Mycobacterium spp</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus spp</i> <i>Leptospira spp</i>
Μύκητες	<i>Candida albicans, Aspergillus spp</i> <i>Mucor, Fusarium</i>
Ιοί	HAV, HEV, Astroviruses, Enteroviruses, Rotaviruses, Parvo, Norwalk
Παράσιτα	<i>Entamoeba histolytica, Giardia lamblia</i> <i>Cryptosporidium spp, Balantidium coli</i> <i>Naegleria fowleri, Acanthamoeba spp,</i> <i>Schistosoma spp, Toxoplasma gondii,</i> <i>Draculus medinensis</i>

Οι υδατογενείς λοιμώξεις που προέρχονται από μικροβιακή ρύπανση της θάλασσας, έχουν σαν αιτιολογικούς παράγοντες παθογόνους μικροοργανισμούς που εισέρχονται στο υδάτινο περιβάλλον μέσω αποβλήτων, της ατμόσφαιρας, ή ακόμη και από τους λουόμενους. Τα φυσικά φαινόμενα βοηθούν στη μεταφορά των παθογόνων στα υδάτινα οικοσυστήματα, ενώ η ανθρώπινη παρέμβαση μέσω των λυμάτων και του έντονου συγχρωτισμού σε δημοφιλείς ακτές, είναι καθοριστική στην πρόκληση λοιμώξεων. Η επιβίωση των μικροοργανισμών είναι συνάρτηση διαφόρων ετερογενών παραγόντων που καθορίζουν τελικά την παραμονή και επιβίωσή τους στο οικοσύστημα. Η κλινική συνδρομή χαρακτηρίζεται κυρίως από λοιμώξεις του γαστρεντερικού, λοιμώξεις σε παιδιά και ανοσοκατεσταλμένους αλλά και σε υγιείς ενήλικες με τραύματα και υποκείμενα νοσήματα.

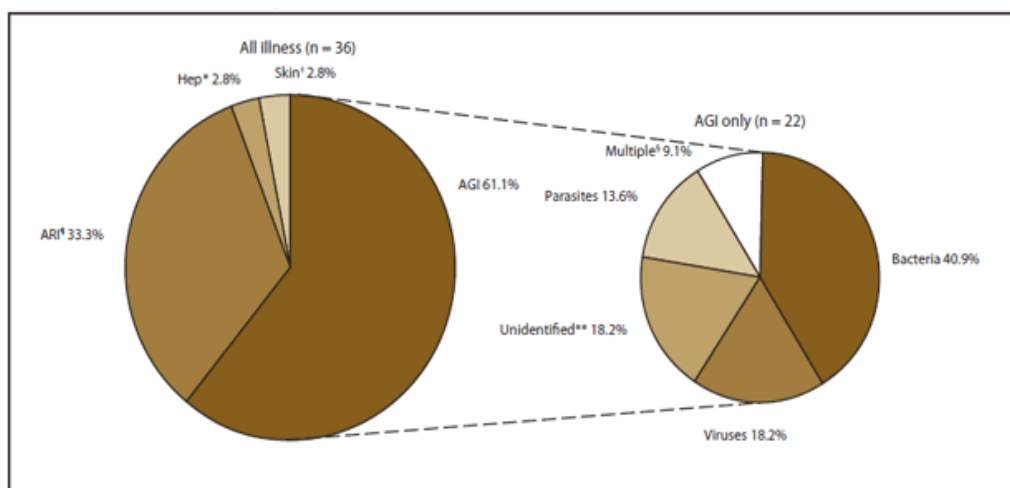
Η μελέτη της μετάδοσης λοιμώξεων μέσω του τεχνητού υδάτινου περιβάλλοντος, παρουσιάζει επίσης ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αφού τα τελευταία χρόνια πισίνες άθλησης, αναψυχής και αισθητικής είναι ιδιαίτερα δημοφιλείς, ενώ αντίστοιχες κολυμβητικές δεξαμενές που χρησιμοποιούνται για ιατρικούς λόγους (φυσικοθεραπεία), έχουν κατά καιρούς ενοχοποιηθεί για την πρόκληση υδατογενών λοιμώξεων κυρίως του γαστρεντερικού αλλά και του αναπνευστικού συστήματος (Σχήμα 11).



Σχήμα 11: Ποσοστιαία κατανομή συστηματικής συνδρομής υδατογενών λοιμώξεων, ΗΠΑ 2011-2012 (CDC, 2012).

Βακτήρια που επιπλέον μπορούν να ενοχοποιηθούν ως παθογόνα σε αυτά τα περιβάλλοντα, είναι οι σταφυλόκοκκοι που είναι ανθεκτικοί στην επίδραση του χλωρίου, καθώς και οι ψευδομονάδες που είναι συχνοί αποικιστές επιφανειών σε συνδυασμό με υψηλή υγρασία. Άλλα βακτήρια που έχουν ενοχοποιηθεί για λοιμώξεις σε κολυμβητικές δεξαμενές αποτελούν η *A. hydrophila*, άτυπα μυκοβακτηρίδια και φυσικά η λεγιωνέλλα που μεταδίδεται με την εισπνοή μικροσταγονιδίων που δημιουργούνται από κλιματιστικά, jakouzi, spa και τις υγραντικές συσκευές κλειστών χώρων σε μεγάλα κτιριακά συγκροτήματα. Πολύ συχνές είναι επίσης οι ιογενείς (HAV, Adenoviruses, Enteroviruses, Rotaviruses, Norwalk) και παρασιτικές (*Giardia*, *Cryptosporidium* και αμοιβάδες) λοιμώξεις. Τέλος η παρουσία μυκήτων,

κυρίως δερματόφυτων αλλά και βλαστομυκήτων, ευνοείται από τις συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας, αποικίζοντας τους περιβάλλοντες χώρους και προκαλώντας κυρίως λοιμώξεις του δέρματος, του τριχωτού της κεφαλής και πολύ συχνότερα των ονύχων, οι οποίες είναι δύσκολα θεραπεύσιμες και απαιτούν πολλές φορές μακροχρόνιες θεραπείες (Σχήμα 12).



Σχήμα 12: Μικροβιακά αίτια και συστηματική εντόπιση υδατογενών λοιμώξεων.

4.2. Πόσιμο νερό και παρουσία ανθεκτικών στελεχών *E. coli*

Τα περιττώματα ανθρώπινης και ζωικής προέλευσης αποτελούν σημαντική πηγή ρύπανσης των υδάτων, κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες. Με δεδομένη την αδυναμία πρόσβασης σε επαρκείς εγκαταστάσεις αποχέτευσης με προδιαγραφές υγιεινής και την ανεπαρκή παροχή νερού για περισσότερο από 2 δισεκατομμύρια ανθρώπων, γίνεται αντιληπτή η ανάγκη χρήσης ανεπεξέργαστων επιφανειακών μη προστατευόμενων υδάτων (ποτάμια και λίμνες). Αυτές οι πηγές νερού διατρέχουν γεωργικές εκτάσεις και ανοικτές θέσεις και έτσι συχνά εκτίθενται σε ανθρώπινα και ζωικά απόβλητα. Κατά τη διάρκεια των βροχοπτώσεων οι βακτηριακοί πληθυσμοί μετακινούνται σε ποτάμια, ρυάκια, λίμνες, κολπίσκους ή υπόγεια ύδατα. Το ανεπεξέργαστο πόσιμο νερό που προέρχεται από αυτές τις πηγές περιέχει στελέχη *E. coli*. Λαμβάνοντας υπόψη ότι στις αναπτυσσόμενες χώρες οι γραμμές δικτύου παροχής πόσιμου ύδατος και οι ανοιχτές αποχετεύσεις λυμάτων βρίσκονται πολύ συχνά σε γειτνίαση, γίνεται αντιληπτός ο κίνδυνος ενδεχόμενης επιμόλυνσης του φυσικού νερού.

Η χρήση αυτών των μολυσμένων υδάτων αυξάνει τον κίνδυνο έκθεσης και κατά συνέπεια λοιμώξεων σε μια πληθώρα παθογόνων μικροοργανισμών, ανάμεσα στους οποίους και αρκετά στελέχη *E. coli* που είναι παθογόνα τόσο για τους ανθρώπους όσο και για τα ζώα, με λοιμογόνο δράση που εκδηλώνεται σαν αυτοπεριοριζόμενη διάρροια έως και αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο και αιμορραγική εντεροκολίτιδα. Ιδιαίτερα στις ομάδες υψηλού κινδύνου (νεογνά, ηλικιωμένοι, ανοσοκατεσταλμένοι), η *E. coli* αποτελεί ευκαιριακό παθογόνο υπεύθυνο για μια σειρά εντερικών και εξωεντερικών λοιμώξεων (ουρολοιμώξεις, λοιμώξεις ΚΝΣ, σηψαιμία, πυώδεις φλεγμονές), πολλές από τις οποίες μπορεί να είναι θανατηφόρες.

Η εμφάνιση και η διάδοση ανθεκτικών στελεχών *E. coli* αποτελεί σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία, αφού η νοσηρότητα που συνδέεται με αυτά τα βακτηρίδια, αυξάνει περαιτέρω την επίπτωση της θνησιμότητας καθώς και τις δαπάνες στην υγειονομική περίθαλψη. Στελέχη *E. coli* που έχουν απομονωθεί από ανθρώπους και ζώα θεωρούνται ως πιθανή δεξαμενή για γονίδια ΑΜΑ και αυτά τα γενετικά χαρακτηριστικά μπορούν να μεταφερθούν τόσο στην *E. coli* όσο και σε άλλα βακτηρίδια που αφορούν σε ανθρώπους, ζώα ή/και στο περιβάλλον. Πιθανώς, οι πηγές νερού που έχουν μολυνθεί με πολυανθεκτικά στελέχη *E. coli*, αποτελούν καθοριστικό παράγοντα αύξησης του επιπολασμού ανθεκτικών βακτηρίων σε πληθυσμούς των αναπτυσσόμενων χωρών. Μελέτες από την Αφρικανική ήπειρο επιβεβαιώνουν τα υψηλά ποσοστά πολυανθεκτικών στελεχών *E. coli* τόσο από «ασφαλείς» (επεξεργασμένες και κλειστές) όσο και από «μη ασφαλείς» (μη επεξεργασμένες και ανοιχτές) πηγές νερού.

Η ΑΜΑ αφορά σε ένα μακρύ κατάλογο αντιβιοτικών που περιλαμβάνουν κυρίως τα β-λακταμικά, τις κινολόνες, την τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη, τη χλωραμφενικόλη, τις τετρακυκλίνες. Ειδικότερα, τα ποσοστά των στελεχών που παράγουν ευρέος φάσματος β-λακταμάσες, αυξάνονται ραγδαία, καθιστώντας τις επιλογές στη θεραπευτική των υδατογενών λοιμώξεων εξαιρετικά δύσκολες (Chen, et al, 2017). Η εμφάνιση και η επικράτηση αυτών των ανθεκτικών στελεχών στο περιβάλλον είναι πλέον ένα συνηθισμένο γεγονός και δεδομένου ότι το νερό είναι εκ των βασικών στοιχείων του περιβάλλοντος και ένα συνηθισμένο περιβάλλον για την ανάπτυξη και επιβίωση της *E. coli*, αναδεικνύει την ανάγκη μέτρων πρόληψης και

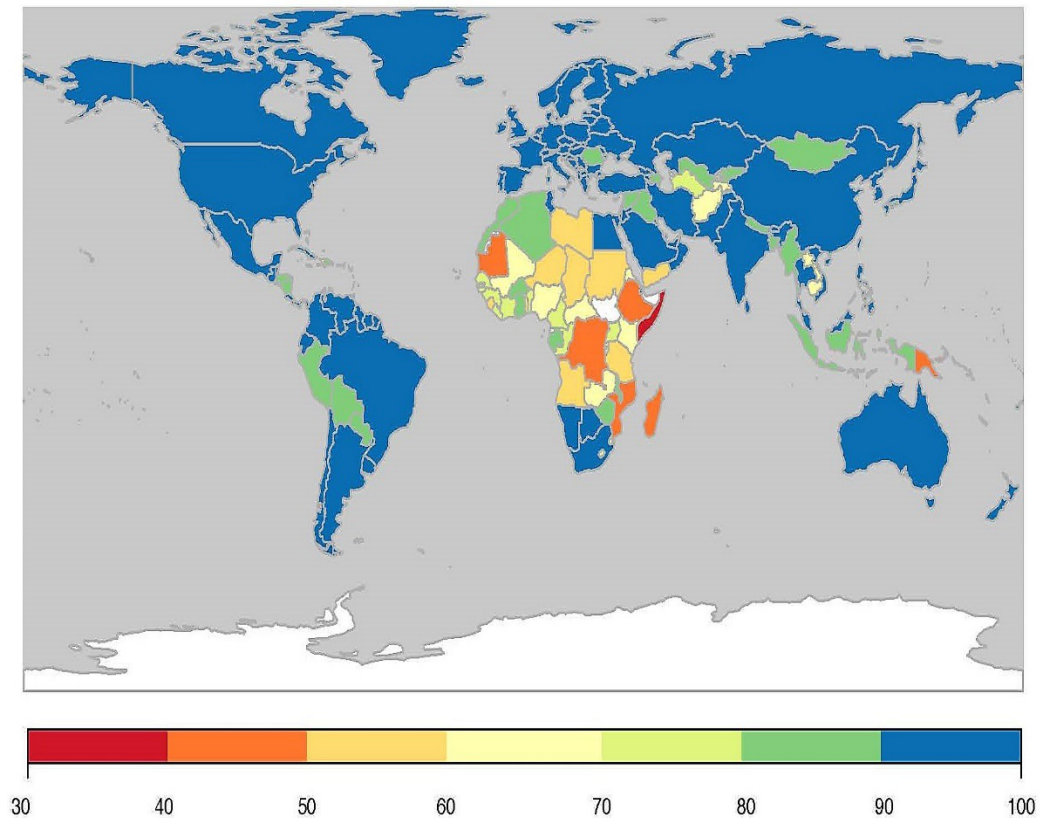
διαχείρισης των υδατογενών λοιμώξεων από *E. coli*. Μεταξύ των προτεινόμενων μέτρων περιλαμβάνονται:

- Βελτίωση της νομοθεσίας (και εφαρμογή της)
- Βελτίωση των εργαστηριακών μεθόδων ανίχνευσης των μικροοργανισμών στα νερά
- Ανάπτυξη καλύτερων μεθόδων επεξεργασίας των νερών
- Βελτίωση των γνώσεών μας στο πώς να προστατεύουμε τις πηγές του νερού
- Κατανόηση των συνθηκών του φυσικού περιβάλλοντος που επηρεάζουν τις πηγές του νερού (Παπαδοπούλου, 2014b).

4.3. Επιδημιολογικά δεδομένα

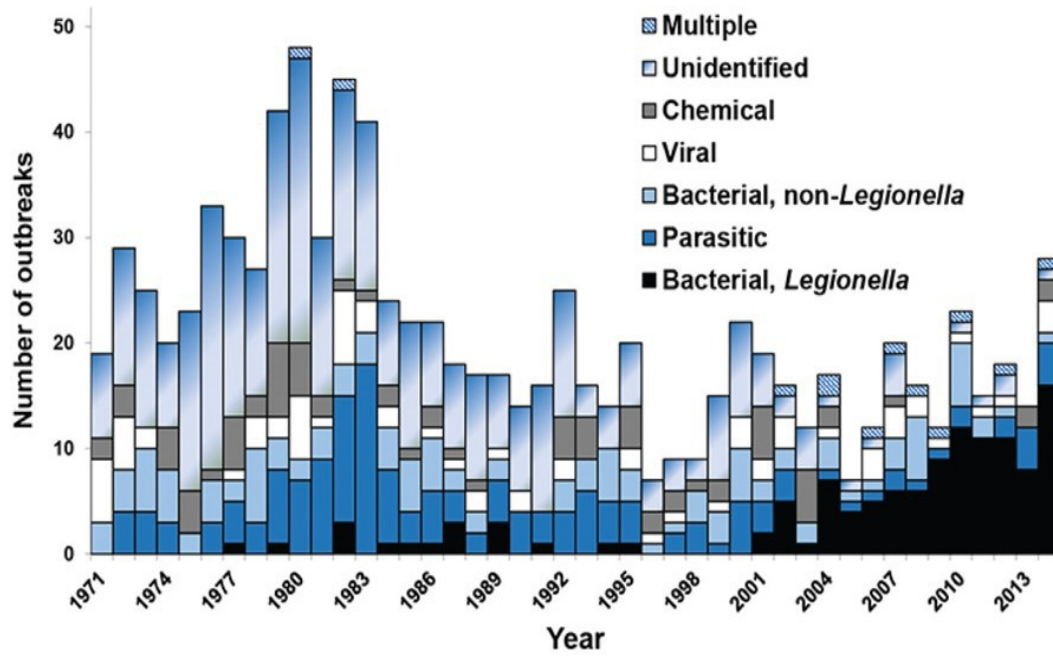
Οι επιδημίες από πόσιμο νερό αφορούν συνήθως σε μεγάλες πληθυσμιακές ομάδες, συμπεριλαμβανομένων παιδιών, ηλικιωμένων και ανοσοκατεσταλμένων, με αποτέλεσμα να αυξάνει η επίπτωση των κλινικών εκδηλώσεων, έστω και αν το μικροβιακό φορτίο του αιτιολογικού παράγοντα είναι μικρό. Καθοριστικός παράγοντας στην πλειονότητα των περιπτώσεων αποτελεί η μειωμένη προσβασιμότητα σε πόσιμο νερό από ένα μεγάλο τμήμα του παγκόσμιου πληθυσμού (Σχήμα 13), ενώ η μετάδοση των νοσημάτων μπορεί να οφείλεται:

- Στην παρουσία μικροοργανισμών μέσα στο νερό, με απευθείας κατανάλωσή του (νερό, παγάκια), ή κατανάλωση τροφίμων (λαχανικά, φρούτα, χυμοί) που έρχονται σε επαφή με αυτό
- Στην μη επαρκή ποσότητα καθαρού νερού, με αποτέλεσμα κακές συνθήκες υγιεινής ή μη τήρηση των κανόνων υγιεινής και επαφή με μολυσμένα αντικείμενα ή ζώα
- Σε ενδιάμεσους υδατογενείς ξενιστές (π.χ. κουνούπια) (Παπαδοπούλου, 2014b).



Σχήμα 13: Απεικόνιση παγκόσμιας προσβασιμότητας σε καθαρό πόσιμο νερό για το έτος 2011 (WHO, 2011).

Οι υδατογενείς επιδημίες από πόσιμο νερό προκαλούνται από ένα πλήθος βακτηρίων, ιών και παρασίτων, συχνότεροι εκπρόσωποι των οποίων αποτελούν το *C. jejuni*, οι νοροϊοί και το *Cryptosporidium* spp αντίστοιχα. Οι αιτιολογικοί παράγοντες σε ότι αφορά τις υδατογενείς λοιμώξεις από πόσιμο νερό δεν φαίνεται να διαφέρουν ουσιαστικά σε σχέση με λοιμώξεις άλλων πηγών προέλευσης, ωστόσο σε πολλές περιπτώσεις δύσκολα καταγράφονται από τα προγράμματα επιτήρησης και υποεκτιμώνται (Mac Kenzie, et al, 1994, Jakopanec, et al, 2008, Riera-Montes, et al, 2011) (Σχήμα 14).



Σχήμα 14: Υδατογενείς επιδημίες από φυσικό νερό και αιτιολογία (1971-2014, ΗΠΑ) (CDC, 2014).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΕΠΙΔΗΜΙΩΝ ΑΠΟ *E. coli* ΣΕ ΠΟΣΙΜΟ ΝΕΡΟ

5.1. Διεθνείς αναφορές

Αποτελέσματα διαφόρων επιδημιολογικών μελετών αναδεικνύουν την παρουσία της *E. coli* στο πόσιμο νερό ως ένα μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας. Σύμφωνα με τη μελέτη των Adzitey et al (2015), που διεξήχθη για τον προσδιορισμό της εμφάνισης *E. coli* σε πηγές πόσιμου νερού που χρησιμοποιούνται από ανθρώπους και αγροτικά ζώα σε μία αγροτική κοινότητα της Γκάνας, η απομόνωση του μικροοργανισμού βασίστηκε σε μία τροποποιημένη μέθοδο (Bacteriological Analysis Manual) που εφαρμόζεται από τον FDA των ΗΠΑ. Συνολικά 200 δείγματα νερού συλλέχθηκαν από έξι διαφορετικές πηγές νερού (βρύση, πηγάδι, φράγματα, βρόχινο, εμφιαλωμένο, ποτίστρες ζώων). Η μέση εμφάνιση της *E. coli* στα διάφορα δείγματα νερού ήταν 29%. Η συχνότερη εμφάνιση αφορούσε στο νερό από πηγάδι (100%), ακολουθούμενη από δείγματα νερού προερχόμενα από ποτίστρες (80%), φράγματος (65%), βροχής (50%), και βρύσης (10%). Όλα τα δείγματα νερού από φλασκία (n=80) και από μπουκάλια (n=20) ήταν αρνητικά για *E. coli*. Η έρευνα αυτή έδειξε ότι οι κάτοικοι στη συγκεκριμένη επαρχία διατρέχουν άμεσο κίνδυνο προσβολής από υδατογενή λοίμωξη προερχόμενη από *E. coli*, δεδομένου ότι ένα μεγάλο ποσοστό πηγών πόσιμου νερού μολύνονται με το συγκεκριμένο εντεροβακτηριακό.

Σε άλλη μελέτη που διεξήχθη σε ένα χωριό της Σκωτίας, πληθυσμού 1100 ατόμων, μολύνθηκε το νερό στο οποίο απορρίφθηκαν επεξεργασμένα λύματα από τη δημόσια ύδρευση. Από τους 765 κατοίκους και τους εργαζόμενους που ανέφεραν ασθένεια, οι 711 είχαν γαστρεντερικά συμπτώματα και οι 633 ορίστηκαν ως περιστατικά. Η ανάλυση ύδατος του δικτύου έδειξε υψηλά ποσοστά κολοβακτηρίων κοπράνων. Το ξέσπασμα της μόλυνσης από καμπυλοβακτήριο και *E coli* 0157 επιβεβαιώθηκε βακτηριολογικά σε οκτώ και έξι άτομα αντίστοιχα. Δύο από τα τελευταία ανέπτυξαν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο. Όλα τα προσβεβλημένα από την ασθένεια άτομα παρουσίασαν τελικά πλήρη ανάκαμψη της υγείας τους. Προσφέρθηκε φυσιολογική ανοσοσφαιρίνη σε άτομα ηλικίας μεταξύ έξι μηνών και 40 ετών και ανοσοποιήθηκαν 618 άτομα. Παράλληλα, οι εξετάσεις σιέλων τέσσερις μήνες μετά το περιστατικό επιβεβαίωσαν ότι δεν είχε εμφανιστεί εστία ηπατίτιδας Α. Σε ένα ερωτηματολόγιο παρακολούθησης, οι κάτοικοι γενικά εξέφρασαν την

ευχαρίστησή τους σχετικά με την ιατρική ανταπόκριση στο περιστατικό, αν και πολλοί ανέφεραν ότι εξακολουθούν να ανησυχούν. Τα δύο μεγάλα ιατρικά ζητήματα που προέκυψαν από αυτή την εστία ήταν η σημασία της αποτελεσματικής επικοινωνίας και της καταλληλότητας της προσφοράς ανθρώπινης φυσιολογικής ανοσοσφαιρίνης μετά την έκθεση (Jones & Roworth, 1996).

Στην μελέτη των Min και Baeumner (2002), αναπτύχθηκε μια πολύ ευαίσθητη και ειδική μέθοδος ανάλυσης για την ανίχνευση βιώσιμου *Escherichia coli* ως οργανισμού δείκτη σε νερό, χρησιμοποιώντας ανάλυση ενίσχυσης με βάση την αλληλουχία νουκλεϊκού οξέος (NASBA) και ανάλυση ηλεκτροχημειοφωταύγειας (ECL). Τα βιώσιμα στελέχη *E. Coli* ταυτοποιήθηκαν μέσω μιας αλληλουχίας στόχου μήκους 200-nt από το mRNA (*clpB*) που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη θερμικού σοκ. Στην ανίχνευση, εφαρμόστηκε θερμικό σοκ στα κύτταρα πριν από τη διακοπή για την επαγωγή της σύνθεσης του *clpB* mRNA και το mRNA εκχυλίστηκε, καθαρίστηκε και τελικά ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας NASBA. Το ενισχυμένο mRNA ποσοτικοποιήθηκε με ένα σύστημα ανίχνευσης ECL μετά από υβριδισμό με ειδικούς ανιχνευτές DNA. Παράλληλα, ερευνήθηκαν Διάφορες μέθοδοι διάσπασης για τη μεγιστοποίηση του συνολικού RNA που εξήχθη από βιώσιμα κύτταρα. Διεξήχθη επίσης βελτιστοποίηση όσον αφορά το σχεδιασμό ζευγών εκκινητών NASBA και ανιχνευτών ανίχνευσης, καθώς και συνθηκών αντίδρασης και ανίχνευσης. Τέλος, ο προσδιορισμός δοκιμάστηκε όσον αφορά την ευαισθησία και την εξειδίκευση. Η ανάλυση των δειγμάτων αποκάλυψε ότι μπορούν να ανιχνευθούν μόλις 40 κύτταρα *E. Coli*/ mL, χωρίς ψευδώς θετικά σήματα που προκύπτουν από άλλους μικροοργανισμούς ή μη βιώσιμα κύτταρα *E. Coli*. Επίσης, αποδείχθηκε ότι ήταν δυνατή η ποσοτικοποίηση των κυττάρων *E. Coli* με τη μέθοδο ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε.

Από την άλλη, ο Rice και οι συνάδελφοι του, σε μια μελέτη που αφορούσε την επιβίωση του *Escherichia coli* O157: H7 σε πόσιμο νερό που σχετίζεται με εστία αιμορραγικής κολίτιδας, ανέφεραν ότι τα χαρακτηριστικά επιβίωσης ήταν παρόμοια για δύο στελέχη του *Escherichia coli* O157: H7 και ένα τυπικό στέλεχος δείκτη *E. Coli* σε μια φορητή πηγή υπογείων υδάτων. Η απόκλιση ήταν πιο γρήγορη στους 20 °C από ό,τι στους 5 °C. Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοστών επιβίωσης για τα εξεταζόμενα στελέχη.

Σε άλλη μελέτη που διεξήχθη σε αγροτική περιοχή της Καμπότζης, μελετήθηκε η συσχέτιση του κολοβακτηριδίου και του πόσιμου νερού των νοικοκυριών σε συνάρτηση με την εμφάνιση διαρροϊκής νόσου. Έτσι, σε χρονικό διάστημα 22 εβδομάδων με τακτική καταγραφή δύο φορές την εβδομάδα σε 180 νοικοκυριά, τα αποτελέσματα έδειξαν μία αισθητή συσχέτιση της συγκέντρωσης *E. coli* στο πόσιμο νερό των νοικοκυριών με την εμφάνιση διαρροϊκού συνδρόμου και δυσεντερίας (Brown et al, 2008).

Οι Fakhr et al (2016), ορθά ανέφεραν ότι η περιττωματική μόλυνση του πόσιμου νερού είναι ένα μείζον πρόβλημα υγείας που συνοδεύεται από διαρροϊκό σύνδρομο κυρίως σε ευαίσθητες πληθυσμιακές ομάδες όπως βρέφη και ταξιδιώτες. Επιπλέον, η αυξημένη αντιμικροβιακή αντοχή των απομονωθέντων βακτηρίων περιπλέκει το πρόβλημα περαιτέρω. Για την έρευνα που διεξήχθη με σκοπό τη μελέτη της προέλευσης της κοπρανώδους μόλυνσης του πόσιμου ύδατος στην πόλη Zagazig της Αιγύπτου, εξετάστηκαν συνολικά 300 δείγματα πόσιμου νερού για την παρουσία και τον έλεγχο ευαισθησίας της *E. coli* σε σχέση με την πληθυσμιακή κατανομή, την πηγή του νερού καθώς και την ποιότητα και κατάσταση του δικτύου ύδρευσης και των σωληνώσεων. Απομονώθηκαν συνολικά 16 στελέχη εντεροτοξινογόνων, εντεροπαθογόνων και εντεροαιμορραγικών στελεχών *E. coli* για τα οποία πραγματοποιήθηκε έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά. Η πιθανότητα κοπρανώδους μόλυνσης των υδάτων συσχετίστηκε με την αυξημένη πληθυσμιακή συγκέντρωση, την αυξημένη απόσταση από το εργοστάσιο νερού Zagazig και την ποιότητα κατασκευής των σωληνώσεων νερού από αμίαντο και τσιμέντο. Όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν εμφάνισαν αντοχή σε τουλάχιστον ένα αντιμικροβιακό παράγοντα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει υψηλός κίνδυνος υδατογενών λοιμώξεων από ανθεκτικά στελέχη *E. coli* σε κοινότητες με χαμηλό βιοτικό επίπεδο, κυρίως δε με παλαιά συστήματα διανομής νερού.

Σε άλλη μελέτη των Ramteke και Tewari (2007), 57 ανθεκτικά στελέχη σε ποικίλα αντιβιοτικά καθώς και σε βαρέα μέταλλα απομονώθηκαν από συνολικά 188 πηγές πόσιμων υδάτων σε αγροτικές περιοχές της Ινδίας. Τα στελέχη αυτά ανήκαν σε όλες τις παθογόνες οροομάδες της *E. coli* (ETEC, EPEC, VTEC).

Σε μελέτη των Nazemi et al (2017), αναφέρεται ότι το νερό πρέπει να είναι απαλλαγμένο από επικίνδυνους παράγοντες και να είναι σε θέση να καλύπτει τις

διατροφικές ανάγκες των ανθρώπων και των ζώων. Η επαρκής και αξιόπιστη παροχή νερού είναι επίσης απαραίτητη για τη ζωική παραγωγή. Η μελέτη αυτή διεξήχθη στην περιοχή Sistan και Baluchistan, στο Ιράν, για την αξιολόγηση του ποσοστού ρύπανσης του πόσιμου νερού και των πηγών ύδατος με *E. coli*. Συλλέχθηκε ένας συνολικός αριθμός 100 δειγμάτων ύδατος και χωρίστηκε σε ομάδες ύδατος κατάλληλων και ακατάλληλων για ανθρώπινη χρήση. Το μη πόσιμο νερό κατηγοριοποιήθηκε ανάλογα με τον τύπο ροής, την χρήση άρδευσης, τον τύπο προσβασιμότητας και τη γεωγραφική θέση. Το τρεχούμενο νερό ήταν περισσότερο μολυσμένο από το στάσιμο στην περιοχή μελέτης.

Στη μελέτη των Patoli et al (2014), εξετάστηκε ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά της *E. coli* που απομονώθηκε από δείγματα πόσιμου νερού προερχόμενα από την πόλη Hyderabad του Πακιστάν. 42 δείγματα πόσιμου νερού συλλέχθηκαν από διάφορα σημεία και η *E. coli* απομονώθηκε από το 64,29% των δειγμάτων. Η μέγιστη αντοχή παρατηρήθηκε έναντι του ναλιξιδικού οξέος (92,6%), ακολουθούμενη από την αμπικιλίνη (88,89%), την κεφτριαξόνη (40,74%), την σιπροφλοξασίνη (37,04%), την κεφταζιδίμη (25,23%), την κεφοταξίμη (18,52%) και τη γενταμυκίνη (18,52%), ενώ όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στην αμικασίνη. Πολυανθεκτικότητα εμφανίστηκε στο 62,9% των απομονωθέντων στελεχών, επιβεβαιώνοντας ότι το πόσιμο νερό σε αστικές περιοχές του Πακιστάν είναι μολυσμένο από πολυανθεκτικό κολοβακτηρίδιο. Πηγή της μόλυνσης αυτής μπορεί να είναι η ανάμειξη των λυμάτων με την παροχή πόσιμου νερού. Η παρουσία πολυανθεκτικών στελεχών στο πόσιμο νερό μπορεί να λειτουργήσει ως μέσο για τη διάδοση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά και σε άλλα βακτήρια. Αυτό υποδηλώνει την ανάγκη εκπαίδευσης των κατοίκων από τις αρμόδιες αρχές σχετικά με την ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών και την ασφαλή διαχείριση των αποβλήτων που περιέχουν αντιβιοτικά.

Σε άλλη μελέτη 155 δείγματα ύδατος συλλέχθηκαν από επιλεγμένες πηγές πόσιμου νερού στη βόρεια Τανζανία. Η *E. coli* απομονώθηκε από το 71% των δειγμάτων νερού και από τα 1819 στελέχη *E. coli* που ελέγχθηκαν με αντιβιογράμμο, το 46,9% ήταν ανθεκτικά σε ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά. Η ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη, στρεπτομυκίνη, σουλφαμεθοξαζόλη, τετρακυκλίνη και τριμεθοπρίμη ήταν σημαντικά υψηλότερη (15-30%) σε σύγκριση με άλλα εξεταζόμενα αντιβιοτικά. Από τα απομονωθέντα στελέχη που ήταν ανθεκτικά σε β-λακταμικά αντιβιοτικά,

κυριαρχούσε το bla TEM-1 (67%) ακολουθούμενο από το bla CTX-M (17,7%) και το bla SHV-1 (6,0%). Μεταξύ των ανθεκτικών στην τετρακυκλίνη στελεχών, υπερίσχυσε το tetA (57.4%) ακολουθούμενο από το tetB (24.0%). Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η παροχή πόσιμου νερού στη βόρεια Τανζανία μπορεί να αποτελέσει πηγή μόλυνσης με πολυανθεκτική στα αντιβιοτικά *E. coli* (Lyimo et al, 2016).

Εκτενείς μελέτες προέρχονται και από ανεπτυγμένες χώρες με προηγμένα συστήματα υποδομών. Στη ΝΑ Αυστραλία, 28 στελέχη *E. coli* απομονώθηκαν με μοριακές τεχνικές από δείγματα επεξεργασμένου πόσιμου νερού. Με γονιδιωματική αλληλούχιση ταυτοποιήθηκαν γονίδια μολυσματικότητας καθώς και αντοχής, ενώ τα γενετικά χαρακτηριστικά των απομονωθέντων στελεχών έδειξαν ότι τέσσερα προϊόντα απομόνωσης ήταν πιθανά ανθρώπινα παθογόνα. Ωστόσο, αυτά τα προϊόντα απομόνωσης δεν ανιχνεύθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις για να εγκυμονούν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Τα στελέχη *E. coli* από το νερό μπορούν είτε να (i) προέρχονται από τον άνθρωπο, δηλώνοντας την πρόσφατη μόλυνση του νερού από κόπρανα, (ii) είναι διαρροϊκά παθογόνα (iii) είναι εξω-εντερικά παθογόνα που ενέχουν άμεσο κίνδυνο για την υγεία, ή (iv) είναι ελεύθερα διαβιόντα. Εννέα απομονωθέντα στελέχη συνδέονταν με το νερό με ελεύθερα διαβιόντα στελέχη που ήταν απίθανο να συσχετισθούν με κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Μόνο ένα προϊόν απομόνωσης είχε γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά (Blyton και Gordon, 2017).

Από τους Liu et al (2008), έχει αναπτυχθεί μια ευαίσθητη μέθοδος για ειδική ανίχνευση βιώσιμων κυττάρων *Escherichia coli* O157: H7, συμπεριλαμβανομένων βιώσιμων αλλά μη-καλλιεργήσιμων (VBNC) κυττάρων, σε δείγματα ύδατος. Αυτή η μέθοδος περιελάμβανε τη σύλληψη των βακτηριακών κυττάρων σε μια μεμβράνη με χαμηλή πρωτεΐνη και την άμεση εκχύλιση και καθαρισμό του RNA ακολουθούμενη από αντίστροφη μεταγραφή-PCR και ανίχνευση ηλεκτρονικών μικροσυστοιχιών των γονιδίων *rfbE* και *fliC* του *E. Coli* O157: H7. Ανίχνευσε μόλις 1 CFU του *E. Coli* O157: H7 σε αραιωμένες καλλιέργειες, 3 έως 4 CFU / λίτρο σε νερό βρύσης, 7 CFU / λίτρο σε νερό ποταμού και 50 κύτταρα VBNC σε 1 λίτρο νερού ποταμού, όριο ανίχνευσης που αναφέρεται μέχρι σήμερα για τα κύτταρα VBNC σε περιβαλλοντικά δείγματα νερού.

Σκοπός της έρευνας των Ibrahimagic et al (2015) ήταν η διερεύνηση της επικράτησης της *E. coli* σε δείγματα πόσιμου νερού που συλλέχθηκαν από αγροτικές και αστικές περιοχές σε περιοχή της Βοσνίας και Ερζεγοβίνης με πληθυσμό περίπου 500.000 κατοίκων. Συνολικά, 1080 και 2206 δείγματα νερού από αστικά και αγροτικά δίκτυα ύδρευσης ελήφθησαν επί ένα έτος σύμφωνα με τα πρωτόκολλα του τοπικού Εργαστηρίου Υγιεινής και Κλινικής Μικροβιολογίας (Cantonal Public Health Institute of Canton Zenica-Doboj). Η μέθοδος διήθησης μεμβρανών χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων πόσιμου νερού, σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα. Από το σύνολο των 1080 δειγμάτων νερού από την αστική παροχή νερού, 5,5% ήταν θετικά για *E. coli*, ενώ από την αγροτική παροχή ύδατος το ποσοστό ανήλθε στο 25,4%. Συμπερασματικά η απομόνωση μικροβιακών στελεχών σε μεγαλύτερα ποσοστά από δίκτυα ύδρευσης αγροτικών και ημιαστικών περιοχών σε σχέση με τις αστικές περιοχές, ενισχύει την ανάγκη αυξημένων μέτρων επιτήρησης και παρακολούθησης της μικροβιολογικής ποιότητας των υδάτων καθώς και μέτρων πρόληψης με συχνές δειγματοληψίες.

Σε άλλη έρευνα των Juhna et al (2007), για την άμεση ανίχνευση του *Escherichia coli* σε επιφάνειες σωλήνων σε δίκτυα διανομής πόσιμου νερού χρησιμοποιήθηκε υβριδοποίηση in situ φθορισμού (FISH). Απομωνώθηκαν σωλήνες από παλαιό χυτοσίδηρο από τα δίκτυα διανομής νερού στη Γαλλία, την Αγγλία, την Πορτογαλία και τη Λετονία και αναλύθηκαν για στελέχη *E. Coli* σε βιοφίλμ. Επιπροσθέτως, 44 επίπεδες στρώσεις από χυτοσίδηρο, πολυβινυλοχλωρίδιο ή ανοξείδωτο χάλυβα τοποθετήθηκαν και συνεχώς εκτέθηκαν σε νερό σε 15 τοποθεσίες 6 δικτύων διανομής στη Γαλλία και τη Λετονία και εξετάστηκαν μετά από 1 έως 6 μήνες έκθεσης στο πόσιμο νερό. Προκειμένου να αυξηθεί η ένταση, χρησιμοποιήθηκε ένας ανιχνευτής πεπτιδικού νουκλεϊκού οξέος (PNA) στη διαλογή FISH για την παρουσία ή απουσία *E. Coli* στην επιφάνεια σωλήνων και τμημάτων, μειώνοντας έτσι τυχόν προβλήματα αυτοφθορισμού και χαμηλού φθορισμού των σημασμένων βακτηρίων. Για να τεθούν σε σύγκριση, τα κύτταρα απομακρύνθηκαν από τις επιφάνειες και εξετάστηκαν με μεθόδους καλλιέργειας ή ενζυματικής (ανίχνευσης β-δ-γλυκουρονιδάσης). Πραγματοποιήθηκε πρόσθετη επαλήθευση χρησιμοποιώντας PCR. Η μέθοδος καλλιέργειας έδειξε την παρουσία *E. Coli* σε έναν από τους πέντε σωλήνες, ενώ όλοι οι σωλήνες ήταν θετικοί με την χρήση των μεθόδων FISH. Στελέχη *E. Coli* ανιχνεύθηκαν στο 56% των τμημάτων

χρησιμοποιώντας PNA FISH, αλλά δεν ανιχνεύθηκε *E. Coli* χρησιμοποιώντας καλλιεργητικές ή ενζυματικές μεθόδους. Οι αναλύσεις PCR επιβεβαίωσαν την παρουσία *E. Coli* σε δείγματα που ήταν αρνητικά σύμφωνα με μεθόδους που βασίζονται σε καλλιέργειες και ενζυματικές μεθόδους. Η βιωσιμότητα των κυττάρων *E. Coli* στα δείγματα καταδείχθηκε από την επιμήκυνση του κυττάρου μετά την αναζωογόνηση σε θρεπτικό μέσο χαμηλού θρεπτικού περιεχομένου συμπληρωμένο με πιπεριμινικό οξύ, υποδηλώνοντας ότι τα κύτταρα ήταν παρόντα σε μια ενεργή αλλά μη καλλιεργήσιμη κατάσταση, μη ικανά να αναπτυχθούν σε μέσα άγαρ. Το *E. Coli* συνέβαλε σε περίπου 0.001 έως 0.1% του συνολικού αριθμού των βακτηρίων στα δείγματα. Η παρουσία και ο αριθμός των *E. Coli* δεν συσχετίζονται με κανένα φυσικό ή / και χημικό χαρακτηριστικό του πόσιμου νερού (π.χ. θερμοκρασία, χλώριο ή βιοδιασπάσιμη συγκέντρωση οργανικής ύλης). Οι ερευνητές απέδειξαν ότι το *E. Coli* είναι παρόν στα βιοφίλμ των δικτύων πόσιμου νερού στην Ευρώπη. Ορισμένα από τα κύτταρα είναι μεταβολικά δραστικά αλλά συχνά δεν ανιχνεύονται εξαιτίας περιορισμών των παραδοσιακά χρησιμοποιούμενων μεθόδων καλλιέργειας, γεγονός που υποδηλώνει ότι το βιοφίλμ θα πρέπει να θεωρείται ως στοιχείο που πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω προκειμένου να εκτιμηθεί ο κίνδυνος για την ανθρώπινη υγεία.

Έρευνες ωστόσο έχουν πραγματοποιηθεί και σε πειραματικά μοντέλα όπου εξετάζονται οι συνθήκες επιβίωσης των μικροοργανισμών και ο δυνητικός κίνδυνος έκθεσης και λοίμωξης του ανθρώπου. Έτσι, οι Artz και Killham (2002) μελέτησαν τα χαρακτηριστικά επιβίωσης της *E. coli* O157:H7 σε ιδιωτικά πηγάδια πόσιμου νερού προκειμένου να εκτιμηθεί η πιθανότητα έκθεσης του ανθρώπου. Ένα ανασυνδυασμένο μη τοξινογόνο στέλεχος του βακτηρίου ενοφθαλμίστηκε σε νερό πηγαδιού από τέσσερις διαφορετικές θέσεις στη Βορειοανατολική Σκωτία. Τα νερά αυτά διέφεραν σημαντικά στα περιεχόμενα των βαρέων μετάλλων καθώς και στις συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών και βακτηρίων. Η επιβίωση της *E. coli* O157:H7 μειώθηκε πρωτίστως από τις αυξημένες συγκεντρώσεις χαλκού, ενώ σημαντικό ρόλο φαίνεται πως διαδραμάτισε και η παρουσία πρωτοζώων καθώς και άλλων μετάλλων και θρεπτικών συστατικών.

5.2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση για την Ελλάδα

Η λοίμωξη από εντεροαιμορραγικό κολοβακτηρίδιο αποτελεί σπάνιο δηλούμενο νόσημα για τη χώρα μας, αν λάβουμε υπόψη ότι για το χρονικό διάστημα 2004-2016 δηλώθηκαν μόλις 12 σποραδικά κρούσματα (0,08 κρούσματα/1 εκ. πληθυσμού), χωρίς καταγραφή κάποιας επιδημίας ή συρροής κρουσμάτων. Βέβαια η στατιστική διαφορά με την αντίστοιχη επίπτωση στην Ευρωπαϊκή Ένωση (15,2 κρούσματα/ 1 εκ. πληθυσμού), ενισχύει την πιθανότητα για πιθανή υποδήλωση στο σύστημα επιτήρησης (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2017) (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Δηλωθέντα κρούσματα από ΕΗΕC στην Ελλάδα, 2004-2016.

ΕΤΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ
2004	2
2005	0
2006	1
2007	1
2008	0
2009	0
2010	1
2011	1
2012	0
2013	2
2014	1
2015	1
2016	2
ΣΥΝΟΛΟ	12

Το χρονικό διάστημα 2004-2010 καταγράφηκαν μέσω του συστήματος επιτήρησης 12 υδατογενείς επιδημίες, έξι εκ των οποίων ήταν βακτηριακής αιτιολογίας και έξι ιογενούς ή αγνώστου αιτιολογίας. Όπως προκύπτει από τα καταγεγραμμένα στοιχεία δεν προκύπτει δηλωθείσα επιδημία από *E. coli* (Πίνακες 12, 13) (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012).

Πίνακας 12: Δηλωθείσες υδατογενείς επιδημίες βακτηριακής αιτιολογίας, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων, 2004-2010.

Έτος	Περιφέρεια	Αριθμός ασθενών	Αριθμός νοσηλευόμενων	Αριθμός θανάτων	Αιτιολογικός παράγοντας
2004	Δ. Ελλάδα	526	13	0	Salmonella spp.
2004	Αττική	2	2	0	Salmonella spp.
2004	Κρήτη	37	0	0	S. typhimurium
2004	Θεσσαλία	125	43	0	Shigella flexneri
2009	Πελ/νησος	3	1	0	Salmonella spp.
2009	Κρήτη	54	14	0	C. jejuni

Πίνακας 13: Δηλωθείσες πιθανές υδατογενείς επιδημίες ιογενούς ή αγνώστου αιτιολογίας, Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων, 2004-2010.

Έτος	Περιφέρεια	Αριθμός κρουσμάτων	Αριθμός νοσ/μενων	Αριθμός θανάτων	Αιτιολογικός παράγοντας
2004	Στερεά Ελλάδα	22	7	0	Άγνωστος
2005	Αν. Μακεδονία/Θράκη	365	0	0	Άγνωστος
2005	Αν. Μακεδονία/Θράκη	702	0	0	Norovirus
2006	Στερεά Ελλάδα	43	9	0	Άγνωστος
2006	Αν. Μακεδονία/Θράκη	721	0	0	Norovirus
2010	Ν. Αιγαίου	166	37	0	Norovirus

Στη μελέτη των Arvantidou et al (2003), στόχος ήταν η αξιολόγηση της εμφάνισης, της ταυτότητας και της αντιμικροβιακής αντοχής Gram-αρνητικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από δημοτικά ύδατα, επεξεργασμένο νερό και διαλύματα και των 85 ελληνικών κέντρων αιμοκάθαρσης. Συνολικά 141 Gram-αρνητικά βακτήρια (98 αζυμωτικά και 43 εντεροβακτηριακά) απομονώθηκαν από 255 δείγματα νερού. Είκοσι τέσσερα από αυτά απομονώθηκαν από το νερό της βρύσης, 31 από το επεξεργασμένο νερό και 86 από τα δείγματα διαλυμάτων. Τα συνηθέστερα απομονωθέντα στελέχη, κατά σειρά συχνότητας, ήταν *Pseudomonas aeruginosa* (22,7%), *Chryseobacterium meningosepticum* (14,9%), *Stenotrophomonas*

maltophilia (13,5%), *Escherichia coli* (12,8%) και *Enterobacter cloacae* (7,8%), αντιπροσωπεύοντας το 71,6% των απομονωθέντων βακτηρίων. Το 90% των εντεροβακτηριακών ήταν ανθεκτικά έναντι τριών ή περισσότερων από τα εννέα αντιβιοτικά που εξετάστηκαν.

Οι Parasidis et al (2007), αναφέρουν ξέσπασμα οξείας γαστρεντερίτιδας μεταξύ Ελλήνων μαθητών μετά από διήμερη εκδρομή στα τέλη Απριλίου 2007. Ογδόντα-πέντε παιδιά, συνοδευόμενα από τέσσερις δασκάλους, ταξίδευαν με λεωφορείο από μια περιοχή στη δυτική Ελλάδα προς την κεντρική Ελλάδα. Η εκδρομή ξεκίνησε στις 29 Απριλίου. Κατά τη διάρκεια του ταξιδιού επιστροφής στις 30 Απριλίου, μεγάλος αριθμός παιδιών άρχισε να παρουσιάζει συμπτώματα οξείας γαστρεντερίτιδας. Το ξέσπασμα συνεχίστηκε την 1η Μαΐου. Από τους 85 μαθητές, 63 ήταν άρρωστοι (ποσοστό επίθεσης 74%), αλλά κανένας από τους δασκάλους δεν επηρεάστηκε. Δεκαοκτώ παιδιά νοσηλεύθηκαν. Λαμβάνοντας υπόψη την κλινική παρουσίαση των περιστατικών και τα διαθέσιμα εργαστηριακά αποτελέσματα, η ομάδα έρευνας για την εμφάνιση ξεσπάσματος πρότεινε τον νοροϊό που μεταδίδεται με την τροφή ως πιθανή αιτία της επιδημίας. Συλλέχθηκαν δείγματα κοπράνων στις 30 Απριλίου από πέντε από τους ασθενείς και στάλθηκαν για εργαστηριακή ανάλυση. Παρόλο που όλοι οι ασθενείς κλήθηκαν να υποβάλουν δείγματα κοπράνων, μόνο πέντε το έκαναν, λόγω του μικρού χρόνου που οι ασθενείς παρέμειναν στο νοσοκομείο. Δείγματα από τους υπόλοιπους 58 ασθενείς δεν ήταν διαθέσιμα επειδή δεν μπορούσαν να επιτευχθούν ή αρνήθηκαν να τα παράσχουν. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν για την παρουσία βακτηριδίων (*Salmonella* spp., *Enterococci*, *S. aureus*, *E. Coli*) ή παράσιτα (*Cryptosporidium* και *Giardia*), αλλά ήταν αρνητικά. Πρόσθετα δείγματα κοπράνων από τους ίδιους πέντε νοσηλευόμενους ασθενείς συλλέχθηκαν την 1η Μαΐου και εξετάστηκαν για την παρουσία νοροϊού σε δοκιμασία RT-PCR. Χρησιμοποιήθηκαν δύο σειρές εκκινητών, οι οποίοι διακρίνουν μεταξύ του γονότυπου I ή του γονότυπου II του νοροϊού. Και τα πέντε δείγματα ήταν θετικά για νοροϊό τύπου II. Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε με την αλληλούχιση του προϊόντος PCR. Στο πλαίσιο της περιβαλλοντικής έρευνας, πραγματοποιήθηκε μικροβιολογική ανάλυση του νερού της βρύσης από το σύστημα διανομής νερού στον τόπο προορισμού στην κεντρική Ελλάδα. Δεν ανιχνεύθηκαν ούτε βακτήρια δείκτη περιττωμάτων ούτε νοροϊός.

Στην έρευνα των Papandreou et al (2000), εξετάσθηκε η ευαισθησία 239 Gram-αρνητικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από το παλιό δίκτυο διανομής πόσιμου νερού της Πάτρας στη νοτιοδυτική Ελλάδα, σε 20 αντιμικροβιακούς παράγοντες. Τα Gram-αρνητικά βακτηρίδια που εξετάστηκαν ήταν: *Enterobacteriaceae* (n=62), *Pseudomonas* spp (n=145), *Vibrionaceae* (n=24), *Chromobacter* spp (n=3), *Acinetobacter* spp (n=2) και άλλα (n=4). Τα υψηλότερα επίπεδα αντοχής στα αντιβιοτικά ελήφθησαν για την κεφαλοθίνη (86,7%), την αμπικιλλίνη (77,5%) και την καρβενικιλλίνη (71%) ακολουθούμενες από την κεφοξιτίνη (55,4%) και την κεφουροξίμη (51,2%). Επιτεύχθηκαν επίπεδα ενδιάμεσης αντοχής για την τικαρκιλίνη (31,3%), την κεφτιζοξίμη (31,2%), την χλωραμφενικόλη (30,3%) και την κεφοτένη (25,2%). Χαμηλά επίπεδα αντίστασης ελήφθησαν για την κεφοταξίμη (17,9%), την κεφτριαξόνη (12,5%), την τετρακυκλίνη (11,9%), την τριμεθοπρίμη / σουλφαμεθοξαζόλη (7,4%) και την πιπερακιλλίνη (2,4%). Συνολικά το 91,3% των Gram-αρνητικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από το πόσιμο νερό ήταν πολυανθεκτικά. Δεν βρέθηκαν ανθεκτικά στελέχη σε κινολόνες, αμινογλυκοσίδες, ιμιπενέμη, αζτρεονάμη, κεφταζιδίμη.

Τέλος, σε μελέτη των Vantarakis et al (2005), 128 στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν από δείγματα νερού, εξετάσθηκαν ως προς την ευαισθησία τους στα αντιβιοτικά, με ταυτόχρονο προσδιορισμό της πηγής κοπρανόδους προέλευσης των υδάτων. Ο προσδιορισμός της πηγής κοπρανόδους μόλυνσης καθιστά δυνατή την πρόβλεψη πιθανού κινδύνου για τη δημόσια υγεία και την εφαρμογή κατάλληλων σχεδίων διαχείρισης για την πρόληψη περαιτέρω μόλυνσης.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ποιότητα του πόσιμου νερού διαδραματίζει σπουδαιότατο ρόλο στη δημόσια υγεία, καθώς το νερό είναι ο σημαντικότερος παράγοντας επιβίωσης των οργανισμών και του ανθρώπινου είδους. Τρεις στους πέντε ανθρώπους στις αναπτυσσόμενες χώρες δεν έχουν πρόσβαση σε ασφαλές πόσιμο νερό και μόνο ένας στους τέσσερις έχει πρόσβαση σε ασφαλές δίκτυο αποχέτευσης. Περίπου 1,5 δις του ανθρώπινου δυναμικού του πλανήτη εξαρτώνται από πηγές νερού που δεν πληρούν τις προδιαγραφές ασφαλούς χρήσης. Περίπου το 33% της νοσηρότητας παγκοσμίως προέρχεται από την πρόσληψη νερού κακής ποιότητας, με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας ιδιαίτερα στις ηλικιακή ομάδα κάτω των 5 ετών, ενώ και οι περισσότερες από τις άλλες ασθένειες συνδέονται επίσης έμμεσα με το νερό.

Η παρουσία παθογόνων στο νερό είναι πολλές φορές δύσκολο να εκτιμηθεί με τις διαθέσιμες εργαστηριακές μεθόδους. Η πιο συνηθισμένη δοκιμή, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί για σχεδόν ένα αιώνα, είναι η ανίχνευση κολοβακτηριδίων ως δείκτης της βακτηριολογικής ασφάλειας του πόσιμου νερού, καθώς η παρουσία του υποδηλώνει κοπρανώδη μόλυνση. Η καταγραφή ασθενειών που προκαλούνται από μολυσμένο νερό με *E. coli* αντιπροσωπεύουν ένα μεγάλο ποσοστό των υδατογενών λοιμώξεων παγκοσμίως. Επιπρόσθετα, η εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών που παράγουν ευρέος φάσματος β-λακταμάσες και καρβαπενεμάσες, καθιστούν την αντιμικροβιακή αντοχή ως το βασικότερο πρόβλημα δημόσιας υγείας του αιώνα μας. Η μόλυνση του νερού σαν αποτέλεσμα της μόλυνσης του περιβάλλοντος, μέσω ανεπεξέργαστων λυμάτων, φαρμακευτικών και χημικών ουσιών, αυξάνει την εμφάνιση πολυανθεκτικών βακτηρίων στο περιβάλλον, ενώ τα πεπαλαιωμένα δίκτυα ύδρευσης και αποχέτευσης σε πολλά αστικά και ημιαστικά κέντρα καθώς και η πλήρης απουσία στοιχειωδών υποδομών σε αναπτυσσόμενες χώρες διογκώνουν διαχρονικά το πρόβλημα.

Η εξασφάλιση ασφαλούς πρόσβασης σε ασφαλές για ανθρώπινη χρήση νερό, η ανανέωση και εξυγίανση των δικτύων παροχής, η εκπαίδευση του καταναλωτικού κοινού και οι ατομικές πρακτικές όπως η χρήση φίλτρων στις βρύσες των σπιτιών, η εφαρμογή νέων εργαστηριακών μεθόδων απομόνωσης των παθογόνων αλλά και επεξεργασίας του νερού, η καλύτερη επιτήρηση και καταγραφή των επιδημιών,

καθώς και η θέσπιση και εφαρμογή ισχυρού νομικού πλαισίου, μπορούν να περιορίσουν τη μόλυνση του πόσιμου νερού και κατά επέκταση την εμφάνιση υδατογενών λοιμώξεων.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της αντοχής στα αντιβιοτικά στελεχών *E. coli* που απομονώνονται από πόσιμο νερό. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με βιβλιογραφική ανασκόπηση σε πέντε συνολικά ενότητες. Στην πρώτη ενότητα γίνεται εισαγωγή στο θέμα όπου και παρουσιάζονται τα αντιβιοτικά και η αντιμικροβιακή αντοχή ως ορισμοί και γενικές έννοιες. Στη συνέχεια παρουσιάζεται το βακτήριο *E. coli* και συγκεκριμένα τα καλλιεργητικά χαρακτηριστικά και οι βιοχημικές ιδιότητές του, η αντιγονική δομή, η γενετική, η παθογένεση, η πρόληψη και θεραπεία των λοιμώξεων και τέλος η αντοχή του στα αντιβιοτικά. Στην τρίτη ενότητα γίνεται εκτενής αναφορά στο νερό και στη δημόσια υγεία, παρουσιάζοντας τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά, τους μικροβιολογικούς δείκτες και το ισχύον νομοθετικό πλαίσιο. Ακολουθούν τα χαρακτηριστικά και επιδημιολογικά δεδομένα των υδατογενών λοιμώξεων, ιδιαίτερα εκείνες οι οποίες οφείλονται στην *E. coli* σε συνδυασμό με την κατανάλωση πόσιμου νερού. Τέλος, στην πέμπτη ενότητα πραγματοποιείται βιβλιογραφική ανασκόπηση ερευνητικών εργασιών από την Ελλάδα και το εξωτερικό σχετικά με την ύπαρξη ανθεκτικών στελεχών *E. coli* στο πόσιμο νερό και στην εφαρμοζόμενη μεθολογία. Η διπλωματική εργασία κλείνει με τα τελικά συμπεράσματα, που προέκυψαν από το σύνολο της μελέτης.

Λέξεις κλειδιά: *Escherichia coli*, πόσιμο νερό, υδατογενείς λοιμώξεις, αντιμικροβιακή αντοχή.

ABSTRACT

The subject of this diploma thesis is the antimicrobial resistance of *E. coli* isolated from drinking water. In order to cover the issue, the analysis was conducted with a bibliographic overview in five chapters. The first chapter introduces the topic where antibiotics and antimicrobial resistance are presented as definitions and general concepts. In the second chapter, *E. coli* is fully analyzed, as its description, crop characteristics and biochemical properties, antigenic structure, genetics, pathogenesis, prevention and treatment, and resistance to antibiotics are presented. The third chapter covers water and public health, presenting its qualities, microbiological indicators and the legislative framework. In the fourth chapter we present the aquatic infections in combination with *E. coli* strains, namely drinking water and the presence of resistant *E. coli* strains and the epidemiological data as well. Finally, in the fifth chapter there is a bibliographic survey of researches both in Greece and abroad on the existence of resistant *E. coli* strains in drinking water and how they can be isolated. The diploma thesis closes with the final conclusions, drawn from the study as a whole.

Keywords: *Escherichia coli*, drinking water, waterborne diseases, antimicrobial resistance.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αρσένη Α. (1994) «Κλινική Μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων». 4η έκδοση, εκδ «ΖΗΤΑ».
2. Adzitey, F., Sumaila, N., Saba, K.S. (2015) Isolation of *E. coli* from drinking water sources for humans and farm animals in Nyankpala Community of Ghana. *Research Journal of Microbiology*, 10: 126-131.
3. Aminov, R. I. (2009) The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental microbiology*, 11(12): 2970-2988.
4. Artz, R.R., Killham, K. (2002) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in private drinking water wells: influences of protozoan grazing and elevated copper concentrations. *FEMS Microbiology Letters*, 216(1): 117-122.
5. Arvanitidou, M., Vayona A., Spanakis, N., Tsakris, A. (2003) Occurrence and antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. *Journal of Applied Microbiology*, 95(1): 180-185.
6. Auerbach-Nevo, T., Baram, D., Bashan, A., Belousoff, M., Breiner, E., Davidovich, C., Matzov, D. (2016) Ribosomal antibiotics: contemporary challenges. *Antibiotics*, 5(3): 24.
7. Bannister, B., Gillespie, S., Jones, J. (2008) Infection: Microbiology and Management. 3rd ed, εκδ. «Παρισιάνος».
8. Baquero, F., Martínez, J. L., Cantón, R. (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in biotechnology*, 19(3): 260-265.
9. Blyton, M.D., Gordon, D.M. (2017) Genetic attributes of *E. coli* isolates from chlorinated drinking water. *PLoS One*, 12(1): e0169445.
10. Βουδούρης Κ. (2018) Θέματα Υδρογεωλογίας Περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωλογίας, ΑΠΘ, www.geo.auth.gr/courses/ggg/ggg887e (Προσπέλαση, 20-6-2018).

11. Brown, J.M., Proum, S., Sobsey, M.D. (2008) *Escherichia coli* in household drinking water and diarrheal disease risk: evidence from Cambodia. *Water Science and Technology*, 58(4): 757-763.
12. Butler, M. S., Blaskovich, M. A., Cooper, M. A. (2016) Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. *The Journal of antibiotics*, 70(1): 3-24.
13. Chan, Y. H., Fan, M. M., Fok, C. M., Lok, Z. L., Ni, M., Sin, C. F., Wong, K., Wong, S, Yeung, R., Teung, T., Chow, W. C., Lam, T., Schooling, C.M. (2012) Antibiotics nonadherence and knowledge in a community with the world's leading prevalence of antibiotics resistance: implications for public health intervention. *American journal of infection control*, 40(2): 113-117.
14. Chen, Z., Yu, D., He, S., Ye, H., Zhang, L., Shu, L., Chen, S. (2017) Prevalence of antibiotic-resistant *E. coli* in drinking water sources in Hangzhou City. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1133.
15. Δακορόνια Ε. (2010) Το δικαίωμα στο νερό – Νομικό πλαίσιο προστασίας. AQUA, 2010: Το νερό και τα ανθρώπινα δικαιώματα στο πλαίσιο της εκπαίδευσης για την αειφόρα ανάπτυξη, Οκτώβριος 2010.
16. Davis, M. E., Liu, T. L., Taylor, Y. J., Davidson, L., Schmid, M., Yates, T., Scotton, J., Spencer, M. D. (2017) Exploring Patient Awareness and Perceptions of the Appropriate Use of Antibiotics: A Mixed-Methods Study. *Antibiotics*, 6(4): 23.
17. Deatherage, D. E., Kepner, J. L., Bennett, A. F., Lenski, R. E., Barrick, J. E. (2017) Specificity of genome evolution in experimental populations of *Escherichia coli* evolved at different temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(10): E1904-E1912.
18. Economou, V., Gousia, P. (2015) Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infect Drug Resist*, 8: 49-61.
19. Economou, V., Sakkas, H., Delis, G., Gousia, P. (2017) Antibiotic resistance in *Enterococcus* spp. Friend or Foe? In: Om V. Singh (Ed.). *Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance*. Weinheim, Wiley–VCH Verlag GmbH & Co; 365-395.

20. Esposito, S., De Simone, G. (2017) Update on the main MDR pathogens: prevalence and treatment options. *Infez Med*, 25(4): 301-310.
21. European Centre for Disease Prevention and Control (2015) Annual epidemiological report 2014. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections.
22. European Environment Agency (2018) Sources of water pollution (<https://www.eea.europa.eu/themes/water-pollution>) (Προσπέλαση, 21-6-2018).
23. European Food Safety Authority (EFSA) (2016) The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *EFSA Journal*, 14; doi: 10.2903.
24. Fakhr, A.E., Gohar, M.K., Atta, A.H. (2016) Impact of some ecological factors on fecal contamination of drinking water by diarrheagenic antibiotic-resistant *Escherichia coli* in Zagazig City, Egypt. *International Journal of Microbiology*, 2016: 6240703.
25. Falcone, M., Russo, A., Venditti, M. (2015) Optimizing antibiotic therapy of bacteremia and endocarditis due to staphylococci and enterococci: New insights and evidence from the literature. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 21: 330-339.
26. Findlay, J., Hopkins, K.L., Alvarez-Buylla, A., Meunier, D., Mustafa, N., Hill, R., Pike, R., McCrae, L.X., Hawkey, P.M., Woodford, N. (2017) Characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the West Midlands region of England: 2007-14. *J Antimicrob Chemother*, 72(4): 1054-1062.
27. Greenwood, D., Slack, R., Peutherer, J., Barer, M. (2011) Medical Microbiology, 17th edn, ELSEVIER.
28. Holt, K.E., Wertheim, H., Zadoks, R.N., Baker, S., Whitehouse, C.A., Dance, D., Jenney, A., Connor, T.R., Hsu, L.Y., Severin, J., Brisse, S., Cao, H., Wilksch, J., Gorrie, C., Schultz, M.B., Edwards, D.J., Nguyen, K.V., Nguyen, T.V., Dao, T.T., Mensink, M., Minh, V.L., Nhu, N.T., Schultsz, C., Kuntaman,

- K., Newton, P.N., Moore, C.E., Strugnell, R.A., Thomson, N.R. (2015) Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci*, 112(27): E3574-81. doi: 10.1073/pnas.1501049112.
29. Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., Sleator, R.D. (2012) *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. *Virulence*, 3(3): 243–250. [doi:10.4161/viru.19700](https://doi.org/10.4161/viru.19700).
 30. Jakopanec, I., Borgen, K., Vold, L., Lund, H., Forseth, T., Hannula, R., Nyggard, G. (2008) A large waterborne outbreak of campylobacteriosis in Norway: the need to focus on distribution system safety. *BMC Infect Dis*, 24(8): 128.
 31. Jones, I. G., & Roworth, M. (1996). An outbreak of *Escherichia coli* 0157 and campylobacteriosis associated with contamination of a drinking water supply. *Public health*, 110(5), 277-282.
 32. Juhna, T., Birzniece, D., Larsson, S., Zulenkovs, D., Sharipo, A., Azevedo, N. F., & Keevil, C. W. (2007). Detection of *Escherichia coli* in biofilms from pipe samples and coupons in drinking water distribution networks. *Applied and environmental microbiology*, 73(22), 7456-7464.
 33. Ibrahimagic, A., Basic, N., Idrizovic, E. (2015) Prevalence of *Escherichia coli* in drinking water collected from the local and municipal water supply in Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina. *SM Journal of Public Health and Epidemiology*, 1(4):1017.
 34. Kamarthapu, V., Epshtein, V., Benjamin, B., Proshkin, S., Mironov, A., Cashel, M., Nudler, E. (2016) ppGpp couples transcription to DNA repair in *E. coli*. *Science*, 352(6288): 993-996.
 35. ΚΕΕΛΠΝΟ (2012) Υδατογενείς λοιμώξεις και επιδημίες γαστρεντερίτιδας υδατογενούς αιτιολογίας.
 36. ΚΕΕΛΠΝΟ (2017) Επιδημιολογικά δεδομένα της λοίμωξης από εντεροαιμορραγικό κολοβακτηρίδιο στην Ελλάδα 2004-2016.

37. ΚΕΕΛΠΝΟ (2018) Μικροβιακή αντοχή: <https://www2.keelpno.gr/blog/?p=6856> (Προσπέλαση, 17 Ιουνίου, 2018).
38. Kohanski, M. A., Tharakan, A., London, N. R., Lane, A. P., Ramanathan, M. (2017) Bactericidal antibiotics promote oxidative damage and programmed cell death in sinonasal epithelial cells. *International forum of allergy & rhinology* 7(4): 359-364.
39. Kümmerer, K. (2009) Antibiotics in the aquatic environment—a review—part I. *Chemosphere*, 75(4): 417-434.
40. Λεγάκης Ν, Χαλεβελάκης Γ, Περόγαμβρος Α. (2008) Αντιμικροβιακά φάρμακα και κλινική προσέγγιση των λοιμώξεων, 3^η εκδ, εκδόσεις «Πασχαλίδης».
41. 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), 1502-1507.
42. Lyimo, B., Buza, J., Subbiah, M., Smith, W., Call, D.R. (2016) Comparison of antibiotic resistant *Escherichia coli* obtained from drinking water sources in northern Tanzania: a cross-sectional study. *BMC Microbiology*, 16(1): 254.
43. Mac Kenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M., Blair, K., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K., Rose, J., Davis, J. (1994) A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med*, 331(3): 161-167.
44. Martínez, J.L. (2008) Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, 321(5887): 365-367.
45. Martinez, J.L. (2009) Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental pollution*, 157(11): 2893-2902.
46. McGann, P., Snedrud, E., Maybank, R., Corey, B., Ong, A. C., Clifford, R., Hinkle, M., Whitman, T., Lesho, E., Schaecher, K.E. (2016) *Escherichia coli* harboring mcr-1 and blaCTX-M on a novel IncF plasmid: first report of mcr-1

- in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(7): 4420-4421.
47. Min, J., & Baemner, A. J. (2002). Highly sensitive and specific detection of viable *Escherichia coli* in drinking water. *Analytical biochemistry*, 303(2), 186-193.
 48. Mironov, A., Seregina, T., Nagornykh, M., Luhachack, L.G., Korolkova, N., Lopes, L.E., Kotova, V., Zavlilgelsky, G., Shakulov, R., Shatalin, K., Nudler, E. (2017) Mechanism of H₂S-mediated protection against oxidative stress in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(23): 6022-6027.
 49. Nazemi, E., Hassen, V., Frost, E., Dubowski, J. (2017) Monitoring growth and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* with protoluminescence emitting semiconductor biochips. *Procedia Technology*, 27: 244-245.
 50. Norville, J.E., Gardner, C.L., Aponte, E., Camplisson, C.K., Gonzales, A., Barclay, D.K., Turner, K., Longe, V., Mincheva, M., Teramoto, J., Tominaga, K., Sugimoto, R., DiCarlo, J., Guell, M., Hysolli, E., Aach, J., Gregg, C., Wanner, B., Church, G. (2016) Assembly of Radically Recoded *E. coli* Genome Segments. *bioRxiv*, 070417.
 51. Παπαδοπούλου, Χ. (2014a) Μικροβιολογία και υγιεινή τροφίμων. 3^η εκδ, εκδόσεις «Κωσταράκη».
 52. Παπαδοπούλου Χ. (2014b) Μικροβιολογία υδάτων. Ανοικτά ακαδημαϊκά μαθήματα, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (<http://ecourse.uoi.gr/course/view.php?id=1360>) (προσπέλαση 15-6-2018).
 53. Papandreou, S., Pagonopoulou, O., Vantarakis, A., Papapetropoulou, M. (2000) Multiantibiotic resistance of gram-negative bacteria isolated from drinking water samples in southwest Greece. *Journal of Chemotherapy*, 12(4): 267-273.
 54. Parasidis, T., Divari, E., Fatouros, N., & Vantarakis, A. (2007). Outbreak of acute gastroenteritis in Greece during a school excursion, April 2007. *Weekly releases (1997–2007)*, 12(27), 3229.

55. Patoli, A., Patoli, B., Mehraj, V. (2010) High prevalence of multi-drug resistant *E. coli* in drinking water samples from Hyderabad. *Gomal Journal of Medical Sciences*, 8(1): 23-26.
56. Payne, M., Croxen, M. A., Lee, T. D., Mayson, B., Champagne, S., Leung, V., Bariso, S., Hoang, L., Lowe, C. (2016) mcr-1–Positive Colistin-Resistant *Escherichia coli* in Traveler Returning to Canada from China. *Emerging infectious diseases*, 22(9): 1673.
57. Πιτυρίγκα Β. (2018) Ποιότητα, Ασφάλεια και Υγιεινή Υδάτινου Περιβάλλοντος (Health-Related Water Microbiology), εκπαιδευτικό πρόγραμμα e-learning, ΕΚΠΑ (<https://elearn.elke.uoa.gr>, προσπέλαση 19-6-2018).
58. Potrykus, K., Cashel, M. (2016) Preferential cellular accumulation of ppGpp or pppGpp in *Escherichia coli*. In *Stress and environmental regulation of gene expression and adaptation in bacteria*, Wiley & Sons, 1st ed, pp.479-488.
59. Ramteke, P.W., Tewari, S. (2007) Serogroups of *Escherichia coli* from drinking water. *Environmental Monitoring and Assessment*, 130(1-3): 215-220.
60. Rice, E. W., Johnson, C. H., Wild, D. K., & Reasoner, D. J. (1992). Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in drinking water associated with a waterborne disease outbreak of hemorrhagic colitis. *Letters in applied microbiology*, 15(2), 38-40.
61. Riera-Montes, M., Brus Sjölander, K., Allestam, G., Hallin, E., Hedlund, K.O., Lofdahl, M. (2011) Waterborne norovirus outbreak in a municipal drinking-water supply in Sweden. *Epidemiol Infect*, 20: 1-8.
62. Runcharoen, C., Moradigaravand, D., Blane, B., Paksanont, S., Thammachote, J., Anun, S., Parkhill, J., Chantratita, N., Peacock S. (2017) Whole genome sequencing reveals high-resolution epidemiological links between clinical and environmental *Klebsiella pneumoniae*. *Genome medicine*, 9(1): 6.

63. Σαββαΐδης Ι. (2014) Μικροβιολογία υδάτινου συστήματος και υδατογενείς λοιμώξεις. Ανοικτά ακαδημαϊκά μαθήματα, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (<http://ecourse.uoi.gr/course/view.php?id=1151>) (προσπέλαση, 20-6-2018).
64. Sana, T.G., Monack, D.M. (2016) Microbiology: The dark side of antibiotics. *Nature*, 534(7609): 624-625.
65. Schmidt, A., Kochanowski, K., Vedelaar, S., Ahrné, E., Volkmer, B., Callipo, L., Knoop, K., Bauer, M., Aebersold, R., Heinemann, M. (2016) The quantitative and condition-dependent *Escherichia coli* proteome. *Nature biotechnology*, 34(1): 104-110.
66. Sidler J, Battegay M, Tschudin-Sutter S, Widmer A, Weisser M. (2014) Enterococci, *Clostridium difficile*, and ESBL-producing bacteria: epidemiology, clinical impact and prevention in ICU patients. *Swiss Medical Weekly*, 144: w14009.
67. Spellberg, B., Bartlett, J. G., & Gilbert, D. N. (2013). The future of antibiotics and resistance. *New England Journal of Medicine*, 368(4): 299-302.
68. Σπηλιοπούλου Ι. (2014) Δειγματοληψίες νερού για μικροβιολογικές δοκιμές , σύμφωνα με τις μεθόδους ISO, ΕΣΔΥ, ΚΕΕΛΠΝΟ (www.keelpno.gr/Portals/Αρχεία/Προγράμματα/ΔΕΔΥ, προσπέλαση 19-6-2018)
69. Starr, C.G., He, J., Wimley, W.C. (2016). Host cell interactions are a significant barrier to the clinical utility of peptide antibiotics. *ACS Chemical Biology*, 11(12): 3391-3399.
70. Tadesse, D., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M., McDermott, P. (2012) Antimicrobial drug resistance in *E. coli* from humans and food animals, US, 1950-2002. *Emerg Inf Dis*, 18(5): 741-749.
71. Tourret, J., Willing, B.P., Croxen, M.A., Dufour, N., Dion, S., Wachtel, S., Denamour, E., Finlay, B.B. (2016) Small intestine early innate immunity response during intestinal colonization by *Escherichia coli* depends on its extra-intestinal virulence status. *PloS ONE*, 11(4): e0153034.

72. Vantarakis, A., Venieri, D., Komninou, G., Papapetropoulou, S. (2005) Differentiation of faecal *Escherichia coli* from humans and animals by multiple antibiotic resistance analysis. *Letters in Applied Microbiology*, doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01803.
73. Walsh, C., Wencewicz, T. (2016) Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities. *American Society for Microbiology (ASM)*, 1st edition.
74. Watson, M.R., Lin, Y.F., Hollwey, E., Dodds, R.E., Meyer, P., McDowall, K.J. (2016) An improved binary vector and *Escherichia coli* strain for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated plant transformation. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(7): 2195-2201.
75. Wilson, D.N. (2013) Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1): 3155.
76. WHO (2014) Antimicrobial Resistance. Global Report on Surveillance 2014 <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport> (προσπέλαση 6 Ιουνίου, 2018).
77. WHO (2018) Water Sanitation Health, http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/iwachap13.pdf (προσπέλαση 15-6-2018).
78. Yah, C.S., Chineye, H.U., Eghafona, N.O. (2007) Multi-antibiotics-resistance plasmid profile of enteric pathogens in pediatric patients from Nigeria. *Biokemistri*, 19(1).
79. Yang, J.P., Tao, H.K. (2009) Antibiotics Resistance of *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 17: 057.
80. Yun-Jian, H., Dong-Ke, C. (2008) 2007 Mohnarin report: Antibiotics resistance of non-fermenting Gram negative bacilli. *Chinese Journal of Antibiotics*, 33(10): 597-601.
81. Zhang, Y.B., He, F.L., Fang, M., Hua, T.F., Hu, B.D., Xu, Y.H., Liu, R.Y. (2009) Antibiotics Resistance Analysis of Gram-negative bacilli. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 9: 059.

